

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

ФАКТОРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ЕВОЛЮЦІЇ ОРГАНІЗМІВ

ФАКТОРЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ
ЭВОЛЮЦИИ ОРГАНИЗМОВ

TOPICS IN EXPERIMENTAL
EVOLUTION OF ORGANISMS

Збірник наукових праць

ТОМ 9

Присвячено

*110-річчю від дня народження
Теодосія Григоровича Добржанського*

Київ
ЛОГОС — 2010

ББК 28.02я43

Ф18

УДК 578.08.631.52

РЕДАКЦІЙНА КОЛЕГІЯ

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

Затверджено до друку рішенням вченої ради Інституту молекулярної біології і генетики НАН України (протокол №5 від 17 травня 2010 р.)

Фактори експериментальної еволюції організмів: зб. наук. пр. / Ф18 НАН України, НААН України, АМН України, Укр. т-во генетиків і селекціонерів ім. М.І. Вавилова; редкол.: В.А. Кунах (голов. ред.) [та ін.].— К.: Логос, 2003–2010.

Т. 9: Присвяч. 110-річчю від дня народж. Теодосія Григоровича Добржанського.— 2010.— 512 с.: іл.— Укр., рос.— Бібліогр. в кінці ст. ISBN 978-966-171-281-1 (Т.9)

У збірнику представлено наукові праці вітчизняних та зарубіжних спеціалістів, написані спеціально для даного видання, присвяченого 110-річчю від дня народження Т.Г. Добржанського. 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.

ББК 28.02я43

ISBN 978-966-171-281-1 (Т.9)

© Українське товариство генетиків і селекціонерів ім. М.І. Вавилова, 2010

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

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

УМОВИ ВИКОРИСТАННЯ МІКРОСАТЕЛІТНИХ ЛОКУСІВ ЯК МАРКЕРІВ ПРИ ІНТРОГРЕСІЇ ГЕНІВ *Pm* ДО М'ЯКОЇ ПШЕНИЦІ

Використання молекулярно-генетичних маркерів для оптимізації процесу перенесення чужинних генів, зокрема, генів стійкості до захворювань, справедливо вважається сучасним та вкрай бажаним прийомом у генетиці [1]. Такий погляд на роль маркерних генів у прикладних генетичних розробках вимагає від генетиків супроводжувати кожен чужинний ген, який увійшов до складу геному певної інтрогресивної лінії пшениці у складі якогось обсягу чужинного хроматину, молекулярним маркером. За цим маркером буде вестися добір у популяціях, що розщеплюються, при використанні інтрогресивної лінії у якості джерела чужинного корисного гена при його перенесенні до генотипу сучасного високопродуктивного комерційного сорту м'якої пшениці. Борошниста роса м'якої пшениці є однією з найбільш суттєвих хвороб пшениці у Європі. Хоча на сьогодні ідентифіковано вже 43 вертикальних генів стійкості до цього захворювання [2], більшість з них швидко втрачають стійкість до збудника через виникнення нових рас патогена. Серед генів *Pm* пшениці чужинного походження найбільш ефективними та тривалими за терміном збереження стійкості до патогену є гени егілопсів секції *Sitopsis*. Тому питання перенесення нових генів *Pm* від цих видів до м'якої пшениці не втрачає своєї актуальності. Наше дослідження спрямовано на порівняльну характеристику інтрогресивних ліній *Triticum aestivum/Aegilops sharonensis* та їх праатьківських генотипів, сорту Аврора та геномно-заміщеної форми Аврозис щодо поліморфізму за низькою мікросателітних локусів хромоми 3D пшениці.

Матеріал та методи

Рослинний матеріал: сорт *Triticum aestivum* L. (AⁿAⁿBBDD) Аврора, геномно-заміщена форма Аврозис (AⁿAⁿBBS'S¹), 25 інтрогресивних ліній — похідних Аврозису. Для екстракції ДНК застосовували стандартну СТАВ методику виділення ДНК із паростків. Полімеразну ланцюгову реакцію проводили згідно умов, вказаних оригінаторами праймерів до мікросателітних локусів. Електрофорез продуктів ампліфікацій проводили у вертикальному 6% поліакриламідному гелі у денатуруючих умовах. Виявляли фрагменти у гелях за допомогою нітрату срібла.

Результати та обговорення

Сорт м'якої пшениці Аврора, на генетичній основі якого було створено інтрогресивні лінії, уражається борошнистою росою на рівні 3-х балів. Геномно-заміщена форма Аврозис характеризується повною резистентністю до борошнистої роси, 9 балів. Стійкість до борошнистої роси інтрогресивних

ліній м'якої пшениці — похідних Аврозису пояснюється включенням до геному генотипу Аврора хромосоми 3S¹ виду *Aegilops sharonensis*, повний геном якого входить до складу геномно-заміщеної форми Аврозис, чи якоїсь її частини. В першому випадку електрофоретичний спектр стійкої лінії буде характеризуватися наявністю продукту ампліфікації, характерного для генотипу Аврозис за всіма мікросателітними маркерами, які досліджувались та за якими генотип Аврозису дає спектр продуктів ампліфікації, який відрізняється від спектру Аврори. Якщо стійка лінія не є чужинно-заміщеною, ген стійкості входить до складу чужинної транслокації на хромосому пшениці. В цьому випадку лінія за певним мікросателітним локусом може бути схожою як з генотипом Аврозису, якщо до складу геному Аврора ген стійкості увійшов разом з мікросателітним локусом, так і з генотипом Аврори, якщо зчеплення між вказаними локусами під час транслокації було розірвано. Отже, для пошуку інтрогресивних ліній, придатних для схрещування з сортом Аврора чи з іншими сортами м'якої пшениці для створення популяції, що розщеплюється, придатною для роботи з нею методом BSA, потрібно для кожного мікросателітного локусу порівняти спектри компонентів ампліфікації інтрогресивної лінії, генотипу Аврора як рекурентного при створенні інтрогресивних ліній та геномно-заміщеної форми Аврозис, джерело чужинних інтрогресій у лініях. На рисунках 1–4 представлено кілька прикладів електрофоретичних спектрів продуктів ампліфікації з праймерами до вказаного у підпису до рисунку мікросателітного локусу.

За мікросателітним локусом *Xcfd55* (рис. 1, табл.) від спектру Аврори не відрізняються спектри продуктів ампліфікації 11 інтрогресивних ліній — похідних Аврозису. Спектр Аврозису та деяких ліній характеризується наявністю більш повільного компонента. Три інтрогресивні лінії характеризуються 0-алелем.

За мікросателітом *Xcfd64* (рис. 2, табл.) спектр Аврори не відрізняється від спектрів 19-ті інтрогресивних ліній, але відрізняється від спектру Аврозису.

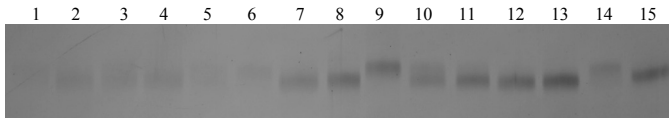


Рис. 1. Локус *Xcfd55*: 1 — res131, 2 — res130, 3 — res129, 4 — res128, 5 — res127, 6, 14 — Аврозис, 7 — Аврора, 8 — res126, 9 — res122, 10 — res121, 11 — res118, 12 — res117, 13 — res115

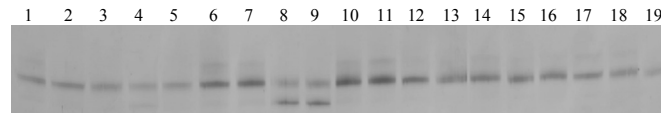


Рис. 2. Локус *Xcfd64*: 1 — res137, 2 — res135, 3 — res134, 4 — res132, 5 — res131, 6 — res130, 7 — res129, 8, 9 — Аврозис, 10 — Аврора, 11 — res128, 12 — res127, 13 — res126, 14 — res122, 15 — res121, 16 — res118, 17 — res117, 18 — res115, 19 — res121

Результати порівняння спектрів продуктів ампліфікації інтрогресивних ліній — похідних Аврозису зі спектрами генотипів Аврора та Аврозис

Генотип	Мікросателітні локуси					
	<i>Xcfd55</i>	<i>Xcfd64</i>	<i>Xcfd141</i>	<i>Xcfd152</i>	<i>Xcfd211</i>	<i>Xcfd223</i>
res115	Авр	Авр	Авр	Авр	Авр	sis
res117	Авр	Авр	Авр	інший	Авр	sis
res118	Sis/Авр	Авр	Авр	Авр	Авр	sis
res121	Sis/Авр	Авр ²	0	Авр	Авр	Авр
res122	Sis	Авр	Авр	Авр	Авр	sis
res126	Авр	Авр	Авр	Авр	Авр	sis
res127	Sis/Авр	Авр ²	0	Авр	Авр	Авр
res128	Авр	Авр	Авр	Авр	Авр	sis
res129	Sis/Авр	Авр	Авр	Авр	Авр	sis
res130	Sis/Авр	Авр	Авр	sis	Авр	sis
res131	Sis	Авр	0	Авр	Авр	Авр
res132	Sis	Авр ² sis ²	0	Авр	Авр	Авр
res134	Sis/Авр	Авр ²	Авр	Авр	Авр	Авр
res135	Авр	Авр ²	Авр	Авр	Авр	sis
res137	Авр	Авр	Авр	Авр	Авр	sis
res138	Sis/Авр	Авр	Авр	Авр	Авр	Авр
res139	Sis/Авр	Авр	Авр	Авр	Авр	Авр
res140	Sis/Авр	Авр	Авр	Авр	Авр	Авр
res141	Авр	Авр	Авр	Авр	Авр	Авр
res142	Авр	Авр	Авр	Авр	Авр	Авр
res143	Авр	Авр	Авр	Авр	Авр	Авр
res144	Авр	Авр	Авр	Авр	Авр	Авр
res145	Авр	Авр	Авр	Авр	Авр	Авр
res146	Sis/Авр	Авр	Авр	Авр	Авр	Авр
res148	Авр	Авр	Авр	Авр	Авр	Авр

Примітки: Авр — рухливість продукта ампліфікації така, яка у продукта ампліфікації генотипу Аврора, Авр² — з двох притаманних генотипу Аврора продуктів ампліфікації у наявності тільки нижній, інший — рухливість продукту ампліфікації відрізняється від рухливості продукта ампліфікації генотипів Аврора та Аврозис, sis — рухливість продукта ампліфікації така, яка продукта ампліфікації генотипу Аврозис, sis/Авр — продуктів ампліфікації два, один за рухливість співпадає з продуктом ампліфікації генотипу Аврора, другий — Аврозис.

За мікросателітним локусом *Xcfd141* спектр генотипу Аврора та всіх інших прогресивних ліній характеризується поодиноким розмитим продуктом ампліфікації. Інший спектр, без жодного продукту ампліфікації має тільки Аврозис (табл.). За мікросателітним локусом *Xcfd152* (рис. 3, табл.) спектр генотипу Аврора характеризується поодиноким продуктом ампліфі-

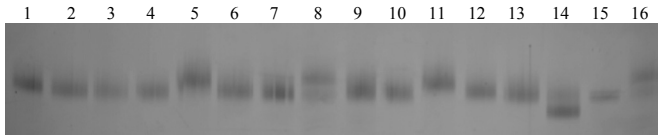


Рис. 3. Локус *Xcfd152*: 1 — res135, 2 — res134, 3 — res132, 4 — res131, 5 — res130, 6 — res129, 7 — res128, 8, 16— Аврозис, 9 — Аврора, 10 — res127, 11 — res122, 12 — res121, 13 — res118, 14 — res117, 15 — res115

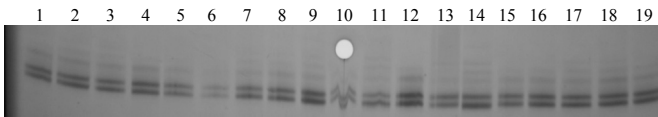


Рис. 4. Локус *Xcfd223*: 1 — res138, 2 — res137, 3 — res135, 4 — res134, 5 — res132, 6 — res131, 7 — res130, 8 — res129, 9 — res128, 10 — res127, 11 — Аврозис, 12 — Аврора, 13 — res126, 14 — res122, 15 — res121, 16, 118 — res118, 17 — res117, 18 — res115

кації, від якого не відрізняються продукти ампліфікації 22 інтрогресивні лінії. Спектр Аврозиса представлений двома продуктами ампліфікації, які повторюються у спектрах трьох ліній.

За мікросателітним локусом *Xcfd211* (табл.) від спектру генотипу Аврора не відрізняється спектр жодної з 25 досліджених інтрогресивних ліній. Іншими за рухомістю компонентами спектру характеризуються генотип Аврозису. За мікросателітним локусом *Xcfd223* (рис. 4, табл.) від спектру генотипу Аврора відрізняються відсутністю мінорних компонентів спектри десяти інтрогресивних ліній. Спектр Аврозису відрізняється від спектру Аврори наявністю ще одного, більш повільного, мінорного компоненту. Зі спектром генотипу Аврозис співпадають спектри 10-ти інтрогресивних ліній. Нуль-алелів за цим локусом не спостерігали.

Локусами, за якими електрофоретичний спектр стійкої лінії характеризувався наявністю продукту ампліфікації, характерного для генотипу Аврозис за всіма мікросателітними маркерами, які досліджувались, а генотип Аврозису дає спектр продуктів ампліфікації, який відрізняється від спектру Аврори, є *Xcfd55*, *Xcfd64*, *Xcfd141*, *Xcfd152* та *Xcfd223*. Жодна із досліджених ліній цим не характеризувалась, отже жодна з них не є чужинно-заміщеною за 3D/3S¹, що підтверджує результати, отримані раніше із застосуванням біохімічних маркерів [3]. Якщо стійка лінія не є чужинно-заміщеною, ген стійкості входить до складу чужинної транслокації на хромосому пшениці. В цьому випадку лінія за певним мікросателітним локусом може бути схожою як з Аврозисом, якщо до складу геному Аврора ген стійкості увійшов разом з мікросателітним локусом, так і з Авророю, якщо зчеплення між вказаними локусами під час транслокації було розірвано. До першого типу ліній відносяться лінії: res122 за локусами *Xcfd55* та *Xcfd223*; res130 за локусами *Xcfd152* та *Xcfd223*; res115, res117, res126, res128, res137 за локусом *Xcfd223*;

res118, res129, res130 за локусом *Xcfd223*, а за локусом *Xcfd55* рослини лінії є гетерозиготами; res127 за локусами *Xcfd152*, *Xcfd141* та гетерозигота за локусом *Xcfd55*; res121 за локусом *Xcfd141* та гетерозигота за локусом *Xcfd55*; res131, res132 за локусом *Xcfd141* та гетерозигота за локусом *Xcfd55*, res132 відрізняється від генотипу Аврора за локусом *Xcfd64*; res134 є стійкою гетерозиготою за локусом *Xcfd55* та відрізняється від генотипу Аврора за локусом *Xcfd64*; res135 відрізняється від генотипу Аврора за локусом *Xcfd64*; res138, res139, res140, res146 є стійкими гетерозиготами за локусом *Xcfd55*.

До ліній другого типу, електрофоретичний спектр продуктів ампліфікації в яких не відрізняється від спектру Аврора за всіма мікросателітними локусами, відносяться лінії res141, res142, res143, res144, res145, res148.

Якщо стійка лінія має певний мікросателітний локус за спектром ампліфікації, характерним для генотипу Аврора, а не генотипу Аврозис, вона може використовуватися у якості донора гена стійкості при схрещуванні з такими генотипами м'якої пшениці, які за спектром ампліконів того самого мікросателітного локусу відрізняються від генотипу Аврора. У попередньому дослідженні нами було виявлено низку генотипів сучасних сортів м'якої пшениці, які можуть слугувати реципієнтами при схрещуванні з дослідженими інтрогресивними лініями при створенні популяцій для роботи із ними методом BSA.

Література

1. *Randhawal H.S. et al.* Rapid and targeted introgression of genes into popular wheat cultivars using marker-assisted background selection // PLoS ONE. www.plosone.org. 1 June 2009.— V.4, Issue 6.— e5752.
2. *McIntosh R.A. et al.* Catalogue of gene symbols for wheat. <http://www.shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/genes/symbolClassList.jsp>.
3. *Vdovychenko Zh.V., Antonyuk M.Z., Ternovskaya T.K.* Genetic analysis of the *T. aestivum* / *Ae. sharonensis* introgressive lines of common wheat for resistance to powdery mildew // Cytology and Genetics, 2005, 39, p. 21–30.

Резюме

Оцінено поліморфізм за мікросателітними локусами, локалізованими на хромосомі 3D м'якої пшениці, у інтрогресивних ліній *T. aestivum/Ae. sharonensis* у порівнянні з генотипами Аврора, Аврозис та 11 сучасних сортів м'якої пшениці. Виявлено лінії, які можна використовувати як джерело гену *Pm* у комбінаціях схрещування з певними генотипами при застосуванні методу BSA.

Оценен полиморфизм по микросателлитным локусам, локализованным на хромосоме 3D пшеницы, у интрогрессивных линий *T. aestivum/Ae. sharonensis* по сравнению с генотипами Аврора, Аврозис и 11 современных сортов мягкой пшеницы. Виявлены линии, которые могут служить источником гена *Pm* в комбинациях скрещивания с определенными генотипами при использовании метода BSA.

The polymorphism between *T. aestivum/Ae. sharonensis* introgression lines and Aurora, Aurosis and 11 modern common wheat cultivars in microsatellite loci, located on 3D chromosome of common wheat, has been estimated. The lines that could be used as *Pm* gene donors in crossing combinations with some genotypes are revealed.

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*

МІНЛИВІСТЬ МІЖМІКРОСАТЕЛІТНИХ ДІЛЯНОК ГЕНОМУ (ISSR) У КУЛЬТУРІ ТКАНИН *UNGERNIA VICTORIS*

Унгернія Віктора (*Ungernia victoris* Vved. ex Artjushenko, *Amaryllidaceae*) — рідкісний вид — ендемік Таджикистану і Узбекистану, ізохінолінові алкалоїди та біологічно активні полісахариди якого є цінними для фармакології. Проблему недостатності природної сировинної бази виду дозволяє вирішити створення калюсних культур-продуцентів БАР. До того ж, регенерацію із калюсних культур, яка забезпечує високий коефіцієнт розмноження, можна використати для прискореного розмноження та реінтродукції виду.

Було створено клітинні лінії культури тканин *U. victoris*, здатні до тривалого росту на агаризованих та в рідких живильних середовищах різного складу [1]. Використання цих ліній з метою збереження генофонду виду або як продуцентів БАР ставить питання про їхню генетичну стабільність. Раніше було проведено RAPD- та цитогенетичний аналізи створених ліній [2, 3]. Було встановлено, що окремі калюсні лінії, отримані із однієї цибулини, поряд із незначними молекулярно-генетичними відмінностями характеризуються міксоплоїдією, значним ступенем поліплоїдизації клітин (до 36n, при модальному класі 2n-4n) та дивергенцією за хромосомною структурою клітинних популяцій. Продовжуючи розпочаті дослідження, ми перейшли від аналізу анонімних ділянок геному (RAPD-маркери), до вивчення мінливості ділянок певного типу — міжмікросателітних послідовностей ДНК (ISSR-аналіз). Отримані дані дозволять більш ґрунтовно дослідити клітинні лінії культури тканин *U. victoris* на молекулярно-генетичному рівні.

Матеріали і методи

Матеріалом для дослідження слугували 6 калюсних та 3 суспензійні дев'ятирічні лінії *U. victoris*, отримані від однієї рослини на живильних середовищах із спільною мінеральною основою 5С із різним вмістом біологічно активних добавок (отримання ліній описано в [2]). На час дослідження калюсні лінії вирощували щонайменше 40 пасажів на таких середовищах: лінії №2, №5, №6 — на середовищі 5С01, лінії №3, №7 — на середовищі 5С3Н, лінію №9а — на середовищі 5С. Суспензійні лінії №10 і №11 вирощували більше 40 пасажів на середовищі 5С3Нж, лінію №12 — на 5С01ж.

У ході попереднього скринінгу двадцяти чотирьох ISSR-праймерів було відібрано 15 праймерів (таблиця), що давали чіткі відтворювані спектри ПЛР-продуктів. Для ампліфікації застосовували наступний температурний режим: 95 °С — 2 хв., 35 Ч (94 °С — 30 с, 53 °С — 30 с, 72 °С — 1 хв. 30 с.), 72 °С — 5 хв. Склад реакційної суміші для ПЛР та методика виділення ДНК наведені в [4].

Нуклеотидні послідовності ISSR-праймерів та характеристика їх ПЛР-продуктів для клітинних ліній культури тканин *U. victoris*

Праймер	Нуклеотидна послідовність (5'–3')	Враховано ампліконів, шт.	Поліморфних ампліконів, шт.	Праймер	Нуклеотидна послідовність (5'–3')	Враховано ампліконів, шт.	Поліморфних ампліконів, шт.
844B	(CT) ₈ GC	9	0	UBC#807	(AG) ₈ T	12	0
ISSR-03	(AC) ₈ TT	4	0	UBC#811	(GA) ₈ C	13	0
ISSR-04	(AC) ₈ AG	7	0	UBC#827	(AC) ₈ G	8	0
ISSR-05	(AC) ₈ TG	8	0	UBC#835	(AG) ₈ YC	10	3
ISSR-23	(AC) ₈ TA	14	3	UBC#836	(AG) ₈ YA	12	0
ISSR-45	(AC) ₈ GC	9	1	UBC#840	(GA) ₈ YT	8	0
ISSR-47	(AC) ₈ GT	6	0	UBC#857	(AC) ₈ YG	5	0
ISSR-59	(AG) ₈ GC	11	0	Сума (шт. / %)		136/100	7/5,1

Примітка. Y — С або Т.

Враховували чітко розрізновані, відтворювані амплікони. Результати були представлені у вигляді бінарної матриці, у якій наявність або відсутність у ISSR-спектрі однакових за розміром ампліконів позначалася відповідно як стан “1” або “0”. На основі отриманої матриці за допомогою програми FAMD було розраховано генетичні відстані Жакарда та побудовано дендрограму генетичної подібності досліджених ліній.

Результати та обговорення

Для визначення генетичної стабільності *U. victoris* в культурі *in vitro* проводили порівняльний аналіз спектрів ПЛР-продуктів ДНК культур тканин отриманих від однієї рослини за умов тривалого вирощування (віком 9 років). Порівнювали між собою лінії, що вирощували на середовищах із різним вмістом біологічно активних речовин, а також лінії, що тривалий час вирощували на твердому або рідкому середовищі однакового складу. Для дослідження обрали ділянки геному, фланковані інвертованими повторами мікросателітних локусів (ISSR-аналіз). Було застосовано 15 ISSR-праймерів, які забезпечували ампліфікацію фрагментів у межах 300–2800 пн. Загальна кількість врахованих ампліконів становила 136 (від 4 до 14 на праймер, у середньому 9,1) (таблиця). Відмінності між клітинними лініями виявили сім ампліконів, що складає 5,1%. Генетичні відстані Жакарда між лініями коливались в межах від 0 до 3,73%.

На основі генетичних відстаней методом UPGMA було побудовано дендрограму генетичної подібності клітинних ліній (рисунок). На дендрограмі об'єкти згрупувалися незалежно від умов культивування (агаризоване або рідке середовище), складу живильних середовищ та походження ліній [2]. Аналіз наявності окремих поліморфних ISSR-фрагментів також не

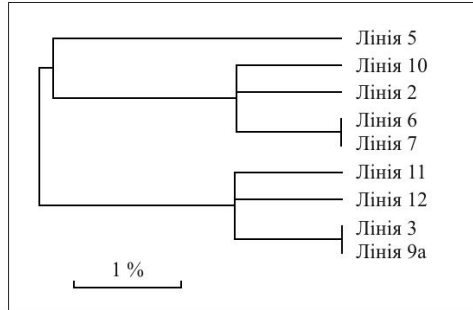


Рис. Дендрограма генетичної подібності клітинних ліній культури тканин *U. victoris*, побудована UPGMA-методом за генетичними відстанями Жакарда

виявив зв'язку із вищезгаданими параметрами. У цілому, проведені дослідження свідчать про те, що тривале культивування *in vitro* тканин *U. victoris* супроводжується молекулярно-генетичними змінами, які призводять до дивергенції ліній культивованих тканин.

Рівень поліморфізму спектрів ампліфікованих міжмікросателітних послідовностей тривалокультивованих ліній *U. victoris* виявився дещо вищим за аналогічні показники, отримані раніше в результаті RAPD-аналізу: у випадку останнього генетичні відстані між лініями складали від 0,84 до 2,99%, а частка поліморфних ампліконів — 3,8% [3]. Не дивлячись на більшу кількість поліморфних ампліконів, використані ISSR-маркери не дозволяють розрізнити деякі лінії з ідентичними спектрами, тоді як RAPD-аналіз дав змогу ідентифікувати кожну лінію. Разом з тим, генетичні відносини між лініями культивованих тканин унгернії, встановлені на підставі різних типів маркерів, хоча і не збігалися повністю, але були подібними.

Літературні дані щодо порівняння ефективності цих двох методів молекулярно-генетичного аналізу у випадку дослідження соматоклональної мінливості є неоднозначними. У деяких випадках ефективність ISSR-аналізу перевищує таку у RAPD-ПЛР — так, у соматоклонів чаю, отриманих шляхом стимуляції росту пазушних бруньок у культурі пагонів, поліморфними були 12,8% ISSR-локусів і лише 4,3% RAPD-локусів [5]. За іншими даними, соматоклональна мінливість ISSR-маркерів виявилася значно нижчою, ніж RAPD-маркерів: частка поліморфних локусів складала відповідно 15,7 і 24,9% у регенерантів *Codonopsis lanceolata* отриманих шляхом органогенезу із каллосу насінневого походження [6].

При переході від поверхневого вирощування до глибинного геном культивованих тканин зазнає значного стресового впливу [7, розділ 8]. Раніше було встановлено, що зміна умов вирощування чинить більший вплив на геном культивованих тканин раувольфії зміїної порівняно зі зміною складу живильного середовища. Зокрема, рівень поліморфізму RAPD-ампліконів при зміні умов вирощування калюсної культури раувольфії зміїної з поверх-

невого на глибинне був значно вищий, ніж при зниженні вмісту сахарози і зміні мінеральної основи агаризованого середовища [8]. В результаті проведених досліджень культивованих тканин *U. victoris* не вдалося встановити залежності рівня мінливості міжмікросателітних ділянок геному від вмісту фітогормонів та способу вирощування (поверхневий, або в рідкому середовищі). Величина генетичних дистанцій між лініями, що вирощували на агаризованому середовищі 5C01 (1 мг/л кінетину, 1 мг/л α -НОК) коливалася від 0,75% до 2,96%; на середовищі 5C3H (0,02 мг/л кінетину, 0,5 мг/л α -НОК) — від 2,24% до 2,99%. Генетичні дистанції між лініями, які вирощували протягом щонайменш 40 пасажів на твердому та рідкому середовищі однакового складу, також коливались в широкому діапазоні — від 0,75% та 1,52% для ліній, що росли на 5C3H та 5C3Hж, до 2,24% для ліній, що росли на 5C01 та 5C01ж. Таким чином, цілком можливо, що на рівень генетичної мінливості культивованих тканин *U. victoris* впливають інші чинники, не враховані в проведеному дослідженні.

Висновки

Тривале культивування *in vitro* тканин *U. victoris* супроводжується перебуваннями міжмікросателітних ділянок геному, які призводять до дивергенції окремих клітинних ліній культури тканин, отриманих від однієї рослини. Генетичні відстані Жакарда між лініями становили від 0 до 3,73%. Залежності рівня мінливості від складу живильного середовища та способу вирощування не виявлено. В цілому, результати молекулярно-генетичного аналізу з використанням ISSR-маркерів узгоджуються з даними проведеного раніше RAPD-аналізу.

Література

1. Кунах В.А., Можилевская Л.П., Потанчук Е.А. и др. Получение культуры тканей *Ungernia victoris* и ее особенности при выращивании на питательных средах различного состава // Биотехнология.— 2007.— №1.— С. 14–21.
2. 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.— Т.42, №1.— С. 29–36.
3. Бублик О.М., Андреев И.О., Спиридонова К.В., Кунах В.А. Соматическая мутационная изменчивость *U. victoris*: необходимость комплексного генетического анализа // Biopolym. Cell.— 2008.— №6.— С. 487–493.
4. Бублик О.М., Андреев И.О., Спиридонова К.В. и др. Генетическая гетерогенность редкисного эндемического вида *Ungernia victoris* (Amaryllidaceae): RAPD-анализ // Украинський ботанічний журнал.— 2008.— Т.65, №3.— С. 445–452.
5. Devarumath R.M., Nandy S., Rani V. et al. RAPD, ISSR and RFLP fingerprints as useful markers to evaluate genetic integrity of micropropagated plants of three diploid and triploid elite tea clones representing *Camellia sinensis* (China type) and *C. assamica* ssp. *assamica* (Assam-India type) // Plant Cell Rep.— 2002.— Vol.21.— P. 166–173.
6. Guo W.L., Gong L., Ding Z.F. et al. Genomic instability in phenotypically normal regenerants of medicinal plant *Codonopsis lanceolata* Benth. et Hook. f., as revealed by ISSR and RAPD markers // Plant Cell Rep.— 2006.— Vol.25.— P. 896–906.

7. Кунах В.А. Биотехнология лекарственных растений. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи.— К.: Логос, 2005.— 724 с.

8. Спиридонова Е.В., Адноф Д.М., Андреев И.О., Кунах В.А. Динамика изменений генома каллусных тканей раувольфии змеиной при переводе в условия глубинного выращивания // Цитология и генетика.— 2008.— Т.42, №2.— С. 35–41.

Резюме

ISSR-аналіз 9 клітинних ліній *U. victoris*, отриманих від однієї рослини, показав, що тривале культивування *in vitro* супроводжується перебудовами міжмікросателітних ділянок геному, які призводять до дивергенції ліній. Генетичні відстані Жакарда між лініями склали від 0 до 3,73%. Не виявлено залежності рівня мінливості від складу живильного середовища та способу вирощування.

ISSR-анализ 9 клеточных линий *U. victoris*, полученных от одного растения, показал, что длительное культивирование *in vitro* сопровождается перестройками межмикросателлитных участков генома, и приводит к дивергенции клеточных линий. Генетические расстояния Жакарда между линиями составили от 0 до 3,73%. Не выявлено зависимости уровня изменчивости от состава питательной среды и способа выращивания.

ISSR-analysis of nine *U. victoris* cell lines generated from the same plant revealed the variability of inter simple sequence repeat markers to be induced by long term culture *in vitro*, which resulted in divergence of the lines. Jacquard's genetic distances between cell lines varied from 0 to 3.73%. No relationship was found between variability level and of nutrient medium content as well as mode of maintenance.

ВЕСЕЛОВ Д.С., АХИЯРОВА Г.Р.

Институт биологии УНЦ РАН, Россия, 450054, Уфа, пр. Октября, 69

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ АКВАПОРИНОВ У РАСТЕНИЙ КУКУРУЗЫ ПРИ ОСМОТИЧЕСКОМ СТРЕССЕ

Способность сохранять баланс между поглощением и потерей воды очень важно для растений, поскольку водоснабжение и транспирация могут изменяться очень быстро в естественных условиях. В течение долгого времени внимание исследователей было сосредоточено на механизмах, позволяющих контролировать потерю воды с помощью изменения устьичной проводимости [1]. Открытие водных каналов аквапоринов и раскрытие механизмов, контролируемых их число и активность, сместило акценты в сторону изучения регуляции поглощения воды с помощью изменения гидравлической проводимости тканей. Аквапорины могут увеличивать транспорт воды через мембраны, уменьшая их гидравлическое сопротивление [2]. Роль аквапоринов в регуляции водных отношений при водном дефиците хорошо изучена, однако их экспрессия в этих условиях может увеличиваться, уменьшаться или совсем не изменяться [3]. Считается, что увеличение и снижение экспрессии аквапоринов и соответствующие изменение проницаемости мем-

бран для воды имеет важное значение для сохранения водного статуса растений. В первом случае уменьшение водной проницаемости мембран клеток корня предотвращает выход воды из корня в почву [4]. Во втором случае высокий уровень аквапоринов может увеличивать поглощение воды при водном дефиците [5]. Считается, что вклад обоих типов ответов может изменяться в зависимости от интенсивности и продолжительности стресса [3]. Таким образом, цель работы состояла в изучении влияния дефицита воды, создаваемого путем добавления полиэтиленгликоля в питательную среду на экспрессию генов у растений кукурузы.

Материалы и методы

Эксперименты проводили на 7-суточных растениях кукурузы (*Zea Mays L.*, линия В73). Дефицит воды создавали с помощью 12% раствора нейтрального осмотика ПЭГ 6000. Влияние водного дефицита изучали при двух температурных режимах — 23 и 28 °С. Транспирацию определяли весовым методом. Тотальную РНК экстрагировали из свежих листьев и корней, используя мининабор RNeasy для растений (Qiagen, Maryland, USA). Образцы листьев делили на экспонированную часть (листовая пластина) и часть в основании листа внутри пазухи длиной 3–4 см. Первая является зрелой частью листа, вторая — его зоной роста. Во время экстракции РНК проводили ферментативное разрушение ДНК с помощью ДНКазы в соответствии с рекомендациями производителя. Для ПЦР реакции использовали реакциюную смесь QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen). РТ-ПЦР в реальном времени проводили с помощью ABI PRISM7700 (Applied Biosystems), сначала при 95 °С в течение 15 мин, за которым следовало 40 циклов (95 °С, 15 сек; 58 °С, 30 сек; 72 °С, 30 сек). Относительную количественную оценку проводили с использованием 26S rRNA для нормализации выхода РНК как описано (PE Applied Biosystems (2001) User Bulletin#2). Определение транскрипционной активности генов ZmPIP проводили как описано [6].

Результаты и обсуждение

Было изучено влияние на растения добавления ПЭГ в питательный раствор. Выбор кукурузы был обусловлен тем, что аквапорины наиболее хорошо изучены у растений этого вида.

При добавлении ПЭГ в питательный раствор транспирация растений кукурузы снижалась. Степень ингибирования была значительно больше в случае высокой температуры (примерно 50% и 40% от уровня контроля при 23 и 28 °С соответственно). Уменьшение уровня транспирации неизбежно приводило к снижению гидравлической проводимости вследствие того, что снижение транспирации уменьшало долю апопластного пути, т.е. пути с меньшим гидравлическим сопротивлением, в общем транспорте воды [7]. При этом значение мембранного транспорта должно было возрасти, и важно было попытаться выявить возможную роль аквапоринов в регуляции транспирационного потока воды по растению. Мы попытались выяснить, не связаны ли различия в реакции на ПЭГ при двух температурных режимах с

уровнем экспрессии и содержанием аквапоринов плазматической мембраны (PIP).

Анализ данных о влиянии осмотического стресса на растения кукурузы показывает следующее. Экспрессия генов аквапоринов в корнях и дифференцированной зоне листьев в большинстве случаев резко возрастала при действии ПЭГ при обеих температурах, в то время как содержание соответствующих белков увеличивалось в меньшей степени, а в некоторых случаях не отличалось от контроля или даже снижалось ниже его уровня. В некоторых других экспериментах уровень мРНК аквапоринов не отражал количества транслированного продукта [8]. В нашем случае мы смогли найти всего несколько примеров пропорциональности изменений уровня транскрипта и продукта его трансляции. Так, в случае PIP2;6 снижение содержания белка в корнях ниже уровня контроля на фоне высокой температуры можно было связать со снижением уровня транскрипта. Еще один пример пропорциональности изменений уровня экспрессии и содержания продукта — повышение уровня экспрессии PIP 2;5 гена и количества его продукта в корнях через 8 часов действия ПЭГ при нормальной температуре и пропорциональное снижение экспрессии гена PIP и его продукта в зоне роста листа при повышенной температуре через 8 часов действия ПЭГ. Но в большинстве других случаях такого соотношения выявить не удавалось. Уровень экспрессии генов во многих случаях возрастал гораздо сильнее, чем содержание кодируемых ими белков, а в некоторых случаях на фоне возрастания количества транскрипта содержание соответствующего белка не менялось или даже снижалось ниже уровня контроля. Различия в изменении уровня транскрипта и продукта его трансляции можно объяснить тем, что концентрация белка зависит от многих факторов, кроме уровня экспрессии гена (скорости трансляции, стабильности белка и т.д.) [8]. Высказывалось предположение о том, что активные формы кислорода (ROS), которые образуются при многих стрессах [9] инициируют цепь реакций с удалением электронов, которые могут привести к деструкции биоактивных молекул, таких как аквапорины [10]. Деструкцией аквапоринов при стрессе можно объяснить то, что их количество только слегка увеличивалось (или не увеличивалось совсем, а даже снижалось) под воздействием ПЭГ, несмотря на огромное увеличение уровня мРНК аквапоринов. Таким образом, повышение уровня транскрипции аквапоринов могло способствовать поддержанию количества водных каналов у растений при действии оксидативного стресса и других деструктивных процессах, вызванных обработкой ПЭГ.

В наших экспериментах можно проследить обратную зависимость между степенью снижения транспирации под влиянием ПЭГ и уровнем накопления аквапоринов в корнях растений, которые росли при разных температурных режимах: транспирация снижалась в меньшей степени у растений, которые росли на фоне более низкой температуры, и именно у этих растений наиболее явно и стабильно повышалось содержание аквапоринов в корнях при действии ПЭГ. Таким образом, увеличение уровня аквапоринов в корнях способ-

ствует поддержанию транспирации у растений на фоне осмотического стресса благодаря снижению сопротивления потоку воды через корни. В наших экспериментах вклад аквапоринов в поддержание потока воды в стрессированных растениях проявлялся в изменении уровня PIP2 в корнях. Изменения в уровне PIP1;2 носили нерегулярный характер. Это соответствует данным литературы о том, что хотя изоформы PIP1 могут функционировать как водные каналы во взаимодействии с PIP2 аквапоринами [11], PIP2 аквапорины непосредственно участвуют в транспорте воды через мембраны [6]. Сравнение скорости транспирации и содержания аквапоринов в корнях при разных температурных режимах позволило нам выявить роль корневых аквапоринов из класса PIP2 в поддержании транспирационного потока. Значение изменений уровня аквапоринов в листьях не так очевидно, как в корнях.

Выводы

Таким образом, уровень содержания аквапоринов и экспрессии их генов в корнях, по все видимости, является важным фактором, способствующим поддержанию транспирационного потока в растениях кукурузы при осмотическом стрессе. На первый взгляд это утверждение плохо согласуется с нашими данными о том, что транспирация снижалась при действии ПЭГ, в то время как экспрессия генов аквапоринов и содержание некоторых из кодируемых ими белков увеличивалась (по крайней мере, при более низкой температуре). Однако сравнение ответа растений на воздействие ПЭГ при различных температурных режимах показало, что на фоне накопления аквапоринов транспирация снижалась в меньшей степени при более низкой температуре. Результаты, которые мы получили при более низкой температуре, соответствуют данным Lian et al. [5], показавшим, что высокий уровень аквапоринов играет положительную роль в избегании засухи у риса благодаря повышению поглощения воды и поддержанию водного баланса. Однако, снижение уровня транскрипции аквапоринов было очевидным только на фоне сильного стресса [12], когда устьица почти полностью закрывались, а количество доступной воды в почве резко снижалось [3]. Это соответствует нашим данным, которые мы получили при действии высокой температуры, когда стресс был более сильным, поскольку к осмотическому стрессу прибавлялась воздушная засуха. По данным литературы дефицит воды неоднозначно влияет на уровень аквапоринов в растениях. Наши результаты свидетельствуют в пользу того, что уровень аквапоринов может увеличиваться, оставаться неизменным или даже снижаться у растений под влиянием дефицита воды в зависимости от интенсивности стресса.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 09-04-00942.

Литература

1. Webb A.A.R., Baker A.J. Stomatal biology: new techniques, new challenges.— *New Phytol.*— 2002.— V.153.— P. 365–370.
2. Morillon R., Chrispeels M.J. The role of ABA and the transpiration stream in the regulation of the osmotic water permeability of leaf cell.— *PNAS USA.*— 2001.— P. 14138–14143.

3. Galmes J., Pou A., Alsina M.M., Tomas M., Medrano H., Flexas J. Aquaporin expression in response to different water stress intensities and recovery in Richter-110 (*Vitis* sp.): relationship with ecophysiological status.— *Planta*.— 2007.— V.226.— P. 671–681.

4. Aroca R., Ferrante A., Vernieri P., Chispeels M.J. Drought, abscisic acid and transpiration rate effects on the regulation of PIP aquaporin gene expression and abundance in *Phaseolus vulgaris* plants.— *Ann. Bot.*— 2006.— V.98.— P. 1301–1310.

5. Lian H.-L., Yu X., Ye Q., Ding X.-S., Kitagawa Y., Kwak S.-S., Su W.-A, Tang Z.-C. The role of aquaporin RWC3 in drought avoidance in rice.— *Plant Cell Physiol.*— 2004.— V.45.— P. 481–489.

6. Chaumont F., Barrieu F., Wojcik E., Chrispeels M.J., Jung R. Aquaporins constitute a large and highly divergent protein family in maize.— *Plant Physiol.*— 2001.— V.125.— P. 1206–1215.

7. Steudle E, Peterson C.A How Does Water Get Through Roos? — *J Exp Bot.*— 1998.— V.49.— P. 775–788.

8. Suga S., Komatsu S., Maeshima M. Aquaporin isoforms responsive to salt and water stresses and phytohormones in radish seedlings.— *Plant Cell Physiol.*— 2002.— V.43.— P. 1229–1237.

9. Шакирова Ф.М. Неспецифическая устойчивость растений к стрессовым факторам и ее регуляция. Уфа: Гилем, 2001.— 160 с.

10. Henzler T., Ye Q., Steudle E. Oxidative gating of water channels (aquaporins) in *Chara* by hydroxyl radicals.— *Plant Cell Environ.*— 2004.— V.27.— P. 1184–1195.

11. Fetter K., Van Wilder V., Moshelion M., Chaumont F. Interactions between plasma membrane aquaporins modulate their water channel activity.— *Plant Cell.*— 2004.— V.16.— P. 215–228.

12. Bogeat-Triboulot M.-B et al. Gradual soil water depletion results in reversible changes of gene expression, protein profiles, ecophysiology, and growth performance in *Populus euphratica*, a Poplar growing in arid regions.— *Plant Physiology.*— 2007.— V.143.— P. 876–892.

Резюме

Повышенный уровень экспрессии генов аквапоринов обеспечивал сохранение содержания водных каналов в мембранах на уровне, не уступающем контрольному, в условиях стресса. Увеличение активности водных каналов способствует поддержанию транспирационного потока у растений.

In stress conditions high level of aquaporin gene expression contributed the level of water channel in membranes not low that in control plants. Increasing of water channel activity promote the maintenance of plant transpiration.

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 ТРИТОНА X-100 НА БЕЛКОВЫЕ ПРОФИЛИ И ДИНАМИКУ ПРОРАСТАНИЯ СЕМЯН САХАРНОЙ СВЕКЛЫ

Известно, что обработка растений детергентом “Тритон X-100” вызывает появление наследуемых морфо-физиологических изменений в ряду клеточных и половых поколений у растений пшеницы и сахарной свеклы

[1, 2]. Также было показано влияние TX-100 на структуру ДНК, в частности, на организацию локуса *Adh1* сахарной свеклы [3]. Поскольку в этих экспериментах обработка растений TX-100 проводилась на стадии набухания семян, можно предположить, что обнаруженные нами изменения закладываются именно на этой стадии.

С момента начала набухания до начала проклевывания семян в них проходит ряд физиологических процессов, изменяющих состояние зародышей. Происходит образование новых ферментов и активизация имевшихся, повышается интенсивность дыхания, распадаются запасные вещества, питательные вещества перемещаются к точкам роста, начинается деление и растяжение клеток, приводящее к образованию новых тканей и органов [4]. Все процессы проходят в определенной очередности, но новые начинаются еще до завершения прежних.

Физическая фаза прорастания состоит в поглощении воды и набухании семени, биохимическая — в превращении нерастворимых запасных веществ в растворимые и подвижные, морфологическая — в росте органов проростка (прободение корешком семенной оболочки). Ранее было показано, что TX-100 изменяет динамику прорастания семян сахарной свеклы [2]. Это, по-видимому, обусловлено тем, что детергент TX-100, может оказывать влияние на липидные оболочки, солубилизацию запасных жиров и липофильных групп белков. В связи с этим представляло интерес изучение влияния TX-100 на динамику прорастания семян сахарной свеклы и на возникающие при этом изменения профилей растворимых белков.

Материалы и методы

Растительный материал. Для исследования были взяты гибридные семена, полученные от опыления растения сахарной свеклы пыльцой одного растения красной столовой свеклы (урожаем 2008 года). Контрольные семена сахарной свеклы замачивали в дистиллированной воде в термостате при 29 °С, а опытные замачивали в 0,1% растворе TX-100 в течение 18 часов при 29 °С, затем отмывали водой и снова помещали в термостат на проращивание. Взятие образцов на анализ проводили через 18, 42, 66 и 90 часов проращивания.

Экстракция и электрофорез белков. Экстракцию белков осуществляли, растирая проростки в пробирках при 4 °С в 40–100 мкл экстракционной смеси, представляющей собой 0,1М трис-НСl (рН 8,3), 0,3% динатриевой соли ЭДТА, 3,6% сахарозы и 0,3% дитиотрейтола. Электрофорез суммарного белка проводили в 7,5% полиакриламидном геле с последующей окраской Coomassie R250 [5]. Сканирование белковых спектров проводили на приборе Biodoc.

Результаты и обсуждение

Влияние TX-100 на динамику прорастания семян сахарной свеклы. Как в контрольных, так и в опытных партиях выявились нормально развивающиеся (нормальные) и поздно развивающиеся (поздние) проростки. Но в опытной группе выявились также непрорастающие семена (табл.). Через

Таблица

Характеристика и динамика прорастания контрольных и обработанных ТХ-100 семян сахарной свеклы

Время проращивания	Контрольные семена			Обработанные семена			
	размер нормальных проростков	% нормальных проростков	% поздних проростков	размер нормальных проростков	% нормальных проростков	% поздних проростков	% непрорастающих семян
18 ч	0,5 см	73	27	0,3 см	50	14	36
42 ч	2 см	90	10	0,5 см	50	14	36
66 ч	6–7 см	97	3	3 см	50	14	36
90 ч	8–10 см	100	0	5–6 см	50	18	32

90 часов проращивания все контрольные семена проклюнулись и размеры проростков выровнились. В опытной группе 32% семян не проклюнулось вообще, а 18% проростков были поздними, т.е. отставали в своем развитии от нормы. Следует отметить, что и нормальные проростки опытных семян отставали в развитии от нормальных контрольных проростков примерно на сутки. Таким образом, мы видим, что обработка ТХ-100 снижает скорость и на энергию прорастания семян, а также приводит к полной потере способности к прорастанию у части семян.

Влияние ТХ-100 на белковые профили семян сахарной свеклы. Для выявления различий в биохимических процессах, обеспечивающих прорастание семян, мы использовали электрофорез суммарного белка проростка. Белковые профили контрольных и опытных проростков содержат два характерных блока: блок А — запасные белки, блок Б — белки, которые первыми начинают синтезироваться при прорастании. Кроме этих блоков в профилях присутствуют белки, характерные для каждого дня прорастания.

При сравнении белковых профилей нормальных проростков мы видим, что через 18 часов после замачивания в контрольной группе блок А выражен намного слабее, чем у проростков семян, обработанных ТХ-100 (рис. 1). Видимо, ТХ-100 ускоряет переход запасных белков в водорастворимую форму. Через 42 часа блок А у контрольных проростков становится чуть ярче, тогда как у обработанных — почти исчезает. Через 66 часов блок А у нормальных проростков обеих групп отсутствует, что позволяет предположить, что все запасные белки этого блока израсходованы.

Блок Б после 18 часов проращивания более ярк у контрольных растений, но уже через 42 часа интенсивность этого блока в белковых профилях контрольных и опытных проростков одинакова. Еще одно отличие профилей контрольных и опытных проростков состоит в том, что быстромигрирующие белки, расположенные на геле ниже блока Б, у опытной группы появляются уже через 18 часов после замачивания, тогда как у контрольной только после 42 часов. На рисунке 1 можно также видеть, что белковые профили нормальных проростков контрольных и опытных групп после 66 и 90 часов не имеют ни внутри- ни межгрупповых отличий.

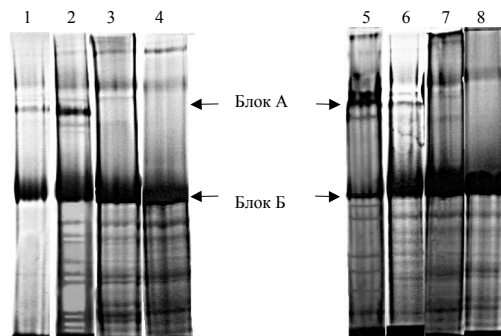


Рис 1. Белковые профили нормальных проростков сахарной свеклы
 Контроль: 1 дорожка — через 18 ч, 2 — через 42 ч, 3 — через 66 ч, 4 — через 90 ч прорастания. Опыт: 5 дорожка — через 18 ч, 6 — через 42 ч, 7 — через 66 ч, 8 — через 90 ч прорастания. Блок А — запасные белки, блок Б — новосинтезированные белки проростка

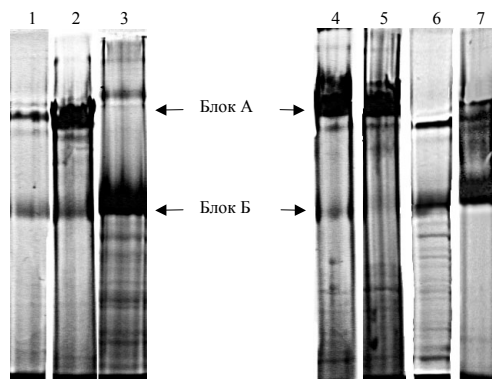


Рис 2. Белковые профили поздно развивающихся проростков сахарной свеклы
 Контроль: 1 дорожка — через 18 ч, 2 — через 42 ч, 3 — через 66 ч прорастания. Опыт: 4 дорожка — через 18 ч, 5 — 42 ч, 6 — через 66 ч прорастания, 7 — непророснувшее семя через 90 ч проращивания. Блок А — запасные белки, Блок Б — новосинтезированные белки проростка

Большой интерес представляют профили поздно развивающихся проростков (рис. 2). В контрольной группе у поздних проростков блок А после 18 ч прорастания лишь немного интенсивнее, чем у нормальных проростков, но через 42 ч он сильно увеличивается, причем намного сильнее, чем у нормальных. После 66 ч прорастания блок А в этой группе исчезает. В опытной группе у поздно развивающихся проростков после 18 ч и 42 ч проращивания блок А тоже намного интенсивнее, чем у нормальных проростков, а после 66 ч тоже исчезает. Блок Б после 18 ч и 42 ч сильно ослаблен

у поздно развивающихся проростков контрольных и опытных групп. Интересно, что у поздних проростков количество быстромигрирующих белков, расположенных на электрофореграмме ниже блока Б, после 18 и 42 ч проращивания у опытной группы больше, чем у контрольной. На 7-й дорожке представлен белковый профиль обработанного ТХ-100 непроросшего зародыша после 90 ч проращивания. В этом профиле очень интенсивны белки блоков А и Б, но почти отсутствуют остальные белки.

Выводы

Обработка семян Тритоном Х-100 уменьшает скорость и энергию прорастания, а также полностью подавляет способность к прорастанию у части семян. Показано, что Тритон Х-100 меняет динамику изменения белкового профиля у нормально развивающихся проростков, и вносит качественные изменения в белковые профили семян, потерявших способность к прорастанию.

Работа частично 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. Махмудова К.Х., Богданова Е.Д., Левитес Е.В. Индукция Тритоном Х-100 наследуемых изменений морфологических признаков у *Triticum aestivum* L. // Генетика. 2009.— Т.45, №4.— С. 564–567.
2. Кирикович С.С., Левитес Е.В. Эпигенетическая изменчивость у сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.), индуцированная Тритоном Х-100 // Фактори експериментальної еволюції організмів (Збірник наукових праць). Київ: “Логос”.— 2009.— Т.7.— С. 95–99.
3. Виниченко Н.А., Кирикович С.С., Левитес Е.В. Влияние обработки эпиму-тагеном “Тритон Х-100” на организацию локуса *Adh1* сахарной свеклы // Фактори експериментальної еволюції організмів (Збірник наукових праць). Київ: “Логос”.— 2009.— Т.7.— С. 5–9.
4. Якушкина Н.И. Физиология растений.— Москва: Просвещение, 1980.— 303 с.
5. http://www.molbiol.ru/protocol/17_01.html.

Резюме

Показано влияние Тритона Х-100 на динамику прорастания и всхожесть семян сахарной свеклы. Белковые профили, полученные на проростках обработанных и контрольных семян различались. Предполагено, что снижение скорости и энергии прорастания семян, а также подавление их способности к прорастанию обусловлено качественными и количественными изменениями белкового профиля.

In this study, Triton X-100 influence on germination dynamics and viability of seeds was demonstrated. Protein profiles obtained from seedlings of controlled and treated seeds were different. The reduction of germinating rate and viability of seeds is assumed to be caused by means of qualitative and quantitative changes in protein profiles.

ГЕРАЩЕНКОВ Г.А.¹, РОЖНОВА Н.А.¹, АБРАМОВ С.Н.², ГОРБУНОВА В.Ю.²

¹ Институт биохимии и генетики УНЦ РАН,

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

² ГОУ ВПО “Башкирский государственный педагогический университет”,

Россия, 450000, Уфа, проспект Октябрьской революции, 3а,

e-mail: obg_bspu@mail.ru

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ МАРКЕРОВ АПОМИКСИСА У ФОРМ *BOECHERA* И БЛИЖАЙШИХ РОДСТВЕННИКОВ ИЗ СЕМЕЙСТВА *BRASSICACEAE*

Исследования в области генетики апомиксиса у цветковых растений обоснованно относят к числу прорывных исследований (Ozias-Akins and van Dijk, 2007). Тем не менее, возможное участие МГЭ в манифестации апомиксиса выпало из поля зрения исследователей. Как правило, роль МГЭ в бесполом размножении 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 апомиксиса у растений. Возможно по этой причине, начиная с первых экспериментов Грегора Менделя на *Hieracium* и вплоть до настоящего времени, молекулярные механизмы, контролирующие апомиксис у растений, остаются слабо понятными. В настоящее время ведется активный поиск биохимических и молекулярно-генетических маркеров апомиксиса у различных видов цветковых растений, и в том числе у *Boechea* (Naumova et al, 2001; Gerashchenkov et al, 2007). Цель исследования: анализ особенностей наследования маркеров диплоспорического апомиксиса у представителей рода и родственных форм из семейства *Brassicaceae*.

Материалы и методы

Диплоспорический вид *Boechea holboellii* характеризуется рядом особенностей, позволяющих рассматривать его в качестве перспективного модельного объекта при исследованиях морфо-физиологической и молекулярной регуляции апомиксиса. Это близкий родственник *Arabidopsis thaliana*, для которого доступны обширные молекулярно-генетические ресурсы (полностью секвенированный геном, мутанты), что облегчает поиск участвующих в контроле апомиксиса генов. Вид *Boechea holboellii* высоко полиморфен, включает половые и апомиктичные формы различной пloidности из ряда изолированных друг от друга географически популяций. Развитие зародышевых мешков характеризуется: при апомейозе диплоспорическим образованием диад (*Taraxacum*-тип) и при мейозе мейотическим образованием тетрад (*Polygonum*-тип) (Naumova et al, 2001). Наконец, это единственный описанный апомикт в семействе *Brassicaceae*, содержащем ряд важных для сельского хозяйства видов. В исследовании сравнивали апомик-

Таблица 1

Описание представителей семейства *Brassicaceae* с бесполосеменным (апо) и половым (sex) способами репродукции

№№	Виды	Способ размножения	Источник происхождения
Представители рода <i>Boechnera</i>			
1	<i>Arabis holboellii</i> Colorado 3x #36-1	Апо	Dr. Kim Boutilier, Netherlands
2	<i>Arabis holboellii</i> Colorado 3x #6-3	Апо	
3	<i>Arabis holboellii</i> Colorado 3x #5-10	Апо	
4	<i>Arabis holboellii</i> Colorado 2x #4-2	Апо	
5	<i>Arabis holboellii</i> Colorado 2x #8-7	Апо	
6	<i>Arabis drummondii</i> 2x #10	Sex	
7	<i>Arabis holboellii</i> Rc#1	Апо	Dr. Thomas Mitchell- Olds, Germany
8	<i>Arabis holboellii</i> cg#25	Апо	
9	<i>Arabis drummondii</i> 4	Sex	
10	<i>Arabis drummondii</i> 11	Sex	
Другие представители семейства <i>Brassicaceae</i>			
11	<i>Arabis canadiensis</i>	Sex	Dr. Anne E. Hall, USA
12	<i>Boechnera beckwithii</i>	Unknown	Dr. Michael Windham, USA
13	<i>Boechnera falcifruca</i>	Unknown	
14	<i>Boechnera perennans</i>	Unknown	Dr. David Siemens, USA
15	<i>Boechnera stricta</i> 10	Sex	
16	<i>Arabis drummondii</i>	Sex	Dr. Diana Wolf, USA
17	<i>Arabis lyrata</i>	Sex	
18	<i>Arabis pendula</i> L.	Sex	Dr. Olga Zhirona, Russia
19	<i>Brassica napus</i> , canola cv. Westar	Sex	
20	<i>Arabidopsis thaliana</i> DiJohn	Sex	

тичные и половые формы *Boechnera* из нидерландской (популяции США и Гренландии) и германской коллекций, а также ближайшие родственники из семейства *Brassicaceae* (табл. 1).

В работе использовали трансозон дисплей – один из вариантов ПЦР стратегии, основанный на наличии в геноме мобильных генетических элементов, выступающих в роли своеобразного геномного якоря. Метод позволяет одновременно детектировать множественный полиморфизм в исследуемом геноме. Амплифицированные фрагменты фракционировали в 1,0–1,5% агарозных гелях, которые окрашивали бромистым этидием, или в 5,1% полиакриламидных гелях, которые окрашивали серебром.

Маркерные ПЦР фрагменты вырезали из геля и реамплифицировали. Секвенирование маркеров апомикса осуществляли на автоматическом секвенаторе ABI PRISM® 310, используя BigDye® терминатор.

Результаты и обсуждение

Разработан и применен новый вариант транспозон дисплея на основе рестриктазы *CspBI* и дополнительной рестриктазы с CG- или AT-богатыми сайтами узнавания. В качестве рестриктаз с CG-богатым сайтом узнавания использовали *SmaI* (ccc“!ggg) и *PdiI* (gcc“!ggc). Всего 2 варианта рестриктаз для 19 транспозонов. В итоге, подвергнуто анализу (2x19 МГЭ) = 38 вариантов праймерных комбинаций для 10 форм генотипов с апомиксисом и половым размножением. В качестве рестриктаз с AT-богатым сайтом узнавания использовали *VspI* (at“!taat), *SspI* (aat“!att) и *DraI* (ttt“!aaa). Всего 3 варианта рестриктаз для 19 транспозонов. В итоге, подвергнуто анализу (3x19 МГЭ) = 57 вариантов праймерных комбинаций для 10 форм генотипов с апомик-

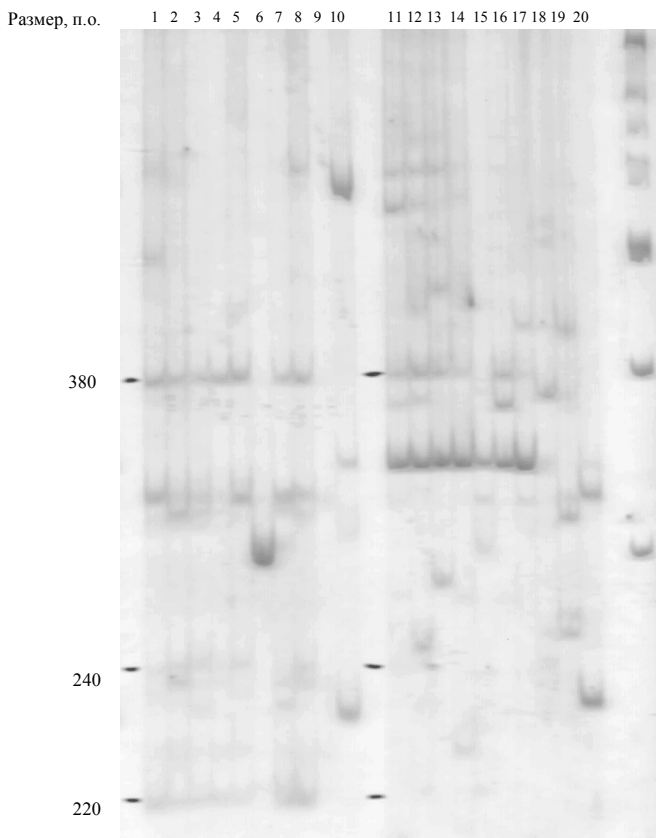


Рис. 1. Экспансия маркеров апомиксиса на основе *Cin4a* ретротранспозона среди представителей семейства *Brassicaceae*. Генотипы растительных форм приведены в табл. 1

сисом и половым размножением. Однако новых в сравнении с 2008 годом ассоциативных с апомиксисом комбинаций для АТ-богатых областей генома обнаружено не было.

Начато секвенирование обнаруженных в 2008 году молекулярных маркеров, ассоциированных с апомиксисом. Обнаружено сходство секвенированных ДНК фрагментов в GenBank+EMBL+DDBJ+PDB с разным количеством уже известных ДНК последовательностей. При этом гомология секвенируемых маркеров с известными последовательностями составляла от 85 до 100%.

Сформулированы предположения о возможных механизмах возникновения и экспансии маркеров апомиксиса в связи с типом размножения, уровнем плоидности и генетико-географическим происхождением боечер. Манифестация маркеров апомиксиса, видимо, не связана с уровнем плоидности боечер.

Выводы

1. С целью проверки выдвинутой ранее гипотезы о транспозонной природе апомиксиса исследовали генетический полиморфизм ДНК спектров у форм *Boechnera* с апомиксисом и амфимиксисом методом транспозон-дисплея. Разработан и применен новый вариант транспозон дисплея на основе рестриктазы CspBI и дополнительной рестриктазы с CG- или АТ-богатыми сайтами узнавания. Однако новых маркеров бесполосемянности обнаружено не было.

2. Исследована экспансия маркеров апомиксиса среди 20 представителей семейства *Brassicaceae*. Предварительные маркеры апомиксиса Cln4a+Vtat размером 220 п.о., 240 п.о. и Isaak+Vcaa размером 230 п.о. обнаружены только у форм *Boechnera* с бесполосемянным размножением.

3. Начато секвенирование обнаруженных в 2008 году молекулярных маркеров, ассоциированных с апомиксисом. Обнаружено сходство секвенированных ДНК фрагментов в GenBank+EMBL+DDBJ+PDB с разным количеством уже известных ДНК последовательностей. При этом гомология секвенируемых маркеров с известными последовательностями составляла от 85 до 100%.

Работа поддержана грантами РФФИ № 08-04-97011 p_поволжье_a и №08-04-97050 p_поволжье_a.

Литература

1. Ozias-Akins P. and van Dijk P.J. Mendelian genetics of apomixis in plants // Annu. Rev. Genet.— 2007.— V.41.— P. 509–537.

2. Naumova T.N.: van der Laak J., Osadtchiy J. et al. Reproductive development in apomictic populations of *Arabis holboellii* (*Brassicaceae*) // Sex Plant Reprod.— 2001.— V.14.— P. 195–200.

3. Gerashchenkov G., Rozhnova N. Genetic control of gametophytic apomixis: current status of knowledge // Proceedings of the Latvian Academy of Sciences. Section B.— 2004.— V.58., N5/6.— P. 167–174.

4. Gerashchenkov G., Rozhnova N., Gorbunova V., Timirkaeva A. The analysis of hormonal levels in top leaves and flower buds of the *Boechnera* accessions with asexual

(apomictic) and sexual (amphimictic) reproduction // Proceedings of the Latvian Academy of Sciences. Section B.— 2007.— V.61, N6.— P. 1–7.

Резюме

Разработан и применен новый вариант транспозон дисплея на основе рестриктазы Csp6I и дополнительной рестриктазы с CG- или AT-богатыми сайтами узнавания. Исследована экспансия выявленных маркеров апомиксиса в пределах семейства *Brassicaceae*. Гомология секвенированных маркеров с известными последовательностями составляла от 85 до 100%.

The new variant of the transposon display on the basis of Csp6I and additional restrictase with CG-or AT-rich sites of recognition is developed and applied. Expansion of the revealed markers of apomixis is investigated among some forms of *Brassicaceae*. Homology of sequenced markers with known sequences was from 85 up to 100%.

**ГОРБАЛЬ Л.О., ОСТАШ Б.О., РЕБЕЦЬ Ю.В., РАБИК М.В.,
МИРОНОВСЬКИЙ М.Л., ЦИПІК О.В., ГРОМИКО О.М., ОСТАШ І.С.,
ЛУЖЕЦЬКИЙ А.М.,* БЕХТОЛЬД А.,* ФЕДОРЕНКО В.О.**

*Львівський національний університет імені Івана Франка, Україна, 79005,
Львів, вул. Грушевського, 4*

**Альберт-Людвіг університет, Німеччина, 72076, Фрайбург,
вул. Стефана-Мейєра, e-mail: lidutko@yahoo.com*

МЕРЕЖІ ГЕНІВ, ЗАДІЯНИХ У РЕГУЛЯЦІЇ БІОСИНТЕЗУ ПОЛІКЕТИДНИХ АНТИБІОТИКІВ У СТРЕПТОМІЦЕТІВ

Вивчення механізмів регуляції вторинного метаболізму і морфогенезу актиноміцетів є однією з центральних проблем генетики та біотехнології мікроорганізмів. Це зумовлено здатністю цих бактерій продукувати широкий спектр біологічно активних сполук. Цікавими в цьому плані є штами *S. antibioticus* Tü6040, *S. aureofaciens* Tü117 та *S. globisporus* 1912 — продуценти полікетидних антибіотиків сімоциклінону D8, α -ліпоміцину і ландоміцину E відповідно (рис.). Усі ці антибіотики володіють антибактерійною активністю, а сімоциклінон D8 та ландоміцин E виявляють також цитостатичну активність щодо різних типів пухлинних клітин [3, 5, 8, 11]. Проведені нами дослідження дали змогу з'ясувати деякі нові аспекти генетичного контролю біосинтезу цих антибіотиків та розробити підходи до отримання їхніх надпродуцентів.

Регуляція біосинтезу сімоциклінону D8. У кластері генів біосинтезу сімоциклінону D8 *S. antibioticus* Tü6040 виявлено три регуляторні гени *simReg1*, *simReg2* і *simReg3*. Біоінформатичний аналіз амінокислотних послідовностей відповідних білків, свідчить про те, що вони кодують регулятори SARP-, TetR- і MarR-родин відповідно. Продукт гена *simReg1* є шлях-специфічним транскрипційним активатором. Його спрямоване руйнування в

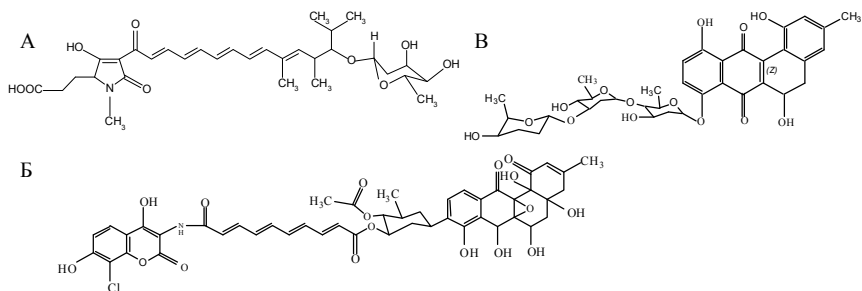


Рис. 1. Структура антибіотиків α -іпоміцину (А), сімоциклінону D8 (Б), ландоміцину Е (В)

хромосомі *S. antibioticus* Tü6040 призводить до припинення біосинтезу сімоциклінону D8, а уведення додаткових копій *simReg1* в штам дикого типу підвищує рівень продукції антибіотика [1]. Ми з'ясували, що білок SimReg1 активує експресію структурних генів біосинтезу сімоциклінону D8 і генів білків-експортерів SimEx1, SimEx2. Він також регулює експресію регуляторного гена *simReg3* і власного гена. Здатність SimReg1 взаємодіяти з ДНК, найбільш імовірно, регулюється кінцевим продуктом біосинтезу — сімоцикліноном D8. Білки SimReg2 і SimReg3 регулюють експресію генів стійкості, оскільки обидва мутанти і штами з додатковими копіями генів *simReg2* і *simReg3*, значно стійкіші до низки антибіотиків. Білок SimReg2 зв'язується з оператором гена *simEx1*, блокуючи його транскрипцію. Білки SimReg3 і SimReg2 можуть регулювати експресію одних і тих же генів, оскільки обидва здатні зв'язуватись із промоторними ділянками між генами *simReg2* і *simEx1*. Білок SimEx1 задіяний головно в експорті сімоциклінонів А і В. Узагальнивши отримані нами дані та дані літератури [7], ми запропонували гіпотетичну схему регуляції біосинтезу та експортування сімоциклінонів. Біосинтез та експортування сімоциклінону D8 у *S. antibioticus* Tü6040 — це координовані процеси. Білок SimReg1 активує експресію структурних генів біосинтезу сімоциклінону D8, генів, що кодують білки-транспортери SimEx1, SimEx2 і регуляторного гена *simReg3*. Як наслідок розпочинається біосинтез антибіотика. Коли концентрація сімоциклінону D8 і/або його попередників є низькою, експресія гена-транспортера *simEx1* репресується білком SimReg2. Сімоциклінон D8 і/або його попередники нагромаджуються в клітині. Коли внутрішньоклітинна концентрація сімоциклінонів С та D8 перевищує певний рівень, вони сприяють дисоціації SimReg2 від промотора гена *simEx1*. Білок SimReg1 зв'язується з цим промотором та підвищує транскрипцію гена *simEx1*. Так активується експортування сімоциклінонів із клітини. Коли концентрація сімоциклінону D8 у клітині збільшується до рівня, що є токсичним для клітини, антибіотик починає зв'язуватись із SimReg1, інактивуючи його. Внаслідок цього експресія структурних генів зменшується, а біосинтез сімоциклінону пригнічується.

Регуляція біосинтезу α -ліпоміцину. Кластер генів біосинтезу α -ліпоміцину містить п'ять регуляторних генів. Продукти генів *lipReg1* та *lipReg2* виявляють гомологію до регулятора та гістидин-кінази відповідно, *lipReg3* — до регулятора родини MarR, *lipReg4* — до білків родини LAL, *lipX1* — до РНКазі Sa-типу. Білок LipReg4 є шлях-специфічним активатором структурних генів біосинтезу α -ліпоміцину. Його інактивація блокує експресію структурних *lip*-генів та продукцію антибіотика. Білки LipReg1 та LipReg2 утворюють двокомпонентну систему. Їхнє руйнування призводить до зменшення продукції α -ліпоміцину, а надекспресія в штамі дикого типу спричиняє зростання продукції антибіотика в декілька разів. Беручи до уваги те, що в штамі DlipReg4, який не продукує α -ліпоміцину, гени *lipReg1* та *lipReg2* активно транскрибуються, ми припустили, що продукти цих генів не здатні безпосередньо регулювати експресію структурних *lip*-генів. Саме тому, ми вважаємо, що обидва білки є регуляторами вищого рівня і беруть участь у модуляції рівня біосинтезу α -ліпоміцину, підвищуючи експресію гена *lipReg4*. Білок LipReg3 є репресором експорту α -ліпоміцину. Руйнування *lipReg3* зумовлює зростання продукції ліпоміцину і експресії гена-експортера *lipEx1* і, як наслідок, може спричиняти посилений експорт α -ліпоміцину з клітин, імовірно, створюючи сприятливі умови для біосинтезу ліпоміцину. РНКазі LipX1 також задіяна в регуляції біосинтезу ліпоміцину. Руйнування *lipX1* зменшує рівень синтезу ліпоміцину, а його надекспресія в дикого типу під контролем конститутивного промотора P_{ErmE} спричиняє зростання біосинтезу антибіотика та накопичення його попередника дез-дегітокси- α -ліпоміцину. Отримані нами результати аналізу *in silico*, *in vitro* та *in vivo* дали можливість запропонувати імовірну модель регуляції біосинтезу α -ліпоміцину в штамі *S. aureofaciens* Tь117 [6]. Білок LipReg2 сприймає певні сигнали з зовнішнього середовища та передає їх на білок LipReg1 шляхом фосфорильовання. Білок LipReg1 у фосфорильованій формі є активним і може підвищувати транскрипцію гена *lipReg4*. Продукт гена *lipReg4* контролює експресію структурних *lip*-генів. Білок LipReg3 контролює кількість ліпоміцину шляхом пригнічення експресії *lipEx1*. РНКазі LipX1 також якимось чином задіяна в біосинтезі ліпоміцину, але механізм її впливу залишається не зрозумілим. Отже, *lip*-кластер містить групу генів, продукти яких взаємодіють між собою за принципом ієрархії і регулюють біосинтез ліпоміцину.

Регуляція біосинтезу ландоміцину E. У кластері генів біосинтезу ландоміцину E виявлено та вивчено функції чотирьох регуляторних генів, що кодуєть шлях-специфічний активатор LndI [9, 10], протеїназу Prx [4], сенсорну кіназу LndY та регулятор родини GntR — LndYR [2]. Білок LndI є транскрипційним активатором експресії структурних *lnd*-генів та власного гена. Уведення додаткових копій цього гена в штамі дикого типу приводить до зростання біосинтезу ландоміцину E в декілька разів. Ген *prx* кодує серинтреонінову протеїн-кіназу. Його руйнування призводить до зменшення продукції антибіотика в п'ять разів, а введення додаткових копій у штамі дикого типу підвищує продукцію ландоміцину. Ми припускаємо, що протеїназа Prx

здіяна в процесингу білків — продуктів структурних генів біосинтезу цього антибіотика. Продукт гена *lndYR* кодує білок, що належить до широко розповсюдженої в актиноміцетів YtrA-підродини регуляторів родини GntR. Руйнування цього гена в *S. globisporus* 1912 блокує споруючі та біосинтез ландоміцину, тоді як уведення додаткових його копій у штам дикого типу не викликає помітних змін. Результати експериментів *in vivo* та *in vitro* свідчать, що *lndYR* репресує експресію генів *lndW-lndW2*, які кодують АВС-транспортер. Він здатен зв'язуватись із промотором гена-регулятора *lndI*. Не виключено, що в штамі *S. globisporus* є й інші гени-мішені білка *lndYR*, оскільки відомо, що регулятори підродини YtrA контролюють транспортні процеси пов'язані з метаболізмом вуглеводів. Гетерологічна експресія гена *lndYR* в штаммах *S. coelicolor*, *S. ghanensis* та *S. siوياensis* викликає зміни в біосинтезі вторинних метаболітів і морфогенезі, які залежать від умов культивування, а саме джерел живлення. Отже, *lndYR* є одним із плейотропних регуляторів, що, імовірно, слугують містком між первинним і вторинним метаболізмом у *S. globisporus*.

Використання сконструйованого нами модифікованого транспозона Tn5, що містить два конститутивних промотори P_{ErmE} та P_{lcr'}, дало можливість виявити низку нових генів, продукти яких задіяні в споруючій і/або біосинтезі ландоміцину E в штамі *S. globisporus*, а також в окремих випадках “увімкнути”, або підвищити експресію деяких генів, оскільки інтегруючись в певну ділянку хромосоми він вносить два конститутивні промотори. Серед ідентифікованих генів — сім нових регуляторів, білкові продукти яких належать до протеїн-кіназ, або родин білків MarR, LuxR, GntR та ROK, та прямо, або опосередковано беруть участь у регуляції біосинтезу ландоміцину E. Це свідчить про те, що біосинтез ландоміцину E контролюється не лише тими регуляторними генами, що знайдені безпосередньо в *lnd*-кластері, а й низкою інших регуляторів, гени яких розташовані поза класером.

Література

1. Горбаль Л.О., Ребець Ю.В., Лужецький А.М., Бехтольд А., Федоренко В.О. Регуляція біосинтезу сімоциклінону у штамі *Streptomyces antibioticus* Ть6040 за участю гена *simReg1* // Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології: Зб. наук. пр.— 2007.— С. 343–347.
2. Цулік О., Остап Б., Федоренко В. Гени *lndY* та *lndYR*, що кодують імовірно двокомпонентну регуляторну систему у *Streptomyces globisporus* 1912 // Молодь і поступ в біології: V міжнар. конф. студ. аспір. (Львів, 12–15 травня 2009 р.): тези доп.— Л., 2009.— С. 150–151.
3. Bihlmaier C., Welle E., Hofmann C., Welzer K., Vente A., Breiting E., Müller M., Glaser S., Bechthold A. Biosynthesis of the acyclic polyene antibiotic lipomycin in *Streptomyces aureofaciens* Ть117 // Antimicrobiol. Agents Chemother.— 2006.— Vol.50.— P. 2113–2121.
4. Dutko L., Rebets Yu., Ostash B., Luzhetskyy A., Bechthold A., Nakamura T., Fedorenko V. A putative proteinase gene is involved in regulation of landomycin E biosynthesis in *Streptomyces globisporus* 1912 // FEMS Microbiol. Lett.— 2006.— Vol.255.— P. 280–285.

5. Flatman R., Howells A., Heide L., Fiedler H-P., Maxwell A. Simocyclinone D8, an inhibitor of DNA gyrase with a novel mode of action // *Antimicrob. Agents Chemother.*— 2005.— Vol.49.— P. 1093–1100.
6. Horbal L., Rebets Y., Rabyk M., Luzhetskyy A., Ostash B., Welle E., Nakamura T., Fedorenko V., Bechthold A. Characterization and analysis of the regulatory network involved in control of lipomycin biosynthesis in *Streptomyces aureofaciens* Tь117 // *Appl. Microbiol. Biotechnol.*— 2009.— Vol.85.— P. 1069–1079.
7. Le T., Fiedler H-P., den Hengst C., Ahn S., Maxwell A., Buttner M. Coupling of the biosynthesis and export of the DNA gyrase inhibitor simocyclinone in *Streptomyces antibioticus* // *Mol. Microbiol.*— 2009.— Vol.72.— P. 1462–1474.
8. Ostash B., Korynevskaya A., Stoika R., Fedorenko V. Chemistry and biology of landomycins, an expanding family of polyketide natural products // *Medical Chem.*— 2009.— Vol.9.— P. 1040–1051.
9. Rebets Yu., Ostash B., Luzhetskyy A., Hoffmeister D., Brana A., Mendez C., Salas J.A., Bechthold A., Fedorenko V. Production of landomycins in *S. globisporus* and *S. cyanogenus* S136 is regulated by genes encoding putative transcriptional activators // *FEMS Microbiol. Lett.*— 2003.— Vol.194.— P. 10965–10971.
10. Rebets Yu., Ostash B., Luzhetskyy A., Kushnir S., Fukuhara M., Bechthold A., Nashimoto M., Nakamura T., Fedorenko V. DNA-binding activity of LndI protein and temporal expression of the gene that upregulates landomycin E production in *Streptomyces globisporus* 1912 // *Microbiol.*— 2005.— Vol.151.— P. 281–290.
11. Sadig A., Patel M., Jacobson B., Escobedo M., Ellis K., Oppegard L., Hiasa H., Kratzke R. Anti-proliferative effects of simocyclinone D8 (SD8), a novel catalytic inhibitor of topoisomerase II // *Invest New Drugs.*— 2009.— Vol.28.— P. 20–25.

Резюме

З використанням методів аналізу *in silico*, спрямованого мутагенезу, надекспресії, вивчення рухливості ДНК-білкових комплексів та аналізу експресії генів досліджено функції генів, що регулюють біосинтез сімоциклінону D8, α -ліпоміцину і ландоміцину E. Встановлено, що вивчені регулятори можуть взаємодіяти за принципом ієрархії. Показано наявність тісного взаємозв'язку між регуляцією біосинтезу антибіотиків, їхнім транспортуванням, стійкістю до антибіотиків, а також первинним метаболізмом.

С использованием методов анализа *in silico*, направленного мутагенеза, сверхэкспрессии, изучения подвижности ДНК-белковых комплексов и анализа экспрессии генов исследованы функции генов, регулирующих биосинтез симоциклинона D8, α -липомидина и ландомицина E. Установлено, что изученные регуляторы могут взаимодействовать по принципу иерархии. Показано наличие тесной взаимосвязи между регуляцией биосинтеза антибиотиков, их транспортом, устойчивостью к антибиотикам, а также первичным метаболизмом.

In silico analysis, site-directed mutagenesis, overexpression, gel-mobility shift assay and analysis of the genes expression let us establish functions of the regulatory genes involved in the biosynthesis of simocyclinone D8, α -lipomycin and landomycin E. It has been shown that these regulators can interact with the principle of hierarchy. The close relationship between the regulation of the biosynthesis of antibiotics, their transport, resistance to antibiotics and primary metabolism has been proved.

**ЖУКОВ В.А., НЕМАНКИН Т.А., ОВЧИННИКОВА Е.С., КУЗНЕЦОВА Е.В.,
ЖЕРНАКОВ А.И., ТИТОВ В.С., ГРИШИНА О.А., СУЛИМА А.С.,
БОРИСОВ Я.Г., БОРИСОВ А.Ю., ТИХОНОВИЧ И.А.**

*ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной
микробиологии Россельхозакадемии,*

Россия, 196608, Санкт-Петербург, Пушкин, ш. Подбельского, 3,

e-mail: zhukoff01@yahoo.com

СОЗДАНИЕ СЕРИИ ГЕН-СПЕЦИФИЧНЫХ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ ДЛЯ СРАВНИТЕЛЬНОГО КАРТИРОВАНИЯ ГЕНОМОВ ГОРОХА ПОСЕВНОГО (*PISUM SATIVUM* L.) И ДИПЛОИДНОЙ ЛЮЦЕРНЫ (*MEDICAGO TRUNCATULA* GAERTN.)

Неотъемлемой частью изучения генетического контроля биологических процессов в настоящее время является клонирование ключевых генов, отвечающих за протекание этих процессов, осуществляемое обычно на основании генетического картирования. Генетическое картирование базируется на методах классической генетики — определении групп сцепления и частот рекомбинации, и основным его инструментом в настоящее время являются молекулярные маркеры, выявляющие полиморфизм в геномной ДНК или в белковых продуктах генов. Особое значение для сравнительного картирования, то есть сопоставления генетических и/или физических карт различных видов растений, имеют маркеры, создаваемые на основе последовательностей генов (Zhukov et al., 2007).

Среди бобовых растений подробные генетические карты создаются как для модельных видов (лядвенец японский *Lotus japonicus* (Regel.) Larsen и диплоидная люцерна *Medicago truncatula* Gaertn.), так и для сельскохозяйственно-ценных (горох *Pisum sativum* L., фасоль *Phaseolus vulgaris* L., бобы *Vicia faba* L., соя *Glycine max* (L.) Merr., арахис *Arachis hypogaea* L. и др.) (см. ресурс Интернет www.comparative-legumes.org). В настоящее время также развернуты международные программы по секвенированию геномов лядвенца японского и диплоидной люцерны (см. <http://www.kazusa.or.jp/lotus/> и <http://www.medicago.org/genome/>, соответственно). Благодаря сходной организации геномов бобовых растений, эти достижения могут быть использованы для создания маркеров, поиска генов и их позиционного клонирования у культурных бобовых (Young, Udvardi, 2009).

Горох посевной является одной из важнейших сельскохозяйственных культур мира после сои и фасоли (согласно данным FAOSTAT <http://faostat.fao.org>). Для некоторых генотипов гороха продемонстрировано увеличение семенной продуктивности и качества продукции под влиянием взаимодействия с почвенными микроорганизмами (Штарк и др., 2006). По этой причине изучение процессов развития симбиотических взаимоотношений гороха с почвенной микрофлорой представляется важным как для фундаментальной науки, так и для современного растениеводства. На горохе получено более 100 мутантов с нарушениями развития взаимовыгодных симбиозов

(Борисов и др., 2007), и изучение генов, несущих мутации, должно способствовать выявлению детальных механизмов контроля развития симбиотических систем.

Для определения нуклеотидных последовательностей ключевых симбиотических генов гороха, затронутых мутациями, можно использовать методологию сравнительной геномики бобовых растений. Картирование мутантных генов в геноме гороха при этом необходимо проводить с помощью ген-специфичных молекулярных маркеров. Одним из наиболее подходящих вариантов таких маркеров являются маркеры типа CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence), основанные на амплификации фрагмента определенного гена и специфичного расщепления только одной из его аллелей определенной эндонуклеазой рестрикции (Konieczny, Ausubel, 1993). Преимуществами использования ген-специфичных CAPS-маркеров являются: 1) возможность создания маркеров на основе известных генов гороха или других бобовых, например, диплоидной люцерны; 2) возможность сравнения построенных генетических карт с физической картой генома диплоидной люцерны; 3) использование одного набора праймеров для анализа скрещиваний между различными линиями гороха.

Данная работа направлена на создание серии ген-специфичных молекулярных маркеров для картирования симбиотических генов гороха и сравнения полученных карт с физической картой генома диплоидной люцерны.

Материалы и методы

Методология: Для создания маркеров были использованы последовательности генов гороха с известной локализацией в геноме (описание генов и последовательности праймеров приведены в работах Aubert et al., 2006; Zhukov et al., 2007). Фрагменты генов были амплифицированы и секвенированы у серии линий гороха, затем на основании анализа полиморфизма были определены эндонуклеазы рестрикции, позволяющие различать аллельные состояния маркера. Маркеры были картированы на выборках F_2 (SGEFix-1×NGB1238) и F_2 (RisFixV×NGB1238), и позиции гомологичных им генов были определены в геноме диплоидной люцерны.

Молекулярно-биологические процедуры: Геномную ДНК из растений гороха выделяли с использованием буфера СТАВ по модифицированному протоколу Rogers, Bendich, 1985; ПЦР проводили в термоциклерах iCycler™ (Bio-Rad, США) и Personal Cycler (Biometra, Германия). Секвенирование осуществляли на автоматическом приборе CEQФ 8000 Genetic Analysis System (Beckman Coulter, США) по протоколу производителя. Праймеры были синтезированы компанией “Евроген”, Москва, Россия. Анализ рестриционных фрагментов проводили в 3% агарозном геле.

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

— данные по секвенированию нуклеотидных последовательностей обрабатывали с помощью программного обеспечения автоматического

секвенатора CEQФ 8000 Genetic Analysis System (Beckman Coulter, США). В программах Multalin (<http://bioinfo.genopole-toulouse.prd.fr/multalin/multalin.html>) и ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) проводили множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей;

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

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

— определение позиций генов, гомологичных использованным маркерам, в геноме диплоидной люцерны, проводили по алгоритму BLAST на сайте http://www.medicago.org/genome/cvit_blast.php.

Результаты и обсуждение

Фрагменты последовательностей генов можно использовать в качестве молекулярных маркеров лишь в случае наличия полиморфизма в пределах данного фрагмента, так как для генетического анализа необходимо различать их аллельные состояния. Вероятность обнаружения полиморфизма закономерно возрастает при сравнении генетически удаленных линий. Набор ген-специфичных маркеров планируется использовать для картирования симбиотических мутаций гороха, полученных на 5 линиях (Finale, Frisson, Rondo, SGE и Sparkle), поэтому на первом этапе работы были выявлены оптимальные партнеры для скрещивания с указанными линиями. Для этого фрагменты 14 генов были амплифицированы и секвенированы у упомянутых линий, а также у линий J115, NGB1238, NGB2715, NGB851 и RT9. Анализ последовательностей 10 генов, продемонстрировавших полиморфизм, позволил построить кладограммы, соответствующие генетической удаленности использованных линий, и выделить три группы линий: 1) Finale, Frisson, Rondo; 2) NGB2715, RT9, SGE; 3) J115, NGB1238, NGB851, Sparkle. Таким образом, можно рекомендовать для скрещиваний и последующего генетического анализа линии из разных групп, поскольку в таком случае полиморфизм в последовательностях генов, используемых в качестве молекулярных маркеров, будет наблюдаться наиболее часто.

Для картирования симбиотических генов гороха *Sym40* и *Sym42* линии гороха SGEFix-1 (*sym40*) и RisFixV (*sym42*) были скрещены с линией NGB1238, генетически удаленной от линий, на которых были получены указанные мутанты (SGE и Finale, соответственно). На геномной ДНК линий SGEFix-1 (*sym40*), RisFixV (*sym42*) и NGB1238 (“дикий тип”) были амплифицированы и секвенированы фрагменты 59 генов гороха, которые были использованы в качестве маркеров в случае обнаружения полиморфизма.

На выборке F_2 (SGEFix-1 x NGB1238) из 61 растения, 37 из которых являются рецессивными гомозиготами по *sym40*, к настоящему моменту картировано 19 ген-специфичных молекулярных маркеров, покрывающих

4 из 7 групп сцепления гороха. Сцепления с геном *Sym40* обнаружено не было, что свидетельствует о его вероятной локализации в 4, 6 или 7-ой группе сцепления. На выборке F_2 (RisFixV x NGB1238) из 96 растений, 14 из которых гомозиготны по *sym42*, к настоящему моменту картировано 12 маркеров из 5 групп сцепления, однако сцепления с геном *Sym42* также пока не обнаружено. Таким образом, для картирования генов *Sym40* и *Sym42* необходимо увеличение числа анализируемых маркеров, что, в свою очередь, вызывает необходимость вовлечения в работу дополнительного количества генов гороха.

Порядок следования маркеров в группах сцепления, а также расстояния между ними, определенные в результате проведенного компьютерного анализа, соответствуют литературным данным (Aubert et al., 2006), что подтверждает состоятельность используемых методик. Для всех использованных маркеров путем анализа физической карты генома диплоидной люцерны были определены позиции гомологичных им генов *M. truncatula*. Маркеры, демонстрировавшие сцепление у гороха, также локализуются на небольшом расстоянии друг от друга на физической карте генома люцерны, и порядок их следования дополнительно подтверждает синтению геномов гороха и люцерны. Тем не менее, некоторые гены являются исключениями из данного правила, и их локализация на физической карте *M. truncatula* не соответствует локализации на генетической карте гороха.

Для полного покрытия генетической карты гороха ген-специфичными молекулярными маркерами в настоящее время ведется работа по созданию новых маркеров на основе последовательностей генов диплоидной люцерны. Локализация создаваемых маркеров также будет определена с использованием выборок F_2 (SGEFix-1 x NGB1238) и F_2 (RisFixV x NGB1238), что в дальнейшем позволит картировать симбиотические гены гороха *Sym40* и *Sym42*. Использование для картирования ген-специфичных молекулярных маркеров делает возможным последующий поиск генов-кандидатов и секвенирование генов гороха *Sym40* и *Sym42*.

Выводы

В работе созданы ген-специфичные молекулярные маркеры, картированные в геноме гороха посевного с использованием выборок F_2 (SGEFix-1 x NGB1238) и F_2 (RisFixV x NGB1238). Позиции генов, гомологичных указанным маркерам, определены на физической карте генома диплоидной люцерны с использованием анализа по алгоритму BLAST. Это позволяет создавать новые ген-специфичные маркеры на основе генов люцерны, локализованные в областях генома гороха с небольшим количеством известных генов.

Секвенированные последовательности 10 генов гороха посевного могут быть использованы для генотипирования линий Finale, Frisson, Rondo, SGE и Sparkle (и симбиотических мутантов, полученных на этих линиях), а также линий JI15, NGB1238, NGB2715, NGB851 и RT9.

В целом, создаваемый набор маркеров является ценным инструментом для картирования генов гороха и последующего их клонирования с использо-

ванием достижений генетики и геномики модельного бобового растения *Medicago truncatula*.

Работа поддержана грантами РФФИ (09-04-00907, 09-04-13895, 09-04-91054, 09-04-91293, 10-04-00961, 10-04-01146), NWO 047.018.001, грантом Президента России (НШ-3440.2010.4); при поддержке Министерства образования и науки (Государственные контракты № 02.512.11.2280, 02.740.11.0276).

Литература

1. Борисов А.Ю., Васильчиков А.Г., Ворошилова В.А., Данилова Т.Н., Жернаков А.И., Жуков В.А., Королева Т.А., Кузнецова Е.В., Мадсен Л., Мофетт М., Неманкин Т.А., Павлова З.Б., Петрова Н.Э., Пинаев А.Г., Радутюу С., Розов С.М., Соловов И.И., Топунов А.Ф., Уиден Н.Ф., Цыганов В.Е., Штарк О.Ю., Стоугард Й., Наумкина Т.С., Тихонович И.А. Регуляторные гены гороха посевного (*Pisum sativum* L.), контролирующие развитие азотфиксирующих клубеньков и арбускулярной микоризы: фундаментальные и прикладные аспекты.— Прикладная биохимия и микробиология.— 2007.— Т.43, №3.— С. 265–271.

2. Штарк О.Ю., Данилова Т.Н., Наумкина Т.С., Васильчиков А.Г., Чеботарь В.К., Казаков А.Е., Жернаков А.И., Неманкин Т.А., Прилепская Н.А., Борисов А.Ю., Тихонович И.А. Анализ исходного материала гороха посевного (*Pisum sativum* L.) для селекции сортов с высоким симбиотическим потенциалом и выбор параметров для его оценки.— Экологическая генетика.— 2006.— Т.4, №2.— С. 22–28.

3. Aubert G., Morin J., Jacquin F., Loridon K., Quillet M.C., Petit A., Rameau C., Lejeune-Henaut I., Huguet T., Burstin J. Functional mapping in pea, as an aid to the candidate gene selection and for investigating synteny with the model legume *Medicago truncatula*.— Theor. Appl. Genet.— 2006.— V.112, N6.— P. 1024–1041.

4. Konieczny A., Ausubel F.M. A procedure for mapping *Arabidopsis* mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers.— Plant J.— 1993.— V.4, N2.— P. 403–410.

5. Rogers S.O., Bendich A.J. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues.— Plant Mol. Biol.— 1985.— V.5.— P. 69–76.

6. Young N.D., Udvardi M. Translating *Medicago truncatula* genomics to crop legumes.— Curr. Opin. Plant Biol.— 2009.— V.12, N2.— P. 193–201.

7. Zhukov V.A., Kuznetsova E.V., Ovchinnikova E.S., Rychagova T.S., Titov V.S., Pinaev A.G., Borisov A.Y., Moffet M., Domoney C., Ellis T.H.N., Ratet P., Weeden N.F., Tikhonovich I.A. Gene-based markers of pea linkage group V for mapping genes related to symbioses.— Pisum Genetics.— 2007.— V.39.— P. 10–20.

Резюме

В настоящей работе была создана серия ген-специфичных молекулярных маркеров, предназначенных для картирования генов гороха посевного и создания предпосылок для их клонирования на основе синтении геномов гороха и диплоидной люцерны.

In this work, the set of gene-based molecular markers had been created, destined for mapping garden pea genes and for arrangement of conditions for gene cloning on the base of synteny of pea and barrel medic genomes.

КАВАЙ-ООЛ У.Н.¹, ЕЖОВА Т.А.²

¹Тувинский государственный университет

Россия, 667000, Кызыл, ул. Ленина, д.36, e-mail: dr.urana@mail.ru,

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,

Москва, 119992, Воробьевы горы, д. 1, стр. 12, e-mail: ezhova2001@mail.ru

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ГЕНОВ *ABRUPTUS/PINOID* И *APETALA2* В РЕГУЛЯЦИИ РАЗВИТИЯ ЦВЕТКА *ARABIDOPSIS THALIANA*

Развитие цветка контролируется сложной системой взаимодействующих генов и физиологических факторов. Важную роль в инициации развития меристемы цветка *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. играет ген *ABRUPTUS/PINOID1* (*ABR/PID1*), регулирующий полярный транспорт ауксина (ПТА). Ген *ABR/PID1* кодирует серин-треониновую протеинкиназу, которая участвует в обеспечении локализации на мембране клетки белка PIN1, выносящего ауксин из клетки [1–2]. Мутации в гене *ABR/PID1* приводят к нарушению ПТА в растениях и изменению многих признаков [3–5]. Одна из мутаций *abruptus* (*abr*) получена на кафедре генетики МГУ. Она приводит к температурозависимой инактивации гена *ABR/PID1*: при повышенной температуре (27–29 °С) растения формируют цветонос, который похож на булавку и на котором либо нет цветков, либо развиваются единичные стерильные цветки аномальной морфологии. При 21–24 °С растения фертильны. Цветки имеют небольшие чашелистики, крупные многочисленные лепестки, число которых достигает 10 (в среднем 5,4, вместо 4-х у дикого типа), тычинки и пестик (рис. 1, а, б). Цветонос таких растений после развития 8–12 цветков также

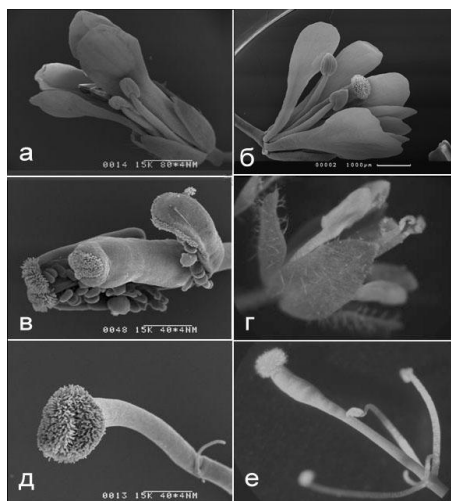


Рис. 1. Морфология цветков растений дикого типа (а), одиночных мутантов *abr* (б), *vaf2* (в), *ap2-1* (г) и двойных мутантов *abr vaf2* (д) и *abr ap2* (е)

терминируется булавковидной структурой. Фенотип мутанта свидетельствует о важной роли ПТА в контроле морфогенеза цветка как на самых ранних этапах детерминации и развития флоральной меристемы (ФМ), так и при образовании флоральных органов. [7].

Аномалии в развитии цветка мутанта *abr* могут быть результатом изменения активности гомеозисных генов, которые определяют тип органа цветка и запускают программы дифференцировки флоральных органов. Ген *APETALA2* (*AP2*), продуктом которого является транскрипционный фактор, вместе с геном *APETALA1* (*API*) контролирует развитие органов околоцветника. Целью данной работы являлось изучение взаимодействия генов *AP2* и *ABR/PID1* в контроле развития органов околоцветника. В работе приведены результаты сравнительного анализа морфологии растений одиночных и двойных мутантов с разным уровнем активности генов *AP2* (*vaf2* — жесткая аллель, *ap2-1* — мягкая аллель) и *ABR*, а также результаты изучения уровня экспрессии генов *AP2* в растениях дикого типа и мутантах *abr*.

Материалы и методы

Растительный материал и условия выращивания. В работе использовали растения мутанта *abr* (линия К-150), *vaf2* (К-217) и расы дикого типа Dijon-M (К-1), а также растения мутанта *ap2-1* (*mm4*) из коллекций кафедры генетики МГУ им. М.В. Ломоносова и г. Гатерслебен (Германия). Растения выращивали в условиях теплицы и на агаризованной среде Квитко в лабораторных установках. Двойные мутанты *abr vaf* и *abr ap2-1* выделяли среди растений в поколениях F₂ и F₃ от скрещиваний мутанта *abr* с растениями *vaf2* и *ap2-1*.

Морфометрия. Для анализа морфологии цветков использовали критерии, принятые ранее для *A.thaliana*. Среднее число органов цветка рассчитывали для 10-ти цветков, базально-расположенных на главном цветоносе (с 1-го по 10-й цветки). Съёмки растений проводили цифровыми фотоаппаратами фирм “Minolta” (USA) и “Casio” QV-4000 (Japan).

Сканирующее электронное микроскопирование. Исследование органов и тканей растений проводили с помощью аналитического сканирующего электронного микроскопа JSM-6380LA (Jeol, Japan) и СЭМ S-405A (Hitachi, Japan). Материал фиксировали в 4% глютаральдегиде в 0,025M фосфатном буфере (pH 7.0) при 4 °C в течение 18 часов. Затем образцы опускали в 2%-ный осмий (OsO₄) (на ночь), три раза промывали фосфатным буфером, обезвоживали серией спиртов возрастающей концентрации (30, 50, 70% не более 10–15' и 80 и 96% по 2 раза 30') и переносили далее в 100%-ный ацетон на 30'. Материал высушивали проведением возгонки жидкой фазы в газобразную, под высоким давлением и температуре. Структуры прикрепляли к столикам и напыляли смесью палладия и платины в ионном напылителе IB-3 (Eiko, Japan) слоем 15 нм.

Анализ транскрипции гена AP2. Уровень транскрипции *AP2* оценивали с помощью метода ПЦР в реальном времени (ОТ-ПЦР-РВ). Для выделения РНК использовался RNA Easy KIT фирмы QIAGEN с дополнительной

обработкой ДНКазой с помощью RNase-Free DNase Set (Qiagen, Germany). Обратную транскрипцию проводили с использованием набора cDNA Synthesis Kit (first strand) с 15T праймером (Silex, Russia). ОТ-ПЦР-ПВ проводили на приборе АНК-32 (Syntol, Russia), с использованием наборов “Комплект реагентов для проведения ПЦР-ПВ в присутствии EVA Green” (Syntol, Russia). В качестве внутреннего контроля использовали ген *EF1* (фактор элонгации), который характеризуется конститутивной экспрессией в растениях *A. thaliana*. Последовательность праймеров для амплификации кДНК *AP2* (праймер 1: ACAGTCCCAAATATGAGATTCCCATC; праймер 2: AGGATTCCCTGATGACTCGGCATT) и *EF1* (праймер 1: TTGCTGTTGTAACAAGTGGATGC; праймер 2: AAGATTGGTGGTATTGGAACGG). Анализ проводили в 3-х повторностях.

Результаты и обсуждение

Для анализа генных взаимодействий использовали две мутации в гене *AP2* с разной степенью экспрессивности мутантного признака. Мутация *vaf* приводила к формированию цветков с существенно сниженным числом органов и изменениями типа органов в разных мутовках. Вместо 4-х чашелистиков в наружной мутовке формировались в основном плодолостики с семяпочками по краям и рыльцевой тканью на верхушке (в среднем 3,1), лепестки во II-ой мутовке чаще отсутствовали (рис. 1, в). В III мутовке развивались тычинки, число которых резко уменьшено (1.3) по сравнению с диким типом (5.6). Пестики имели нормальное строение (2 плодолостика). Вторая мутация *ap2-1* характеризуется заменой чашелистиков на листья (4,0). Во II мутовке вместо нормальных тычинок развиваются лепестко-тычинки (4,0), т.е. органы, которые по форме напоминают тычинку, но вместо пыльников на тычиночной нити формируются ткани лепестка (рис. 1, г). Число и тип органов III и IV мутовок не изменены. Интересно, что в отличие от других суровых аллелей,— мутация *vaf* вела себя, как рецессивная по сравнению с мягкой аллелью (гибриды F_1 имели фенотип *ap2-1*).

Главной особенностью двойных мутантов *abr vaf2* и *abr ap2-1* было отсутствие (в цветках апикальной части цветоноса) или существенная редукция (цветки базальной части цветоноса) органов околоцветника и III круга тычинок (рис. 1, д, е). Апикально расположенные цветки состояли из одних пестиков, имеющих морфологические особенности (палочковидный пестик) мутанта *abr*. Цветки базальной части цветоноса двойных мутантов *abr vaf2* изредка формировали тычинки (0,2 на цветок). Цветки *abr ap2-1* в I мутовке формировали в среднем 2 органа, которые были представлены либо листьями (25%), либо филаментами (16%), либо листоподобными плодолостиком (59%). Органы второго круга отсутствовали, а число тычинок (III мутовка) и плодолостиков (IV мутовка) было таким же, как у мутанта *abr 3,7* и 0,4, соответственно. У обоих двойных мутантов верхушки цветоносов оканчивались булавковидной структурой, как у мутанта *abr*.

Таким образом, морфология цветков двойных мутантов показывает существенные отличия от родительских форм. Основной особенностью обоих

двойных мутантов является редукция (полная или частичная) органов наружной мутовки. Этот фенотип свидетельствует о комплементарном взаимодействии доминантных аллелей дикого типа генов *AP2* и *ABR/PID1* в контроле развития органов околоцветника. По-видимому, при развитии чашечки и венчика ген *AP2* определяет тип органа I и II мутовок, а ген *ABR/PID1* — положение и размер органов. Согласно предсказаниям математической модели, описывающей развитие цветка *A.thaliana* [8], определение типа органов цветка предшествует разметке их будущих позиций. Можно предполагать, что отсутствие нормальных продуктов генов *AP2* и *ABR/PID1*, приводящее к нарушению обоих процессов, вызывает редукцию околоцветника у двойного мутанта.

Нами был проведен также анализ уровня транскрипции гена *AP2* в цветках растений дикого типа и мутанта *abr* методом ОТ-ПЦР в реальном времени. Установлено, что уровень транскрипции *AP2* в цветках мутанта превышает таковой в растениях дикого типа почти в 2 раза. Возможно, что усиление транскрипции нормальной аллели *AP2* в цветках мутанта *abr* может вызывать образование большого числа лепестков у одиночного мутанта *abr*. В цветках двойных мутантов восстановления образования лепестков не происходит, т.к. усиление транскрипции мутантных аллелей не может вызвать нормализацию определения типа органов.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ и Научные Школы.

Литература

1. Christensen S.K., Dagenais N., Chory J. et al. Regulation of Auxin Response by Protein Kinase PINOID // *Cell*. 2000. V.100. P. 469–478.
2. Friml J., Yang X., Michniewicz M. et al. A PINOID dependent binary switch in apical-basal PIN polar targeting directs auxin efflux // *Science*. 2004. V.306. P. 862–865.
3. Bennet S.R.M., Alvares J., Bossinger G., Smyth D.R. Morphogenesis in *pinoid* mutants of *Arabidopsis thaliana* // *Plant J*. 1995. V.8. P. 505–520.
4. Калинина А.Ю., Ежова Т.А., Голубева Н.В. и др. Полярный транспорт ауксина у мутанта *abruptus Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. // Вестник СпбГУ. 2000. Сер.3. Вып.1. №3. С. 44–51.
5. Ежова Т.А., Солдатова О.П., Калинина А.Ю. и др. Взаимодействие генов *ABRUPTUS/PINOID* и *LEAFY* в процессе флорального морфогенеза у *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. // Генетика. 2000. Т.36. №12. P. 1–6. (Ezhova T.A., Soldatova O.P., Kalinina A.Yu. Interactions between the *ABRUPTUS/PINOID* and *LEAFY* genes during floral morphogenesis in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. // *Rus. J. Genetics*. 2000. V.36. №12. P. 1418–1422).
6. Benjamins R., Quint A., Weijers D. et al. The PINOID protein kinase regulates organ development in *Arabidopsis* by enhancing polar auxin transport // *Development*. 2001. V.128. P. 4057–4067.
7. Ежова Т.А., Ондар У.Н., Солдатова О.П., Кузнецова Т.А. Изучение роли гена *ABRUPTUS* в дифференцировке цветоносов у *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. // Доклады Акад. наук. 1997. Т.354. №6. С. 839–842.
8. Скрябин К.Г., Алексеев Д.В., Ежова Т.А. и др. Определение типа и положения органов цветка: динамическая модель развития // Известия АН. Серия биол. 2006. №5.

9. Скрябин К.Г., Алексеев Д.В., Ежова Т.А. и др. Определение типа и положения органов цветка: динамическая модель развития // Известия АН. Серия биол. 2006. №6. С. 645–659.

Резюме

Приведены результаты анализа морфологии растений одиночных мутантов *abr* и *vaf2* и *ap2-1*, двойных мутантов *abr vaf* и *abr ap2-1*, а также результаты изучения уровня экспрессии гена *AP2* в цветках растений дикого типа и мутанта *abr*. Установлено, что при развитии околоцветника гены *AP2* и *ABR/PID1* комплементарно взаимодействуют. Показано увеличение уровня транскрипции гена *AP2* в цветках мутанта *abr*.

We have studied the morphology of single mutants *abr*, *vaf2*, *ap2-1* and double mutants *abr vaf* and *abr ap2-1*, and also the level of *AP2* gene transcription in wild type and *abr* mutant flowers. It is established that *ABR* and *ABR/PID1* genes complementary interact in regulating perianth development. The increasing level of *AP2* transcription was demonstrated in *abr* mutant flowers.

КАМЫШ Н.А., МИХАЙЛОВА М.Е., ВОЛЧОК Н.М., ТИХАНОВИЧ Н.И.

ГНУ “Институт генетики и цитологии НАН Беларуси”,
Республика Беларусь, 220027, г. Минск, ул. Академическая, 27,
e-mail: M.Mikhailova@igc.bas-net.by

ИССЛЕДОВАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ ПОПУЛЯЦИЙ СВИНЕЙ ПО ГЕНУ РИАНОДИНОВОГО РЕЦЕПТОРА *RYR1*, АССОЦИИРОВАННОМУ С ПОВЫШЕННОЙ СТРЕССЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬЮ

Новые достижения в области биотехнологий дают возможность для качественно новых подходов в селекции свиней. По статистическим данным около половины всего изготовленного в мире мяса занимает свинина. Значительный спрос на постную свинину привел к разработке селекционных программ, направленных на выведение пород животных, характеризующихся высокой мясностью.

В то же время интенсивная селекция свиней на мясность привела к нежелательным тенденциям — ослаблению природной устойчивости, ухудшению качества мяса и увеличению стрессчувствительности (PSS-синдром). Под действием стрессовых факторов, таких как перегрев, скученность, транспортировка, избежать которых в условиях животноводческого комплекса очень трудно, у животных развивается злокачественный гипертермический синдром (MHS — Malignant Hyperthermia Syndrome), наблюдается резкое снижение рН на фоне высокой температуры тела (38–40 °С), что приводит к гибели животных. У таких свиней после убоя происходят быстрые биохимические изменения в скелетной мускулатуре, в результате чего образуется так назы-

ваемое PSE-мясо (бледная, водянистая, рыхлая свинина с кислым привкусом) или наоборот, темная, сухая, жесткая, волокнистая свинина — DFD) [1].

PSS — это генетически обусловленная аномалия, имеет аутосомно-рецессивный тип наследования. Ранее для выявления стрессчувствительности животных использовали галотановый тест [1–3]. Определить наличие мутантного аллеля с помощью этого теста можно только для животных, являющихся рецессивными гомозиготами по RYR-гену, поэтому выбраковка галотан-положительных свиней с целью элиминации дефективного аллеля из популяции неэффективна [4].

MacLennan et al. (1990) и Fujii et. al. (1991) выявили, что причиной злокачественной гипертермии является точковая мутация в рианодин-рецепторном гене в позиции 1843 (C→T) [5]. Эта транзиция приводит к замене аргенина на цистеин в позиции 615 рианодинрецепторного белка, который находится в саркоплазматическом ретикулуме мышечного волокна, что вызывает нарушение основной функции этого белка, в результате чего происходит ряд биохимических изменений, приводящих к развитию злокачественной гипертермии [6–8].

Цель исследований — изучить генетическую структуру некоторых популяций свиней пород крупная белая, белорусская мясная, ландрас, дюрок, йоркшир, пьетрен по локусу гена RYR1, ответственному за повышенную стрессчувствительность.

Материалы и методы

Было проведено ДНК-тестирование хряков-производителей, свиноматок и ремонтного молодняка, разводимых в РУП “С/к “Заря”, ЧСУП “Солак-Агро”, С/к “Яжевичи”, С/к “Багратионовский”, ЗАО “Советская Белоруссия” и РСУП “Брестплемпредприятие”. Ядерную ДНК выделяли из отщипа ушной раковины животных фенольно-хлороформовым методом [9, 10]. Исследование фрагмента гена RYR1 проводили по полиморфизму длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Результаты и обсуждение

Был выявлен полиморфизм гена RYR1, представленный двумя аллелями: N — доминантный дикий, n — рецессивный с точковой мутацией. Определены генотипы: NN — свободные от мутации (устойчивые к стрессу), Nn — скрытые носители, nn — чувствительные к стрессу (табл. 1).

Результаты исследования 482 голов хряков, свиноматок и ремонтного молодняка показали, что стрессчувствительных животных-носителей мутации в гомозиготном рецессивном состоянии (генотип nn) не было выявлено вообще, гетерозиготная форма генотипа (Nn) встречалась с частотой в среднем 3,79%. Мутантный аллель RYRⁿ во всех исследованных хозяйствах встречался приблизительно с одинаковой частотой (0,02–0,03). Наибольшее количество скрытых носителей мутации (Nn-генотип) выявлено в ЗАО “Советская Белоруссия”, а наименьшее — в РУП “С/к “Заря” (5,7% и 2,48% соответственно).

Таблица 1

Генетическая структура хряков-производителей, свиноматок и ремонтного молодняка по локусу гена RYR1

Хозяйство	Группы животных	Комбинация скрещиваний	Кол-во голов	Частота встречаемости генотипов, %			Частота аллелей	
				NN	Nn	nn	N	n
РУП “С/к “Заря”	Хряки	Дюрок	29	96,55	3,45	-	0,98	0,02
			34	100,0	-	-	1,0	-
	Свиноматки		67	95,53	4,47	-	0,98	0,02
	Ремонт	КБ*хЛхЭБ	7	100,0	-	-	1,0	-
		ЭбхДхКБхЭБ	8	100,0	-	-	1,0	-
		БМхБЧПхЭБхЛ	9	100,0	-	-	1,0	-
КБхЭБхБМхБЧП		7	100,0	-	-	1,0	-	
В среднем по хозяйству			161	97,52	2,48	-	0,98± 0,011	0,02± 0,011
ЧСУП “Золак-Агро”	Хряки		25	100,0	-	-	1,0	-
В среднем по хозяйству			25	100,0	-	-	1,0	-
С/к “Яжевичи”	Хряки	Ландрас	7	100,0	-	-	1,0	-
		Эст.бек	5	100,0	-	-	1,0	-
		БМ	2	100,0	-	-	1,0	-
		КБ	5	80,0	20,0	-	0,97	0,3
В среднем по хозяйству			19	94,44	5,56	-	0,99± 0,023	0,1± 0,023
С/к “Багратионовский”	Хряки	Дюрок	5	100,0	-	-		
		КБ	6	100,0	-	-		
		БМ	9	100,0	-	-		
		Эст.бек	3	100,0	-	-		
	Свиноматки	КБ	90	92,13	7,87	-	0,96	0,04
	Ремонт		80	96,25	3,75	-	0,98	0,02
В среднем по хозяйству			193	94,79	5,21	-	0,97± 0,012	0,03± 0,012
ЗАО “Советская Белоруссия	Хряки	КБ	9	100,0	-	-	1,0	-
		Дюрок	7	85,72	14,28	-	0,93	0,07
		Пьетрен	2	50,0	50,0	-	0,50	0,50
		Эст.бек	3	100,0	-	-	1,0	-
		Ландрас	14	100,0	-	-	1,0	-
В среднем по хозяйству			35	94,3	5,7	-	0,97± 0,028	0,03± 0,028

*КБ — крупная белая, Л — ландрас, ЭБ — эстонская беконная, БМ — белорусская мясная, Д — дюрок, БЧП — белорусская черно-пестрая.

Продолжение табл. 1

Хозяйство	Группы животных	Комбинация скрещиваний	Кол-во голов	Частота встречаемости генотипов, %			Частота аллелей	
				NN	Nn	nn	N	n
РСУП “Брест- плем пред- приятие”	Хряки	Ландрас	20	100,0	-	-	1,0	-
		Йоркшир	20	100,0	-	-	1,0	-
		Дюрок	5	100,0	-	-	1,0	-
		ЛхД	5	100,0	-	-	1,0	-
В среднем по хозяйству				100,0	-	-	1,0	-
ВСЕГО			482	96,21	3,79	-	0,98± 0,006	0,02± 0,006

*КБ — крупная белая, Л — ландрас, ЭБ — эстонская беконная, БМ — белорусская мясная, Д — дюрок, БЧП — белорусская черно-пестрая.

Таблица 2

Частоты генотипов и аллелей RYR1-гена у свиней плановых пород Республики Беларусь

Порода	Кол-во голов	Частота встречаемости генотипов, %			Частота аллелей	
		NN	Nn	nn	N	n
Дюрок	46	95,4	4,6	-	0,98	0,02
Пьетрен	2	50,0	50,0	-	0,5	0,5
Ландрас	41	100,0	-	-	1,0	-
Эст. Бек.	11	100,0	-	-	1,0	-
КБ	20	93,3	6,7	-	0,97	0,03
БМ	11	100,0	-	-	1,0	-
Йоркшир	20	100,0	-	-	1,0	-

Среди чистопородных хряков пород эстонская беконная, ландрас, белорусская мясная, йоркшир и помесных животных полиморфизма по RYR-гену выявлено не было (табл. 2). Из исследованных животных пород дюрок, крупной белой и пьетрен 4,4%, 6,7% и 50% животных, соответственно, были гетерозиготными носителями злокачественной гипертермии. Такой высокий процент носителей мутации среди животных породы пьетрен с одной стороны может быть связан с недостаточностью выборки, однако такие показатели хорошо сочетаются с литературными данными, согласно которым наличие мутантного аллеля у породы пьетрен составляет 31–100% [11].

Заключение

Проблема скрининга племенной продукции очень актуальна, особенно в условиях интенсивного завоза высокопродуктивных племенных животных из-за рубежа. Проведение генотипирования по RYR-гену позволяет выявить и удалить из популяции скрытых носителей злокачественной гипертермии,

что будет способствовать увеличению откормочной, мясной продуктивности и улучшению качества свинины.

Литература

1. *Archibald A.L.* Inherited halothane-induced malignant hyperthermia in pigs // Breeding for disease resistance in farm animals.— CAB Intern.— Wallingford, Oxon, UK.— 1991.— P. 449–466.
2. *Eds. Chrousos G.P.* Stress: basic mechanisms and clinical implications // Annals of The New York Acad. Sci.— 1995.— V.771.— P. 755.
3. *Bouchard T.J.* Genes, environment and personality // Science.— 1994.— V.264.— P. 1700–1711.
4. *Тониха В.С., Стародубець О.О.* Стрессчувливість свиней породи дюрок внутрішньопородного типу “Степовий”.— Вісник аграрної науки Причорномор’я.— Вип.2.— 2008.— С. 150–154.
5. *Fujii J., Otsu K., Zorzato F. et al.* Identification of mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia // Science.— 1991.— V.253.— P. 448–451.
6. *Hardge T., Scholz A.* The influence of RYR1-genotype and breed on fattening performance carcass value and meat quality // 45th Annual Meeting of the EAAP.— Edinburg.— september 5–8.— 1994.— P. 340.
7. *Russo V.* Study of halothane locus by PCR-typing of CRC gene in pig breeds reared in Italy // Int: Abstr. XXIV. Int. Conf. Anim. Genetics.— Praha.— 1994.— P. 137.
8. *O’Brien P.J.* Porcine malignant hyperthermia susceptibility: Hypersensitive calcium — release mechanism of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum // Vet. Res. Commun.— 11.— 1987.— P. 527–559.
9. *Зиновьева Н.А., Гладырь Е.А.* Современные достижения и проблемы биотехнологии сельскохозяйственных животных.— Материалы международной научной конференции.— Дубровицы.— 2002.— С. 44.
10. *Калашикова Л.А., Дунин И.М., Глазко В.И. и др.* ДНК-технология оценки сельскохозяйственных животных.— ВНИИплем.— 1999.— 148 с.
11. *Шейко И.П., Епишко Т.И., Подскребнин Н.В. и др.* Зоотехническая наука Беларуси: Сб. науч. тр.— Т.39.— 2004.— С. 166–170.

Резюме

Проведено исследование генетической структуры некоторых популяций свиней плановых пород РБ по локусу гена RYR1. Выявлено, что частота предпочтительного аллеля *N* RYR-гена составляет 0,98. Показано, что в исследованной выборке животных мутантный *n*-аллель встречается в породах дюрок, крупная белая и пьетрен.

A genetic structure of some pig populations of major breeds in RB was studied for RYR1 gene locus. The frequency of the preferable allele *N* of RYR-gene was revealed to be 0,98. The mutant *n*-allele was shown to occur in Duroc, Large White and Pietrain breeds of the studied sample.

КИРИКОВИЧ С.С., ЛЕВИТЕС Е.В.

Институт цитологии и генетики СО РАН,

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

ВЛИЯНИЕ ТРИТОНА X-100 И КОЛХИЦИНА НА ЭКСПРЕССИЮ ФЕРМЕНТНЫХ ГЕНОВ В НЕПРОРАСТАЮЩИХ СЕМЕНАХ САХАРНОЙ СВЕКЛЫ

Всхожесть семенных партий и, соответственно, доля непрорастающих семян зависит от генотипа исследуемой формы и условий прорастания. Непроросшее семя не имеет никаких отличительных признаков по сравнению с потенциально способными к прорастанию, но не проросшими семенами. Наиболее приемлемый путь изучения непроросшего семени — анализ у него биохимических и молекулярных признаков. Надежными и удобными биохимическими маркерами являются изоферменты [1, 2], позволяющие идентифицировать в потомствах гетерозиготных растений все теоретически возможные фено- и генотипические классы.

Для изучения непрорастающих семян целесообразно использовать одну и ту же генетическую форму, проращивая её в разных условиях. Менять условия можно, воздействуя на прорастающие семена веществами, дающими известный биологический эффект. К таким веществам относятся, например, колхицин [3, 4] и Тритон X-100 (ТХ-100) [5, 6]. Колхицин, вызывает увеличение содержания ДНК в клетке и связанные с этим наследуемые изменения многих признаков у растений [3], но уменьшает прорастание семян и жизнеспособность растений [4]. ТХ-100 способен снижать прорастание семян пшеницы и вызывать у обработанных растений морфологические изменения, наследуемые в половых поколениях [5]. В исследованиях, проведенных на сахарной свекле, было показано, что воздействие ТХ-100 на семена сахарной свеклы приводит к изменению динамики их прорастания и к последующему изменению морфологических признаков листа и корня [6]. Хотя в предварительных экспериментах, проведенных на сахарной свекле, не было отмечено уменьшения под влиянием ТХ-100 прорастания семян, но было выявлено уменьшение жизнеспособности обработанных растений (не опубликовано). Из этого факта можно сделать вывод о том, что не все возникающие под действием ТХ-100 изменения проявляются сразу же, но значительная их часть проявляется в последующие периоды развития растения.

Поскольку ТХ-100 является детергентом, представляет интерес анализ ферментов, связанных с мембранами и субклеточными органеллами, и сравнение получаемых данных с результатами исследования ферментов, локализованных в растворимой части цитоплазмы. К таким ферментам растений, относится, например, глюкозофосфатизомераса (GPI), которая представлена изоферментами, локализуясь как в растворимой части цитоплазмы, так и в органеллах [7]. Известно, что изоферменты GPI, локализованные в растворимой части цитоплазмы, могут при определенных функциональных состояниях клетки связываться с мембранами органелл [8]. В то же время

представляет интерес исследовать влияние TX-100 на ферменты растений, которые локализованы в растворимой части цитоплазмы и не связаны с органеллами, например, алкогольдегидрогеназу (ADH) [9]. Целью настоящего исследования было изучение индивидуального и совместного воздействия TX-100 и колхицина на экспрессию ферментных генов GPI и ADH в непрорастающих семенах сахарной свеклы.

Материалы и методы

В анализ были взяты гибридные семена, полученные от опыления растения сахарной свеклы (№3) пыльцой растения красной столовой свеклы. В качестве маркерных признаков были взяты изоферментные спектры глюкозофосфатизомеразы (GPI, E.C.5.3.1.9) и алкогольдегидрогеназы (ADH, E.C.1.1.1.1), контролируемые соответственно локусами *Gpi* и *Adh* [2, 10]. Материнское растение №3 имело генотип: *Gpi2-F/Gpi2-S* и *Adh1-F/Adh1-S*, а отцовское растение — *Gpi2-F/Gpi2-F* и *Adh1-F/Adh1-F*. Поэтому в анализируемом семенном потомстве выявлялось по два фенотипических класса каждого фермента: FF и FS.

Проращивание семян проводили в термостате при 29 °С. Было проведено 4 варианта обработок семян: 1) Семена *3m* замачивали в 0,1% растворе TX-100 в течение 22 часов; 2) Семена *3c* замачивали в 0,05% растворе колхицина в течение 6 часов; 3) Семена *3mc* сначала были замочены в 0,1% растворе TX-100 в течение 22 часов, затем отмыты и сразу же замочены в 0,05% растворе колхицина в течение 6 часов; 4) Семена *3ct* были сначала замочены в 0,05% растворе колхицина в течение 6 часов, затем отмыты и тут же замочены в 0,1% растворе TX-100 в течение 22 часов. Необработанные контрольные семена обозначены как *3k*. Анализ изоферментных спектров в контрольных и опытных партиях семян проводили через 24, 48, 72, 96 и 120 часов прорастания. Электрофоретический анализ проводили на индивидуальных непроросших семенах в крахмальном геле по методам, описанным ранее [2]. Сканирование электрофореграмм проводили при помощи прибора Biodoc.

Результаты и обсуждение

Изоферментные спектры GPI и ADH изменяются в ходе прорастания семян сахарной свеклы. Стандартные изоферментные спектры наиболее четко выявляются в первые сутки прорастания. В группе контрольных семян процесс прорастания идет довольно быстро и дружно, так что через 48 часов непроросшими остается незначительное число семян, составляющих не более 5%. Воздействие TX-100 и колхицином замедляет процесс прорастания, что позволяет исследовать изменение экспрессии ферментных генов в динамике.

Глюкозофосфатизомераза (GPI) — фермент, участвующий в гликолизе. По своей структуре GPI — димерный фермент. У сахарной свеклы GPI представлена на электрофореграммах в виде двух анодных зон ферментативной активности GPI1 и GPI2. Полиморфизм и генетический контроль изучен для медленномигрирующей зоны (GPI2); установлено, что она контролируется

ется локусом *Gpi2*, имеющим два аллеля [10]. У гомозигот эта зона представлена либо быстромигрирующим (FF-фенотип), либо медленномигрирующим изоферментом (SS-фенотип). У гетерозигот *Gpi2-F/Gpi2-S* эта зона представлена трехполосным спектром.

В данной работе анализировали изоферментные спектры GPI2. Среди представленных на рис. 1 спектров GPI2 к стандартным можно отнести лишь гетерозиготные спектры (рис. 1, 1 и 11). К аномалиям относили спектры, в которых появились изоферменты с измененной электрофоретической подвижностью (модификации) (рис. 1, 2–10, 12); аномалией также считали полную потерю активности изоферментов стандартного спектра (рис. 1, 2–4). Важным, на наш взгляд, является тот факт, что на электрофореграмме одного и того же семени одновременно может выявляться и модифицированные изоферменты GPI2, и нулевой фенотип GPI2, у которого отсутствует ферментативная активность в области нормального спектра (рис. 1, 2–4). По мере ослабления активности изоферментов в стандартной части спектра происходит усиление активности модифицированных изоферментов (рис. 1, 7, 9), а при нулевой активности стандартного спектра GPI2, активность модифицированных изоферментов резко возрастает (рис. 1, 2–4). Это указывает на то, что модифицированные изоферменты представляют собой продукты измененной экспрессии локуса *Gpi2*, и именно полное изменение экспрессии локуса *Gpi2* приводит к потере активности стандартного спектра.

Частота появления модификаций в опытных партиях (3*m*, 3*c*, 3*mc* и 3*cm*) сходна; что позволяет предположить, что ТХ-100 и колхицин действуют на одни и те же структуры ядра и клетки. Частота модификаций в суммарной выборке опытных партий семян (3*m*, 3*c*, 3*mc* и 3*cm*) нарастает постепенно от 28,6% в первые 24 часа до 88,3% через 120 часов проращивания.

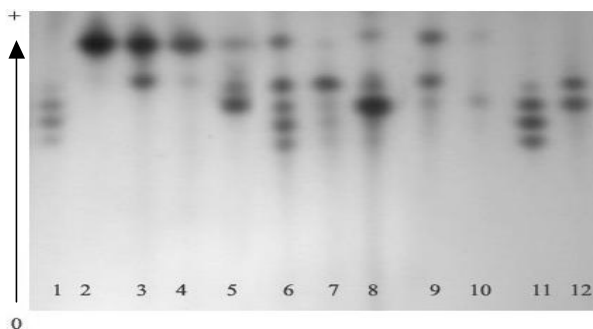


Рис. 1. Типы изоферментных спектров глюкозофосфатизомеразы (GPI) в непрорастающих семенах сахарной свеклы. 1, 11 — гетерозигота *Gpi2-F/Gpi2-S* со стандартным фенотипом; 2–4 — модифицированный спектр с нулевой активностью нормальных изоферментов GPI2; 5, 8–10, 12 — гомозиготы *Gpi2-F/Gpi2-F* с модифицированными изоферментами; 6, 7 — гетерозиготы *Gpi2-F/Gpi2-S* с модифицированными изоферментами. (0) — старт, (+) — анод

Алкогольдегидрогеназа (ADH) — один из наиболее изученных ферментов растений, активный в тканях, находящихся в анаэробных условиях. ADH находится у растений в растворимой фракции цитоплазмы [9]. По своей структуре ADH — димерный фермент, и у гетерозигот он выявляется в виде трехполосного изоферментного спектра. У большинства изученных видов растений ADH контролируется не менее чем двумя локусами: *Adh1* и *Adh2*. Для ADH сахарной свеклы четких доказательств наличия продуктов второго локуса (*Adh2*) в литературе нет.

Наряду со стандартными спектрами ADH в непрорастающих семенах сахарной свеклы выявляются модифицированные изоферменты, которые локализуются в быстромигрирующей зоне спектра, в той части, где у других видов растений обычно локализуются гетеродимеры между продуктами первого и второго локусов (рис. 2, 1–5). Анализ показал, что при всех типах обработки наблюдается достоверно низкая частота модификаций ADH по сравнению с GPI. Так, суммарная частота модифицированных изоферментов ADH, выявленная в каждой из опытных групп (*3m*, *3с*, *3mc* и *3cm*) за весь период проращивания составляла, соответственно, 9,8%, 32,5%, 29,7% и 0%, а у GPI эти показатели составляли, соответственно, 57,7%, 65,8%, 84,0% и 53,8%. Это свидетельствует о том, что механизм возникновения данных модификаций отличается от того, который характерен для GPI. Этот вывод подтверждается тем, что возникновение нулевого фенотипа по стандартному спектру ADH1 (рис. 2, 1) не приводит к усилению активности модифицированных изоферментов. Это не позволяет рассматривать модифицированные изоферменты ADH как результат изменения экспрессии локуса *Adh1*.

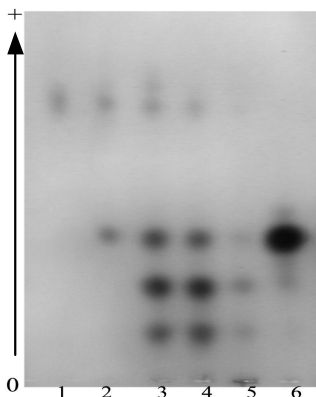


Рис. 2. Типы изоферментных спектров алкогольдегидрогеназы (ADH) в непрорастающих семенах сахарной свеклы. 1 — спектр с нулевой активностью локуса *Adh1* и изоферментами, кодируемыми локусом *Adh2*; 2 — гомозигота *Adh1-F/Adh1-F* с изоферментами, кодируемыми локусом *Adh2*; 3–5 — гетерозигота *Adh1-F/Adh1-S* с изоферментами, кодируемыми локусом *Adh2*; 6 — гомозигота *Adh1-F/Adh1-F*. (0) — старт, (+) — анод

Сделано предположение, что эти изоферменты являются продуктами локуса *Adh2*.

Таким образом, в опытных партиях семян выявились два типа изменений: модификация электрофоретической подвижности изоферментов и полная потеря активности их стандартного спектра. Согласованное увеличение интенсивности модифицированных изоферментов GPI и уменьшение активности изоферментов GPI стандартного спектра (вплоть до полного его исчезновения) позволяет предположить, что эти изменения являются следствием постепенного перехода нормальной (стандартной) экспрессии ферментного локуса к полностью измененной экспрессии, при которой нормальные изоферменты не образуются. Совершенно другая картина наблюдается в системе АДН. Появление изоферментов АДН с более быстрой, чем у стандартных изоферментов электрофоретической подвижностью, обусловлено, по-видимому, эпигенетическим процессом: активацией другого, ранее молчавшего гена *Adh2*. Появление нулевых фенотипов по АДН1 при воздействии колхицина и ТХ-100 можно рассматривать как результат ускоренной инактивации локуса *Adh1*, которая обычно происходит и в норме в тот момент, когда семена прорастают, начинают потреблять атмосферный кислород и переходят на эффективный путь использования запасенной глюкозы. Различная реакция GPI и АДН на воздействие ТХ-100 и колхицина указывает на то, что влияние этих веществ на экспрессию генов *Gpi2*, *Adh1* и *Adh2* связано с различиями во внутриклеточной локализации данных ферментов.

В контрольных семенах с очень редкой частотой выявлены аномалии, аналогичные тем, которые наблюдались в опытных группах. Это позволяет предположить, что в основе непрорастания могут лежать спонтанные нарушения в экспрессии различных генов.

Различные сочетания воздействий на семена сахарной свеклы позволили сопоставить механизм биологического действия ТХ-100 и колхицина. Частоты модификаций GPI у семян при всех типах обработок (*3m*, *3c*, *3mc* и *3cm*) совпадают; кроме того, оба вещества индуцируют активность локуса *Adh2*. Это указывает на то, что воздействие детергента ТХ-100, направленное на биологические мембраны, совпадает с действием колхицина, т.е. колхицин также действует на клеточные мембраны. Возможно, что для колхицина существует множество точек воздействия на геном. Однако, учитывая тот факт, что колхицин препятствует образованию веретена деления, можно предположить, что он действует на участки взаимодействия мембран с цитоскелетом и, соответственно, с веретеном деления. Кроме того, учитывая мутагенное влияние колхицина [11], можно предположить, что начальными точками воздействия колхицина на геном растительной клетки являются участки контакта и взаимодействия ДНК, ядерной мембраны и цитоскелета.

Выводы

Неионный детергент ТХ-100 и колхицин вызывают изменения в экспрессии ферментных генов *Gpi2*, *Adh1* и *Adh2* в непрорастающих семенах сахарной свеклы. В ферментной системе GPI происходит полная модифи-

кация изоферментов и связанная с ней потеря активности стандартных спектров. В системе АДН наблюдается потеря экспрессии стандартных спектров и появление продуктов локуса *Adh2*. Сходство реакции GPI и АДН на воздействие колхицина и ТХ-100 позволяет заключить, что оба эти вещества действуют на клеточные мембраны.

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. *Hunter R.L., Markert C.L.* Histochemical demonstration of enzymes separated by zone electrophoresis in starch gel // *Science*.— 1957.— Vol.125, №3261.— P. 1294–1295.
2. *Левитес Е.В.* Генетика изоферментов растений.— Новосибирск: Наука, 1986.— 144 с.
3. *Matzke M.A., Sheid O.M., Matzke A.J.M.* Rapid structural and epigenetic changes in polyploid and aneuploid genomes // *BioEssays*.— 1999.— Vol.21.— P. 761–767.
4. *Раджабли Е.П., Рудь В.Д.* Получение и использование полиплоидных форм растений.— Новосибирск: Наука, 1972.— 132 с.
5. *Махмудова К.Х., Богданова Е.Д., Левитес Е.В.* Индукция Тритоном X-100 наследуемых изменений морфологических признаков у *Triticum aestivum* L. // *Генетика*. 2009.— Т.45, №4.— С. 564–567.
6. *Курикович С.С., Левитес Е.В.* Эпигенетическая изменчивость у сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.), индуцированная Тритоном X-100 // Фактори експериментальної еволюції організмів (Збірник наукових праць). Київ: “Логос”.— 2009.— Т.7.— С. 95–99.
7. *Weeden N.F., Gottlieb L.D.* The genetics of chloroplast enzymes // *The J. of Heredity*.— 1980.— Vol.71.— P. 392–396.
8. *Graham J.W.A., Williams T.C.R., Morgan M. et al.* Glycolytic enzymes associate dynamically with mitochondria in response to respiratory demand and support substrate channeling // *The Plant Cell*.— 2007.— Vol.19.— P. 3723–3738.
9. *Scandalios J.G.* Genetic control of alcohol dehydrogenase isozymes in maize // *Biochem. Genet.*— 1967.— Vol.1, №1.— P. 1–9.
10. *Smed E., Van Geyt J.P.C., Oleo M.* Genetical control and linkage relationships of isozyme markers in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) // *Theor. Appl. Genet.*— 1989.— Vol.78.— P. 97–104.
11. *Castro C.M., Oliveira A.C., Calvaho F.I.F.* Changes in allele frequencies in colchicine treated Ryegrass population assessed with APD marker // *Agrociencia*.— 2003.— Vol.9, №2.— P. 107–112.

Резюме

Изучена экспрессия ферментных генов, контролирующих глюкозофосфатизомеразу (GPI) и алкогольдегидрогеназу (АДН), в непрорастающих семенах сахарной свеклы после воздействия Тритоном X-100 (ТХ-100) и колхицином. Выявлены два типа изменений: изменение электрофоретической подвижности изоферментов и изменение активности стандартных спектров (активация/инактивация). Предположено, что различная реакция ферментных систем GPI и АДН на воздействие ТХ-100 и колхицина связана с различной внутриклеточной локализацией этих ферментов.

Expression of isozyme genes encoding glucosephosphate isomerase (GPI) and alcohol dehydrogenase (ADH) in nongerminated sugar beet seeds treated by Triton X-100 (TX-100) and colchicine was studied. Two types of changes: changing of electrophoretic mobility of isozymes and inactivation/activation of normal isozyme patterns were revealed. It was supposed that differences of GPI and ADH isozyme pattern reactions on TX-100 and colchicine are associated with different subcellular localization of these enzymes.

ЛЕВИТЕС Е.В., КИРИКОВИЧ С.С.

Институт цитологии и генетики СО РАН,

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

НАСЛЕДУЕМЫЙ ЭФФЕКТ ВОЗДЕЙСТВИЯ ТРИТОНА X-100 НА ЭКСПРЕССИЮ ЛОКУСА *Gpi2* У САХАРНОЙ СВЕКЛЫ

Взросший интерес к исследованию эпигенетической изменчивости делает необходимым изучение молекулярных и биохимических процессов, лежащих в основе этого явления. В сформировавшихся к настоящему времени представлениях о возможных механизмах эпигенетической изменчивости большая роль отводится взаимодействию хромосом с ядерной мембраной и ядерным матриксом. Согласно гипотезе о многомерности кодирования наследственной информации у растений ядерная мембрана и ядерный матрикс участвуют в детерминации генотипа клетки, вступающей в эмбриогенез [1, 2]. Из этой гипотезы следует, что воздействие на ядерную мембрану может привести не только к изменению экспрессии генов, но и к проявлению эффекта воздействия в следующих поколениях. Действительно, было показано, что прорастание семян сахарной свеклы на среде, содержащей детергент Тритон X-100 (TX-100), приводит к изменению динамики прорастания семян и к последующему изменению морфологических признаков листа и корня растения [3, 4]. Для дальнейшей проверки этой гипотезы представляло интерес оценить влияние детергента TX-100, способного нарушать связь хромосом с ядерной мембраной, на экспрессию ферментных генов. Преимущество изоферментов как маркеров обусловлено простотой их выявления, а также тем, что они являются непосредственными продуктами генной активности.

Поскольку TX-100 является детергентом, представляет интерес анализ ферментов, связанных с мембранами и субклеточными органеллами, и сравнение получаемых данных с результатами исследования ферментов, локализованных в растворимой части цитоплазмы. К ферментам, удобным для проведения такого рода исследований, относится, например, глюкозофосфатизомеразы (GPI), представленная изоферментами, локализующимися как в растворимой части цитоплазмы, так и в органеллах [5, 6]. Известно, что изоферменты GPI, локализованные в растворимой части цитоплазмы,

могут при определенных функциональных состояниях клетки связываться с мембранами органелл [6]. К ферментам, которые локализованы в растворимой части цитоплазмы и не связаны с органеллами, относится, например, алкогольдегидрогеназа (ADH) [7].

Целью настоящего исследования явилось изучение экспрессии локуса *Gpi2*, кодирующего фермент глюкозофосфатизомеразу, и локуса *Adh1*, кодирующего алкогольдегидрогеназу, в семенном потомстве растений сахарной свеклы, обработанных TX-100.

Материалы и методы

В качестве исходного материала были взяты семена, полученные в 1998 г. путем саморепродукции от способного к агамоспермному размножению растения сахарной свеклы №8–3. Часть семян этого растения использовались для получения контрольных растений; эти семена замачивали в дистиллированной воде в чашках Петри в термостате при 29 °С. Опытные растения выращивали из второй части семян этого растения; их замачивали в 0,1% растворе TX-100 в течение 18 часов при температуре 29 °С. От контрольных и обработанных детергентом TX-100 растений сахарной свеклы в 2009 г. были получены семена путем саморепродукции под бязевыми изоляторами.

В качестве маркерного признака были взяты изоферментные спектры глюкозофосфатизомеразы (GPI, E.C.5.3.1.9), контролируемые локусом *Gpi2*, и алкогольдегидрогеназы (ADH, E.C. 1.1.1.1.), контролируемые локусом *Adh1* [8, 9]. Контрольные и опытные родительские растения имели одинаковый генотип по маркерным ферментным локусам: *Gpi2-S/Gpi2-S*, *Adh1-F/Adh1-F*. Электрофоретический анализ проводили на индивидуальных семенах в крахмальном геле по методам, описанным ранее [10]. Сканирование электрофореграмм проводили при помощи прибора Biodoc.

Результаты и обсуждение

Глюкозофосфатизомераза (GPI) — фермент, участвующий в гликолизе. По своей структуре GPI — димерный фермент. У сахарной свеклы GPI представлена на электрофореграммах в виде двух анодных зон ферментативной активности GPI1 и GPI2. Полиморфизм и генетический контроль изучен для медленномигрирующей зоны (GPI2); установлено, что она контролируется локусом *Gpi2*, имеющим два аллеля [8]. У гомозигот эта зона представлена либо быстромигрирующим изоферментом (FF-фенотип), либо медленномигрирующим — (SS-фенотип).

В данной работе анализировали изоферментные спектры GPI2. Среди выявленных в опытных семенах изоферментных спектров GPI2 к стандартным фенотипам SS можно отнести спектры образцов 1, 3–7, 9 (рис. 1). К модифицированным относили спектры 2 и 8 (рис. 1), напоминающие стандартный гетерозиготный спектр, но имеющий меньшую, по сравнению со стандартным спектром, электрофоретическую подвижность. Модифицированный спектр включает в себя гомодимеры SS, состоящие из нормальных субъединиц, гомодимеры S^MS^M, состоящие только из измененных субъеди-

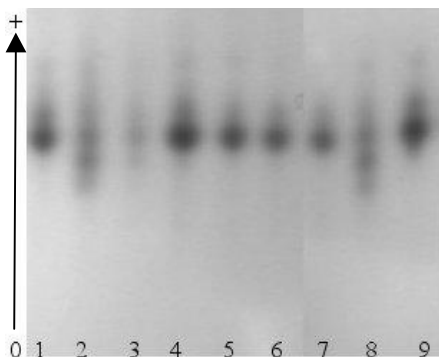


Рис. 1. Типы изоферментных спектров глюкозофосфатизомеразы-2 (GPI2) в семенах сахарной свеклы. 1, 3–7, 9 — гомозиготы *Gpi2-S/Gpi2-S* со стандартным фенотипом; 2, 8 — гомозиготы *Gpi2-S/Gpi2-S* с модифицированными изоферментами. (0) — старт, (+) — анод

ниц, а также гетеродимеры SS^M , включающие в себя нормальную и измененную субъединицы и обладающие промежуточной электрофоретической подвижностью. Частота появления модификаций в опытных партиях была следующей: в семенном потомстве растения №5 из 42 проанализированных семян в 7 был выявлен измененный спектр, в потомстве растения №6 из 4 семян в 1 был измененный спектр, в потомстве растения №7 из 5 семян ни у одного не было выявлено измененного спектра, а в потомстве растения №8 из 49 семян в 7 был измененный спектр. Таким образом, в 100 проанализированных опытных семенах число выявленных изменений спектра равно 15. В контрольной партии, состоящей из 73 семян, полученных от четырех контрольных растений, было выявлено лишь одно семя с измененным спектром GPI2. Выявленные различия между опытной и контрольной партиями семян достоверны; величина G-критерия составила 9,9652 ($P < 0,01$). Эти различия указывают на то, что изменения, вызываемые у растений под воздействием TX-100, передаются в следующее поколение. Способность TX-100 нарушать связь белков с мембранами и вызывать изменения в функционировании мембран позволяет предположить, что в данном случае мишенью для TX-100 могли бы быть как ядерные мембраны и, соответственно, организация хромосомных участков, взаимодействующих с ядерной мембраной. Мишенью могли бы быть также и мембраны органелл, воспроизводящие эти изменения при каждом клеточном делении, однако исследуемый нами спектр GPI2 аналогичен спектрам, принадлежащим растворимой части цитоплазмы и выявленным у других видов растений. Это позволяет предположить, что наблюдаемые нами изменения спектра GPI2 обусловлены воздействием TX-100 на ядерную мембрану, а не на мембраны органелл. Сохранение эффекта воздействия в следующем поколении указывает на то, что ядерная мембрана вносит свой вклад в передачу наследственной инфор-

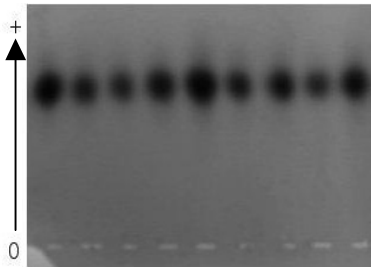


Рис. 2. Типы изоферментных спектров алкогольдегидрогеназы (ADH) в семенах гомозиготного растения сахарной свеклы генотипа *Adh1-F/Adh1-F*. (0) — старт, (+) — анод

мации. Следует отметить, что влияние TX-100 на изоферментные спектры GPI2 проявляется и в непосредственно обработанных семенах, но в этих случаях изменения спектра носят другой характер.

Алкогольдегидрогеназа (ADH) находится у растений в растворимой фракции цитоплазмы [7]. У большинства изученных видов растений ADH контролируется не менее чем двумя локусами: *Adh1* и *Adh2*. Для сахарной свеклы до недавнего времени было показано существование лишь локуса *Adh1*, а четких доказательств наличия продуктов второго локуса (*Adh2*) в литературе не было. В наших исследованиях, проведенных на сахарной свекле, выявлены изоферментные спектры ADH, позволяющие предположить наличие у данного вида растений локуса *Adh2* [11].

У 100 опытных и 73 контрольных семян не было выявлено каких-либо изменений спектра алкогольдегидрогеназы (рис. 2). Этот факт может быть объяснен, по-видимому, тем, что район гомологичных хромосом, содержащий локус *Adh1*, в момент воздействия Тритоном X-100 имел меньшее взаимодействие с ядерной мембраной, чем, например, район хромосом, содержащий локус *Gpi2*. Участки хромосом, слабо взаимодействующие с ядерной мембраной, могут быть менее подвержены изменениям при действии факторов, влияющих на мембраны. Обнаруженные различия во влиянии TX-100 на экспрессию генов *Gpi2* и *Adh1* могут быть обусловлены различиями в организации участков хромосом, несущих эти гены, и различиями во взаимодействии этих участков с ядерной мембраной в момент воздействия TX-100.

Выводы

Эффект воздействия неионного детергента TX-100 на растения сахарной свеклы может передаваться в следующее поколение и проявляться как изменение экспрессии ферментного локуса *Gpi2*, появление модифицированных изоферментных спектров GPI2. Проявление эффекта воздействия TX-100 в последующем поколении указывает на роль ядерной мембраны в передаче наследственной информации.

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

Литература

1. Levites E.V. Sugarbeet plants produced by agamospermy as a model for studying genome structure and function in higher plants // Sugar Tech.— 2005.— Vol.7, №2/3.— P. 67–70.
2. Levites E.V. Marker enzyme phenotype ratios in agamospermous sugarbeet progenies as a demonstration of multidimensional encoding of inherited information in plants // on-line 2007: <http://arxiv.org/abs/q-bio/0701027>.
3. Кирикович С.С., Левитес Е.В. Эпигенетическая изменчивость у сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.), индуцированная Тритоном X-100 // Фактори експериментальної еволюції організмів (Збірник наукових праць). Київ: “Логос”.— 2009.— Т.7.— С. 95–99.
4. Kirikovich S.S., Levites E.V. Effect of epimutagen Triton X-100 on morphological traits in sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) // Sugar Tech.— 2009.— Vol.11, №3.— P. 307–310.
5. Weeden N.F., Gottlieb L.D. The genetics of chloroplast enzymes // The J. of Heredity.— 1980.— Vol.71.— P. 392–396.
6. Graham J.W.A., Williams T.C.R., Morgan M. et al. Glycolytic enzymes associate dynamically with mitochondria in response to respiratory demand and support substrate channeling // The Plant Cell.— 2007.— Vol.19.— P. 3723–3738.
7. Scandalios J.G. Genetic control of alcohol dehydrogenase isozymes in maize // Biochem. Genet.— 1967.— Vol.1, №1.— P. 1–9.
8. Smed E., Van Geyt J.P.C., Oleo M. Genetical control and linkage relationships of isozyme markers in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) // Theor. Appl. Genet.— 1989.— Vol.78.— P. 97–104.
9. Малецкий С.И., Коновалов А.А. Наследование алкогольдегидрогеназы у сахарной свеклы. Сообщение 1. Анализ отклонения от моногенного расщепления // Генетика.— 1985.— Т.21, №9.— С. 1527–1540.
10. Левитес Е.В. Генетика изоферментов растений.— Новосибирск: Наука, 1986.— 144 с.
11. Кирикович С.С., Левитес Е.В. Влияние Тритона X-100 и колхицина на экспрессию ферментных генов в непрорастающих семенах сахарной свеклы // Фактори експериментальної еволюції організмів (Збірник наукових праць). Київ: “Логос”.— 2010 (Данное издание).

Резюме

Показано, что воздействие неионного детергента Тритона X-100 (TX-100) на растения сахарной свеклы может проявляться в следующем поколении как изменение экспрессии ферментного локуса *Gpi2*, а именно, как появление модифицированных изоферментных спектров GPI2. Проявление воздействия TX-100 в последующем поколении указывает на роль ядерной мембраны в передаче наследственной информации.

It was shown that action of nonion detergent Triton X-100 (TX-100) on sugar beet plants can manifest in the next generation as changing of expression of enzyme locus *Gpi2* that is in appearance of modified isozyme patterns of GPI2. Manifestation of effect of TX-100 influence in the next generation points to the role of nuclear membrane in descent of hereditary information.

**МОРГУН² Б.В., ЛЕВЧУК¹ О.Б., РУМЯНЦЕВА³ А.Є., ЮЗВЕНКО¹ Л.В.,
ЛОЗОВА¹ О.Й., ДІДЕНКО¹ Л.Ф., КУЧУК² М.В., СПІВАК¹ М.Я.**

¹Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України
Україна, 03680, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 154

²Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України
Україна, 03680, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 148,
e-mail: btorgun@gmail.com

³Національний технічний університет України “КПІ”, Факультет біотехнології
і біотехніки України, 03056, м. Київ, проспект Перемоги, 37

КЛОНУВАННЯ ТА АНАЛІЗ ПОСЛІДОВНОСТЕЙ ГЕНОМНОЇ РНК ВІРУСУ ОПІКУ ГРЕЧКИ

Вірус опіку гречки (ВОГ) був відкритий на гречаних полях біля міста Кам’янець-Подільська. Симптоматично захворювання викликає некротичні плями на листі гречки і призводить до втрат 80% врожаю [1].

За морфологічними ознаками, білковим, ліпідним та вуглеводним складом ВОГ можна віднести до родини Rhabdoviridae. Родина рабдовірусів включає в себе велику кількість вірусів, які вражають широке коло рослин, тварин та комах. Для цих вірусів характерна бацилоподібна форма, біліпідна та глікопротеїнова оболонка, наявність 5 білків та мінус РНК, що складає геном [6].

Надзвичайно цікавим та актуальним є визначення послідовності геномної нуклеїнової кислоти нового вірусу для більш точної його класифікації та розробки дієвих заходів боротьби із захворюванням.

Матеріали і методи

Вірус виділяли з листя інфікованих рослин *Nicotiana rustica* за допомогою ультрацентрифугування [2]. Вірусну геномну РНК отримували методом фенольно-хлороформної депротеїнізації [3]. Проводили ДНК-зну обробку (Dvase I, Fermentas) із застосуванням інгібіторів РНКаз (RiboLock™ RNase Inhibitor, Fermentas).

За допомогою Генетичного банку (GenBank®, NCBI) та програми ClustalW (<http://www.clustal.org/>) були підібрані праймери. При цьому порівнювались геноми фіторабовірусів, які є найкраще вивченими на сьогоднішній день — 4 нуклеорабовіруси (вірус жовтої сітчатості осоту (L32603), вірус тонкої смугастості кукурудзи (AY618417), вірус жовтої затримки росту рису (AB011257), вірус мозаїки кукурудзи (AY618418)) та 3 циторабовіруси (вірус північної мозаїки злаків (AB030277), вірус зморшкватості суниці (AY005146), вірус некротичного пожовтіння салату-латуку (AJ867584)).

Порівняння найбільш консервативних нуклеотидних послідовностей мотивів А, В, С та D домену III РНК-залежної РНК-полімерази вказаних вірусів дало змогу скомпонувати 5 праймерів. Вони обиралися на ділянках починаючи з 2000 по 11600 нуклетидів на геномах фіторабовірусів. Довжина перших чотирьох праймерів складала 26 нуклеотидів, з них 20 нуклеотидів на 5'-кінці були однаковими для всіх праймерів, тільки п’ятий (pr18)

складався з цієї універсальної частини, тобто містив 20 чітко визначених нуклеотидів [7]. Праймери мали наступні послідовності нуклеотидів:

pr14 — for 5'-GCCGGAGCTCTGCAGAATTCNCAAYCC-3' (ділянка геному 9113-9130),

pr15 — for 5'-GCCGGGCTCTGCAGAATTCBATGAG-3' (ділянка геному 9996-10013),

pr16 — rev 5'-GCCGGAGCTCTGCAGAATTCCKGTTC-3' (ділянка геному 10478-10493),

pr17 — rev 5'-GCCGGAGCTCTGCAGAATTCBYCCSA-3' (ділянка геному 11576-11593),

pr18 — for/rev 5'-GCCGGAGCTCTGCAGAATTC-3'

Для зворотньої транскрипції геномної вірусної РНК у кДНК використовувався набір oneStep RT-PCR Kit (Qiagen), що містив ферменти, які добре взаємодіють з вірусними РНК. Так як вірусна геномна РНК утворює стабільні термодинамічні конформації, які заважають проходженні реакції, то у наборі використовуються дві реверс-транскриптази (omniscrypt та sensiscrypt). Для однієї реакції ми використовували 2 мкг очищеного препарату РНК ВОГ з праймерами pr14-17. Наступна ампліфікація проводилася з праймером pr18 та 2 мкл кДНК матриці. Результати аналізувалися електрофорезом у агарозному гелі та ТВЕ буфері з бромистим етідієм.

Фрагменти ДНК очищалися від реакційних продуктів за допомогою Silica Bead DNA Gel Extraction Kit (Fermentas).

Клонування проводили набором InsTAclone™ PCR Cloning Kit (Fermentas) в основу якого покладено бактеріальний вектор pTZ57R/T. Лігазну суміш трансформували у *Escherichia coli* штам XL-1 Blue (Stratagene). Селекцію рекомбінантних клонів проводили на агаризованому селективному середовищі M001 (HiMedia) з додаванням 100 мг/мл карбініциліну.

Секвенування здійснювали у відділі біосинтезу нуклеїнових кислот Інституту молекулярної біології і генетики НАН України використовуючи форвардний праймер M13/pUC (-46) на капілярному секвенаторі Genetic Analyzer 3130 (Applied Biosystems).

Порівняльний аналіз нуклеотидних послідовностей проводили засобами Nucleotide BLAST, у той час як амінокислотних послідовностей — BLASTX на серверах Національного центру біотехнологічної інформації США (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Результати і обговорення

Для проведення подальшої ідентифікації РНК вірусу спочатку потрібно було перевести геномну РНК у кДНК. При цьому використовувався набір для реверс-транскрипції та ПЛР oneStep RT-PCR kit (Qiagen), що містив ферменти, які добре взаємодіють з вірусними РНК. Часто РНК утворює різні шпильки, які заважають при реакції реверс-транскрипції. Вище згаданий набір містить дві реверс транскриптази (omniscrypt та sensiscrypt), що забезпечують ефективну реакцію навіть при малій концентрації РНК (від 1 рг до 2 мкг). Для ПЛР у oneStep RT-PCR наборі в якості полімерази було запро-

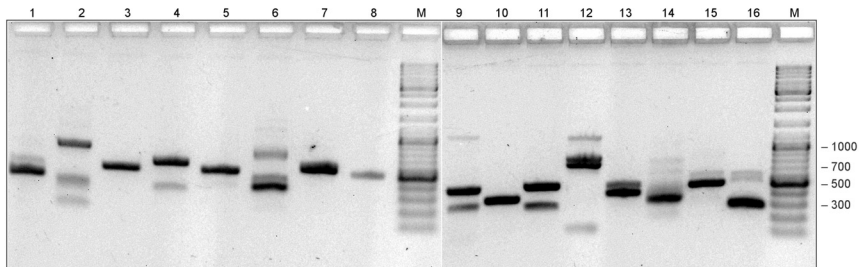


Рис. 1. Результати електрофорезу продуктів ампліфікації у різних комбінаціях праймерів. У якості маркера молекулярної ваги використовували O^oGeneRuler™ DNA Ladder Mix (Fermentas). Розмір вказано у парах нуклеотидів

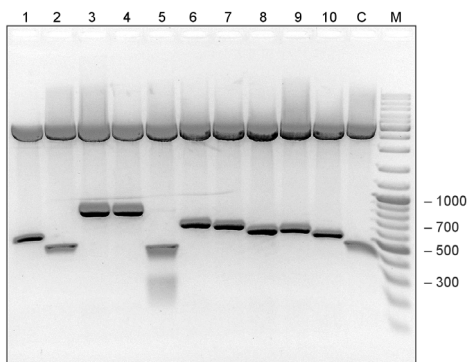


Рис. 2. Гель електрофореуз відібраних клонів ВОГ гідролізованих рестриктазою EcoRI перед секвенуванням. Доріжка 1-10, клони 8, 14, 30, 47, 51, 58, 62, 71, 75, 83 відповідно; доріжка 11, контроль; доріжка 12, маркер молекулярної ваги O^oGene Ruler™ DNA Ladder Mix (Fermentas) у парах нуклеотидів

поновано HotStar Taq полімераза. Після проведення ПЛР з 4 праймерами в різних комбінаціях за допомогою oneStep RT-PCR kit (Qiagen) та наступного 1,2% агарозного гелю електрофорезу чітких дискретних фрагментів виявлено не було.

Проведений ре-ПЛР з праймером pr18, для того що б розмножити знайдені фрагменти. Ми отримали біля 20 фрагментів з різною молекулярною вагою, яка становила близько від 400 до 1000 пар нуклеотидів. З них 10 фрагментів було відібрано для клонування та більш детального аналізу (рис. 1).

Відповідно було відібрано 10 клонів (рВОГ:8; 14; 30; 47; 51; 58; 62; 71; 75; 83) з яких виділяли плазмиди. Наявність вставок була підтверджена гідролізом ендонуклеазою EcoRI. На рис. 2 зображено продукти рестрикції. Розміри вставок співпадають із розмірами ампліконів.

Порівняння секвенованих вставок з послідовностями генетичного банку показало невелику ідентичність до вірусів родини рабдовирусів (5–10%).

Результати порівняльного аналізу амінокислотних послідовностей. Ідентичність та подібність вказано у відношенні кількості до загальної протяжності амінокислотних залишків та у відсотках

Клон (вставка, п.н.)	Подібність	Ідентичність, кількість (%)	Подібність, кількість (%)
рВОГ.47 (512)	L білок [Мобала вірус], РНК-залежна РНК полімераза; Полімераза [Ласса вірус] Полімераза [вірус плямистості орхідеї]	22/86 (25%) 17/67 (25%) 12/33 (36%)	38/86 (44%) 29/67 (43%) 16/33 (48%)
рВОГ.51 (516)	ДНК-залежна РНК полімераза II subunit RPB1 homolog, [Aedes taeniorhynchus iridescent virus] Нуклеокапсидний білок [вірус жовтої сітчастості осоту]	13/28 (46%) 16/45 (35%)	19/28 (67%) 21/45 (46%)
рВОГ.62 (571)	РНК-залежна РНК-полімераза [вірус тонкої смугастості кукурудзи]	14/43 (32%)	24/43 (55%)
рВОГ.71 (525)	Глікопротеїн [вірус сказу] Глікопротеїн оболонки gp350 [людський герпесвірус 4]	13/37 (35%) 35/101 (34%)	19/37 (51%) 43/101 (42%)
рВОГ.83 (485)	Капсидний білок [Вірус хлорозу жилки Таро]	21/81 (25%)	34/81 (41%)

При аналізі даних літератури було виявлено, що рабдовіруси мають не високу спорідненість між собою. Наприклад, спорідненість геному вірусу плямистості орхідеї 20–30% між рабдовірусами рослин, 22–26% до рабдовірусів, які вражають тварин та вірусами інших родин (*Paramixoviridae*, *Bornaviridae*, *Filoviridae*) [4].

Аналіз амінокислотних послідовностей секвенованих фрагментів виявив більшу спорідненість до вірусів. Аналогічні спостереження відмічали у своїх роботах дослідники Кондо та Борисенко зі співавторами [4, 5]. Клон рВОГ.47 та рВОГ.62 мають найвищу подібність до РНК-полімерази рабдовірусів (32–36%). Крім того, спостерігалась подібність до РНК-залежної РНК полімерази мобала та ласса вірусів (25%), яка характерна для вірусів з мінус геномною РНК. Для клонів рВОГ.51, рВОГ.71, рВОГ.83 відмічалась подібність до глікопротеїну та нуклеокапсидного білку різних рабдовірусів (табл.). Покриття подібних ділянок становило близько 60%.

Для подальшого дослідження геномної РНК вірусу опіку гречки планується застосовувати гібридизацію, яка дасть змогу аналізувати більшу кількість клонів.

Висновки

Виділено геномну РНК вірусу опіку гречки та проведено її зворотню транскрипцію. Підібрано вироджені праймери для ампліфікації консерва-

тивних ділянок РНК-залежної РНК-полімерази рабдовирусів рослин. Виділено та клоновано послідовності геномної РНК вірусу опіку гречки. Порівняння нуклеотидних послідовностей секвенованих вставок з послідовностями генетичного банку показало ідентичність до рабдовирусів (10%). Однак аналіз амінокислотних послідовностей секвенованих фрагментів виявив більшу подібність до глікопротеїну та нуклеокапсидних білків різних рабдовирусів. Покриття подібних ділянок становило близько 60%.

Література

1. Шевчук В.К., Довгань С.В., Діденко Л.Ф., Демченко О.А., Юзвенко Л.В., Серденко О.Б., Снівак М.Я. Вірусний опік гречки в Україні // Карантин і захист рослин.— 2008.— №1.— С. 13–15.
2. Діденко Л.Ф., Пархоменко Н.И., Максименко Л.А., Дяченко Н.С., Зарицький Н.М., Варбанець Л.Д., Броварская О.С. Некоторые свойства структурных компонентов фиторабдовируса курчавой карликовости картофеля // Биополимеры и клетка.— 2001.— №4.— С. 308–313.
3. Steele, K.P., Frist, R.H. Characterization of the 32 Termini of the RNAs of Cowpea Mosaic Virus // J. Virol.— 1978.— 26.— №2.— P. 243–248.
4. Kondo H., Maeda T., Shirako Y., Tamada T. Orchid fleck virus is a rhabdovirus with an unusual bipartite genome // Journal of General Virology.— 2006.— Vol.87.— №8.— P. 2413–2421.
5. Borysenko L., Stepanets V., Rynditch A.V. Molecular characterization of full-length MLV-related endogenous retrovirus ChiRV1 from the chicken, *Gallus gallus* // Virology.— 2008.— Vol.376.— №1.— P. 199–204.
6. Kuzmin I.V., Novella I.S., Dietzgen R.G., Padhi A., Rupprecht C.E. The rhabdoviruses: Biodiversity, phylogenetics, and evolution // Infection, Genetics and Evolution.— 2009.— Vol.9.— №4.— P. 541–553.
7. Veliceasa D., Enunlu N., Kos P.B., Koster S., Beuther E., Morgun B., Sachin D. Deshmukh S.D., Lukacs N. Searching for a new putative cryptic virus in *Pinus sylvestris* L. // Virus Genes.— 2006.— Vol.32.— №2.— P. 177–186.

Резюме

Було проведено клонування послідовностей геномної РНК вірусу опіку гречки. Аналіз амінокислотних послідовностей секвенованих фрагментів показав, що клоны рВОГ.47 і рВОГ.62 мали найвищу гомологію к РНК-полімеразі рабдовирусів (32–36%), а для клонів рВОГ.51, рВОГ.71, рВОГ.83 відзначалась гомологія к глікопротеїну та нуклеокапсидним білкам рабдовирусів. Покриття соответствующих участков составляло около 60%.

Було проведено клонування послідовностей геномної РНК вірусу опіку гречки. Аналіз амінокислотних послідовностей секвенованих фрагментів показав, що клоны рВОГ.47 та рВОГ.62 мали найвищу подібність до РНК-полімерази рабдовирусів (32–36%), а для клонів рВОГ.51, рВОГ.71, рВОГ.83 відмічалась подібність до глікопротеїну та нуклеокапсидним білкам рабдовирусів. Покриття подібних ділянок становило близько 60%.

Genomic RNA sequences of virus burn of buckwheat have been cloned. Amino acid sequence analysis of studied fragments showed the highest identity to rhabdoviral RNA-polymerase (32–36%) for clones pVBB.47 and pVBB.62, while for clones pVBB.51, pVBB.71, pVBB.83 the similarity to rhabdoviral glycoprotein and nucleocapsid proteins was noticed. The coverage of homologous regions made out approximately 60%.

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

*Інститут молекулярної біології та генетики НАН України,
Україна, 03680, Київ, вул. Заболотного, 150; e-mail: pidpala@ukr.net*

ПОГЛЯД НА ЕВОЛЮЦІЮ *HOMINOIDEA* НА ОСНОВІ РОЗПОДІЛУ IS-ФРАГМЕНТІВ У мтДНК

Гоміноїди (*Hominoidea*, *Anthropomorpha*) — надродина вузьконосих мавп, до яких належать людиноподібні мавпи (гібони, орангутанги, горили, шимпанзе) і людина [1]. Визначено час дивергенції основних її гілок: близько 40 млн років тому гоміноїди відділились від *Cercopithecoidea* (собакоголових); одна із її гілок близько 30 млн років тому дала початок гомінідам; 20 млн років тому відділилась гілка гібонів; 16–13 млн. років тому — гілка орангутангів; 10 млн років тому — гілка горил; близько 7 млн років тому від предків сучасних шимпанзе відділилась гілка гомінін, яка трансформувалась у кілька видів людей [2–4]. Класифікація гоміноїдів не є усталеною. Час від часу вона зазнає змін і уточнень. Для вивчення філогенії та систематики широко використовують молекулярні маркери і серед них мітохондріальні ДНК (мтДНК) [5, 6] та мобільні генетичні елементи (МГЕ) [7, 8]. МГЕ, які індукують множинні мутації у ядерному геномі, у мітохондріях тварин, зокрема і у людини, не виявлені. Наявність фрагментів ретротранспозонів у мт-геномі описано у рослин (*Arabidopsis thaliana*) [9]. У мтДНК людини нами у попередній роботі ідентифіковано фрагменти МГЕ еукаріот і бактеріальних IS-елементів [10]. Метою даної роботи було з'ясувати, чи присутні вони у мтДНК інших гоміноїдів і чи можуть бути вони інформативними для філогенетичних досліджень.

Матеріали і методи

Проаналізовано 13 мтДНК 9 видів гоміноїдів, які належать до двох родин. Перелік видів і номери послідовностей мтДНК у GenBank наведено у табл. 1. Для пошуку та ідентифікації фрагментів МГЕ еукаріот використовували програму Censor (<http://www.girinst.org/censor>) [11], а для фрагментів бактеріальних IS-елементів користувались базою даних ISfinder (<http://www.is.biotoul.fr>) [12].

Результати та обговорення

В усіх мтДНК досліджуваних видів гоміноїдів виявлено фрагменти МГЕ еукаріот і бактеріальних IS-елементів (IS-фрагменти). Їхня частота становить 0,84–3,32% і 1,03–1,89%, відповідно. Стосовно фрагментів МГЕ еукаріот спостерігали велику гетерогенність. Для того, щоб простежити закономірність, пішли від зворотнього — прослідкували наявність специфічних для людини фрагментів у інших гоміноїдів (табл. 2). Виявили, що є фрагменти, які специфічні винятково для *Homininae* (горили, шимпанзе, людина), є специфічні для *Hominini* (шимпанзе, людина) і специфічні тільки для *Pongo sapiens*. Несподіваним було виявлення гомологічних фрагментів у *Pongo abeli* і *Homo* та у горил і людини (гаплотип L2). Гіпотетично це може свідчити про еволюційну близькість або про можливість схрещувань предкових (пере-

Таблиця 1

Види *Hominoidea*, мтДНК яких аналізували

Надродина	Родина	Вид	Реєстраційний номер послідовності мтДНК у GenBank
<i>Hominoidea</i> (Людиноподібні мавпи або гоміноїди)	<i>Hominoidea</i> (Гоміноїди)	<i>Homo sapiens</i>	NC_001807 NC_012920 AF381981
		<i>Homo sapiens neanderthalensis</i>	NC_011137
<i>Pan paniscus</i>		NC_001644	
<i>Pan troglodytes</i>		NC_001643 X93335 EU095335	
<i>Gorilla gorilla</i>		D38114	
<i>Gorilla gorilla gorilla</i>		X93347	
<i>Pongo abeli</i>		NC_002083	
	<i>Pongo pygmaeus</i>	NC_001646	
	<i>Hylobatidea</i> (Гібонові)	<i>Hylobates lar</i>	NC_002082

Таблиця 2

Наявність специфічних для *Homo sapiens* фрагментів еукаріотних МГЕ у мтДНК *Hominoidea*

Фрагменти еукаріотних МГЕ	Представники <i>Hominoidea</i>												
	<i>Hylobates lar</i>	<i>Pongo pygmaeus</i>	<i>Pongo abeli</i>	<i>Gorilla gorilla gorilla</i>	<i>Gorilla gorilla</i>	<i>Pan troglodytes</i> (EU095335)	<i>Pan troglodytes</i> (X93335)	<i>Pan troglodytes</i> (NC_001643)	<i>Pan paniscus</i>	<i>Homo sapiens neanderthalensis</i>	<i>Homo sapiens</i> (AF381981)	<i>Homo sapiens</i> (NC_012920)	<i>Homo sapiens</i> (NC_001807)
Sola2-2_SP			+							+	+	+	+
ROO_I				+	+						+		
ATGP3B_I				+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Copia-124_SB-I						+	+	+	+	+	+	+	+
OPIE2_LTR										+	+	+	+

хідних) форм. На анатомічну схожість між людиною та орангутангом вказував Дж. Шварц [13]. Є дані про випадки міжродових та міжвидових схрещувань у сучасних приматів [14–19]. Можливо, це мало місце і у древніх гоміноїдів [20–22]. Чи можна про це говорити на основі досліджень мтДНК,

<i>Hylobates lar</i>	<i>Pongo abeli</i>	X	<i>Gorilla gorilla</i>	<i>Pan troglodytes</i>	Y	<i>H. sapiens neandert.</i>	Z	<i>H. sapiens</i> (гаплотип L2)
ISAar32	ISAar32	ISAar32	ISAar32		ISAar32	ISAar32	ISAar32	ISAar32
ISAar10	ISAar10	ISAar10	ISAar10		ISAar10	ISAar10	ISAar10	ISAar10
						ISSsn5	ISSsn5	ISSsn5
						IS1678	IS1678	IS1678
				ISOih1	ISOih1	ISOih1	ISOih1	ISOih1
ISAcma26		ISAcma26	ISAcma26	ISAcma26	ISAcma26	ISAcma26	ISAcma26	ISAcma26
	ISTde1	ISTde1	ISTde1	ISTde1	ISTde1	ISTde1	ISTde1	ISTde1
	ISPa29	ISPa29	ISPa29	ISPa29	ISPa29	ISPa29	ISPa29	ISPa29
						ISMmy2	ISMmy2	ISMmy2
ISSth1	ISSth1	ISSth1	ISSth1	ISSth1	ISSth1	ISSth1	ISSth1	ISSth1
	IS1249	IS1249	IS1249	IS1249	IS1249	IS1249	IS1249	IS1249
IS1221H		IS1221H	IS1221H	IS1221H	IS1221H	IS1221H	IS1221H	IS1221H
IS1221E		IS1221E	IS1221E	IS1221E	IS1221E	IS1221E	IS1221E	IS1221E

Рис. Інсерційні профілі IS-фрагментів у мтДНК *Hominoidea*

Жирним шрифтом виділено гіпотетичні гібриди: X — *H. l. x P.a.*; Y — *G.g. x P.t.*; Z — *(G.g. x P.t.) x H.s.n.*

адже за класичними уявленнями вона передається по материнській лінії і не рекомбінує [23, 24]. Останнім часом це питання дискутується [25–30].

Аналізуючи наявність специфічних для людини IS-фрагментів у гоміноїдів (рис.), ми припускаємо, що перехідні форми могли бути гібридами. Підтвердження чи спростування такого твердження стане можливим при аналізі мтДНК викопних гоміноїдів. На сьогодні ми змогли проаналізувати лише мтДНК *Homo sapiens neanderthalensis*.

Висновки

У мтДНК досліджуваних гоміноїдів виявили фрагменти мобільних генетичних елементів еукаріот і бактеріальних IS-елементів. На підставі аналізу одержаних результатів припустили можливість схрещувань у перехідних форм людиноподібних мавп.

Література

1. Хрисантова Е.Н., Перевозчиков И.В. Антропология. М.: Изд-во МГУ, 2002.— 400 с.
2. Miller E.R., Gunnell G.F., Martin R.D. Deep time and the search for anthropoid origins // *Am. J. Phys. Anthropol.*— 2005.— №41.— P. 60–95.
3. Steiper M.E., Young N.H. Primate molecular divergence dates // *Mol. Phylogen. Evol.*— 2006.— Vol.41, №2.— P. 384–394.
4. Kunimatsu Y., Nakatsukasa M., Sawada Y. et al. A new Late Miocene great ape from Kenya and its implication for the origins of African great apes and human // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*— 2007.— Vol.104, №49.— P. 19220–19225.
5. Arnason U., Gullberg A., Janke A., Xu X. Pattern and timing of evolutionary divergences among hominoids based on analyses of complete mtDNA // *J. Mol. Evol.*— 1996.— Vol.43, №6.— P. 650–661.
6. Parendorf B., Stoneking M. Mitochondrial DNA and human evolution // *Ann. Rev. Genomics Hum. Genet.*— 2005.— Vol.6.— P. 165–183.
7. Schmitz J., Roos C., Zischler H. Primate phylogeny: molecular evidence from retroposons // *Cytogenet. Genome Res.*— 2005.— Vol.108, №1–3.— P. 26–37.

8. Liu G.E., Alkan C., Jiang L. et al. Comparative analysis of Alu repeats in primate genomes // *Genome Res.*— 2009.— Vol.19, №5.— P. 876–885.
9. Knoop V., Unseld M., Marienfeld J. et al. Copi-like, gypsy-like and LINE-like retrotransposon fragments in the mitochondrial genome of *Arabidopsis thaliana* // *Genetics.*— 1996.— Vol.142, №2.— P. 579–585.
10. Підпала О.В., Яцишина А.П., Лукаш Л.Л. Фрагменти бактеріальних IS-елементів і мобільних генетичних елементів еукаріотів у мтДНК людини // *Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології.*— 2007.— Т.1.— С. 498–502.
11. Kohany O., Gentles A.J., Hankus L., Jurka J. Annotation, submission and screening of repetitive elements in Repbase: RepbaseSubmitter and Censor // *BMC Bioinformatics.*— 2006.— Vol.7.— P. 474.
12. Signier P., Perochon J., Lestrade L. et al. ISfinder: the reference centre for bacterial insertion sequence // *Nucleic Acid Research.*— 2006.— Vol.34.— (Database issue): D32-36.
13. Schwartz J.H. The evolutionary relationships of man and orang-utans // *Nature.*— 1984.— Vol.308, №5959.— P. 501–505.
14. Bernstiel I.S. Naturally occurring primate hybrid // *Science.*— 1966.— Vol.154, №3756.— P. 1559–1560.
15. Sugawara K. Sociological study of a wild group of hybrid baboons between *Papio anubis* and *P. hamadryas* in the Awash Valley, Ethiopia // *Primates.*— 1979.— Vol.20, №1.— P. 21–56.
16. Tenaza R. Songs of hybrid gibbons (*Hylobates lar*×*H. muelleri*) // *Amer. J. Primat.*— 1984.— Vol.8, №3.— P. 249–253.
17. Jolly C.J., Woolley-Barker T., Beyene S. et al. Intergenic hybrid Baboons // *Inter. J. Primat.*— 1997.— Vol.18, №4.— P. 597–627.
18. Ackermann R.R., Rogers J., Cheverud J.M. Identifying the morphological signatures of hybridization in primate and human evolution // *J. Hum. Evol.*— 2006.— Vol.51, №6.— P. 632–645.
19. Ackermann R.R., Bishop J.M. Morphological and molecular evidence reveals recent hybridization between gorilla taxa // *Evolution.*— 2010.— Vol.64, №1.— P. 271–290.
20. Спицын В.А. Современные представления об эволюции отряда приматов в свете данных молекулярной биологии // *Биологическая эволюция и человек / Под ред. Я.Я. Рогинского.*— М.: Изд-во МГУ, 1989.— 240 с.
21. Patterson N., Richter D.J., Gnerre S. et al. Genetic evidence for complex speciation of humans and chimpanzees // *Nature.*— 2006.— Vol.441, №7097.— P. 1103–1108.
22. Evans P.D., Mekel-Bobrov N., Vallender E.J. et al. Evidence that the adaptive allele of the brain size gene microcephalin introgressed into *Homo sapiens* from an archaic *Homo* lineage // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*— 2006.— Vol.103, №48.— P. 18178–18183.
23. Anderson S., Bankier A.T., Barrell B.G. et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome // *Nature.*— 1981.— Vol.290, №5806.— P. 457–474.
24. Giles R.L., Blanc H., Cann H.M., Wallace D.C. Maternal inheritance of human mitochondrial DNA // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*— 1980.— Vol.77, №11.— P. 6715–6719.
25. Wallis G.P. Do animal mitochondrial genomes recombine? // *Trends Ecol. Evol.*— 1999.— Vol.14, №6.— P. 209–210.

26. Eyre-Walker A., Awadalla P. Does human mtDNA recombine? // J. Mol. Evol.— 2001.— Vol.53, №4–5.— P. 430–435.

27. Kravtsov Y., Schwartz M., Brown T.A. et al. Recombination of human mitochondrial DNA // Science.— 2004.— Vol.304, №5673.— P. 981.

28. Piganeau G., Gardner M., Eyre-Walker A. A broad survey of recombination in animal mitochondria // Mol. Biol. Evol.— 2004.— Vol.21, №12.— P. 2319–2325.

29. Tsaousis A.D., Martin D.P., Ladoukakis E.D. et al. Widespread recombination in published animal mtDNA sequences // Mol. Biol. Evol.— 2005.— Vol.22, №4.— P. 925–933.

30. White D.J., Gemmell N.J. Can indirect tests detect a known recombination event in human mtDNA? // Mol. Biol. Evol.— 2009.— Vol.26, №7.— P. 1435–1439.

Резюме

В мтДНК исследованных гоминидов выявили фрагменты эукариотических мобильных генетических элементов и бактериальных IS-элементов. На основании анализа полученных результатов предположили возможность скрещиваний у переходных форм человекоподобных обезьян.

In the mtDNA studied hominoids revealed fragments of eukaryotic mobile genetic elements and bacterial IS-element. Based on the analysis of the results, we suggested the possibility of interbreeding with transitional forms of apes.

**РЕЗНИКОВА И.С., СТЕПУРА В.В., ШЕЛЕВ А.В., СПИРИДОНОВ В.Г.,
МЕЛЬНИЧУК С.Д., АЛЫМОВ С.И.**

Украинская лаборатория качества и безопасности продукции АПК,

Украина, 08162, Киево-Святошинский р-н,

пгт Чабаны, ул. Машиностроителей, 7,

e-mail: reznikova_iren@mail.ru

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ДВУХ ПОПУЛЯЦИЙ БЕЛОГО ТОЛСТОЛОБА (*HYPOPHTHALMICHTHYS MOLITRIX* VAL.) И КАРПА (*CYPRINUS CARPIO* L.) С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ МАРКЕРОВ

Основным объектом рыбоводства в Украине, как и в большинстве стран является карп. Европейский одомашненный карп (*Cyprinus carpio* L.) по своему происхождению является объектом долгой доместикации сазана. Приблизительно 400 лет его выращивают в Китае и несколько столетий в Европе. Методами прямого и обратного скрещивания было выведено много пород и внутривидовых типов. Актуальным заданием для карповодства в Украине — выведение новых пород и внутривидовых типов украинского карпа, сохранение и закрепление генетически ценных существующих пород, сохранение генофонда редких массивов карпа, создание гетерогенных племенных стад, выведение новых региональных внутривидовых типов карпа. Белый толстолоб (*Hypophthalmichthys molitrix* Val.) является аборигенным

видом в Китае, в настоящее время выращивание ведется в различных регионах Азии и составляет 20% (больше 3 млн т.) мирового воспроизводства карповых рыб [1, 2]. Молодь (белого амура, белого и пестрого толстолобов) выловленная в р.Янцзы была завезена на территорию европейской части СССР в 1958 г. из КНР. С 1958 по 2006 гг. В Украине было получено 6 последовательных поколений селекций белого толстолоба на приспособленность к заводским технологиям [3]. С целью предупреждения инбредной депрессии и обновления генофонда завозили растительноядных рыб из КНР в 1972 г.— отловленных в р.Амур, а в 1986–1988 гг. И 1998 г.— заводского происхождения [4]. В тоже время следует отметить, что в течении последних десятилетий из-за продолжительного отсутствия в Украине целенаправленной четко отработанной стратегии селекционно-племенной работы с растительноядными рыбами в условиях искусственного воспроизводства и ограниченной интродукции из водоемов естественного ареала, возникла дестабилизация генетической структуры племенного материала данных видов рыб, к которым относится и белый толстолоб.

В настоящее время наиболее перспективными для популяционно-генетических исследований рыб являются молекулярно-генетические маркеры, в особенности микросателлитные локусы ДНК. Микросателлиты — это короткие тандемные повторы (STR) последовательностей состоящих из 2–6 пар нуклеотидов которые широко применяются в качестве маркеров генетического полиморфизма [5, 6]. Открытый в 80-х годах феномен полиморфизма длины мини- и микросателлитных последовательностей ДНК лег в основу молекулярно-генетического идентификационного анализа [7, 8].

В отечественной литературе почти отсутствуют данные о состоянии генетической структуры маточных стад белого толстолоба и карпа полученные на молекулярно-генетическом уровне. Изучение генетической дифференциации рыб дальневосточного комплекса (преимущественно азиатских популяций) проводились лишь несколькими зарубежными исследователями [9, 10]. Практически отсутствуют работы отечественных авторов, в которых были бы представлены сравнительные характеристики разных методов анализа с использованием ДНК-маркеров.

Целью данной работы было исследование генетической структуры маточных стад белого толстолоба и карпа; оценка характера генетических процессов в этих популяциях с помощью микросателлитных маркеров, определение частот аллелей, уровни их гетерозиготности, индекса полиморфизма (PIC) и вероятности исключения ошибочного совпадения аллелей (PE) — характерных для данных популяций.

Материалы и методы

Материалом для исследования служила ДНК, выделенная из фрагментов спинных плавников отобранных в период весенней бонитировки в 2009 г. от производителей белого толстолоба (Лиманское рыбководное хозяйство) и карпа (Черниговрыбхоз и Лиманское рыбководное хозяйство). Объектом

исследований были 13 особей белого толстолоба и 23 особи карпа. ДНК выделяли по стандартной методике с использованием набора “ДНК-сорб”.

В результате проведенного нами анализа литературных данных [9, 10] для проведения микросателлитного анализа были отобраны шесть праймеров наиболее подходящих для популяционных исследований карповых видов рыб. ПЦР-реакцию проводили в амплификаторе Applide Biosystems при следующих условиях: денатурация — 3 мин при 94°, отжиг — 30 с при 94°, 30 с при 60°, 30 с при 72° — 30 циклов, элонгация — 5 мин при 72°. Продукты амплификации денатурировали формамидом (Sigma) и разделяли методом капиллярного электрофореза на генетическом анализаторе “ABI Prism 3130” Genetic Analyzer (Applied Biosystem, США). Определение размеров аллелей осуществляли с помощью программы “Gene Mapper 3.7.” (Applied Biosystem, США) используя стандарт “Genescane-LIZ 500” (Applied Biosystem, США).

Оценку спектра и частот идентифицированных аллелей производили с помощью подсчета и анализа полученных генотипов. Индексы наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности (Hobs, Hexp), полиморфизма (PIC), а так же вероятности исключения ошибочного совпадения аллелей (PE) были рассчитаны при помощи программ Cervus 3.0.3 [11] и PowerStatsV12.

Результаты и обсуждение

В результате проведенной работы выявлено для обеих популяций общие аллельные варианты по локусу MFW7 — 190 и 192 п.н. (табл. 1). В популяции белого толстолоба данные аллельные варианты встречаются с частотой 0,115 и 0,423, соответственно, а в популяции карпа с частотой 0,370 и 0,152, соответственно.

Популяция белого толстолоба оказалась более консолидированной в сравнении с популяцией карпа по локусу MFW9, о чем свидетельствуют обнаруженные 12 аллельных вариантов по данному локусу в популяции (*Syr-rinus carpio* L.). Следует отметить, что общим для обеих популяций является аллельный вариант 115 п.н., который встречается с различной частотой (для белого толстолоба 0,231 и для карпа 0,152).

Подобная ситуация наблюдается и по локусу Hmo11 — в обеих популяциях выявлены одинаковые аллельные варианты — 142 и 154 п.н. Аллельный вариант 142 п.н. встречается в обоих видах приблизительно с одинаковой частотой (для белого толстолоба 0,077 и для карпа 0,043). Аллельный вариант 154 п.н. в популяциях белого толстолоба и карпа встречается с частотой 0,385 и 0,065 соответственно.

По локусу Hmo37 популяция карпа является более консолидированной в сравнении с популяцией белого толстолоба. Так, только у представителей белого толстолоба было выявлено аллельные варианты 142, 148, 172, 184 п.н. с частотами 0,154, 0,269, 0,038, 0,192 соответственно. Аллельный вариант 190 встречается в обеих популяциях с частотами для белого толстолоба 0,346 и для карпа 0,043

Расчет параметров гетерозиготности показал (табл. 2), что белый толстолоб имеет тенденцию к гетерозиготизации по локусу, Hmo11 (наблю-

Таблица 1

Количество и частота идентифицированных аллелей у белого толстолоба и карпа

Назв. локуса	Кол-во аллелей	Аллель/частота					
Белый толстолоб (n=13)							
MFW7	6	168 (0,077)	172 (0,038)	176 (0,077)	188 (0,269)	190 (0,115)	192 (0,423)
MFW9	5	91 (0,115)	115 (0,231)	119 (0,115)	121 (0,500)	131 (0,038)	-
Hmo11	3	142 (0,077)	146 (0,538)	154 (0,385)	-	-	-
Hmo37	5	142 (0,154)	148 (0,269)	172 (0,038)	184 (0,192)	190 (0,346)	-
Карп (n=23)							
MFW7	4	190 (0,370)	192 (0,152)	264 (0,326)	266 (0,152)	-	-
MFW9	12	81 (0,130)	83 (0,022)	85 (0,109)	87 (0,109)	89 (0,022)	95 (0,065)
		109 (0,022)	111 (0,022)	113 (0,022)	115 (0,152)	117 (0,174)	125 (0,152)
Hmo11	6	142 (0,043)	154 (0,065)	158 (0,739)	162 (0,087)	166 (0,022)	170 0,043
Hmo37	2	184 (0,478)	190 (0,043)	-	-	-	-

Таблица 2

Индексы гетерозиготности, полиморфизма и вероятности исключения случайного совпадения аллелей для микросателлитных маркеров белого толстолоба и карпа

Название локуса	Белый толстолоб (n=13)					Карп (n=23)					
	Кол-во аллелей	Hobs	Hexp	PIC	PE	Кол-во аллелей	Hobs	Hexp	PIC	PE	
MFW7	6	0,692	0,751	0,682	0,416	4	0,957	0,727	0,658	0,912	
MFW9	5	0,385	0,695	0,625	0,105	12	0,696	0,896	0,863	0,422	
Hmo11	3	0,923	0,578	0,465	0,843	6	0,130	0,447	0,420	0,014	
Hmo37	5	0,308	0,794	0,725	0,543	2	0,000	0,510	0,375	0,000	
Среднее	4,75	0,577	0,704	0,624	0,476	6	0,445	0,645	0,579	0,337	
CPE					0,962	CPE					0,950

даемая гетерозиготность (0,933) выше ожидаемой (0,578)), а у карпа — по локусу MFW7 (0,447, соответственно). По остальным же локусам, как и по все панели в целом, как видно из табл. 2 по средним популяционным значениям показателей гетерозиготности (Hobs, Hexp) оба вида выявляют тенденцию к гомозиготизации.

Рассчитанные для обеих исследованных популяций индексы полиморфизма (PIC) свидетельствуют о высоком уровне полиморфизма данных видов ($PIC > 0,550$). По локусу MFW9 более полиморфной была популяция карпа. По локусам MFW7, Hmo11, Hmo37 в частности, как и по всей панели в целом, популяция белого толстолоба характеризовалась более высоким уровнем полиморфизма, несмотря на то, что в популяции карпа выявлено большее количество аллельных вариантов.

Проведенные исследования дают возможность сделать выводы касательно информативности, как отдельных праймеров, так и выбранной панели в целом. В популяции белого толстолоба высокое значение вероятности исключения ошибочного совпадения аллелей (PE ($PE > 600$)) зафиксировано для локуса Hmo11 (0,843), в популяции карпа высокие значения PE зафиксировано для локуса MFW7 (0,912). Для остальных локусов в популяции белого толстолоба и карпа характерны низкие показатели вероятности исключения случайного совпадения аллелей. Комбинированная вероятность исключения случайного совпадения аллелей (CPE) для популяции белого толстолоба составила 0,962 (96,2%), для популяции карпа — 0,950 (95,0%), что свидетельствует о высоком уровне информативности выбранной панели микросателлитных маркеров для популяционных исследований белого толстолоба и карпа.

Выводы

В результате проведенных исследований генетической структуры популяций маточных стад белого толстолоба и карпа с использованием микросателлитных маркеров установлены отличия в генетической структуре по частотам и количеству аллелей, которые определены маркерами MFW7, MFW9, Hmo11, Hmo13, Hmo34, Hmo37.

Проведенные исследования показали, что исследованная популяция белого толстолоба является более консолидированной по локусам MFW7 и Hmo11 и более гетерогенной по локусам MFW7 и Hmo37. В каждом из исследованных микросателлитных локусов ДНК определено ряд аллельных вариантов которые являются общими для представителей обоих видов. В тоже время, данная работа показала и отличия между данными видами. Так для белого толстолоба характерны аллельные варианты с меньшим количеством повторов по локусу MFW7 (168–192 п.н.), Hmo37 (142–190 п.н.), Hmo11 (142–154 п.н.) и большим количеством по локусу MFW9 (91–131 п.н.).

Использование предложенной микросателлитной панели маркеров для генотипирования карповых видов рыб, в частности белого толстолоба и карпа дает дополнительные возможности для проведения комплексной оценки видов, которые используются в Украине, а так же для контроля качества племенного материала.

Данная работа является первой в ряде запланированных исследований генетической структуры популяций разных видов, пород и внутривидовых типов рыб.

Литература

1. Gyeyas A.A. Characterization of microsatellite loci in silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*), and cross-amplification in other cyprinid species/ A.A. Gyeyas, M. Cairney, A.E. Gilmour, M.A. Sattar, T.K. Dass, B.J. McAndrew, D.J. Penman, J.B. Taggart // *Molecular Ecology Notes*.— 2006.— Vol.6.— P. 656–659.
2. FAO –Fish stat Plus, version 2.30 / Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.— 2005.— Режим доступа: <http://www.fao.org/fi/statist/FISOFT/FISHPLUS/asp>.
3. Шерман І.М. Селекція і промислова гібридизація в рибицтві. Рослиноідні риби // Організація селекційно-плеємінної роботи в рибицтві.— К.— 2006.— С. 79–115.
4. Богерук А.К. Каталог пород, кроссов и одомашненных форм рыб России и СНГ/ А.К. Богерук, Н.Ю. Евтихина, Ю.И. Ильясов.— М., 2001.— 208 с.
5. Алтухов Ю.П. Балансирующий отбор как возможный фактор поддержания единообразия аллельных частот ферментных локусов в популяциях тихоокеанского лосося — горбуши *Oncorhynchus gorbuscha* (Walbaum) // *Генетика*, 1987.— Т.23.— №10.— С. 1884–1896.
6. Животовский Л.А. Селективные процессы по ферментным локусам у горбуши *Oncorhynchus gorbuscha* (Walbaum) // *Генетика*, 1987.— Т.23.— №10.— С. 1876–1883.
7. Иванов П.Л. Использование индивидуализирующих систем на основе полиморфизма длины амплифицируемых фрагментов (ПДАФ) ДНК в судебно-медицинской экспертизе идентификации личности и установления родства. Методические указания №98/253 // *Судебно-медицинская экспертиза*.— 1999, №5.— С. 35–41.
8. Калнина О.В., Калнин В.В. Новые возможности молекулярных маркеров в популяционных исследованиях // Молекулярно-генетические маркеры животных: тез. док. I Международной конференции по молекулярно-генетическим маркерам животных, 27–29 ян. 1994 г.— К.: Аграрна наука, 1994.— С. 57–58.
9. Gheyas A.A., Cairney M. Characterization of microsatellite loci in silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*), and cross-amplification in other cyprinid species // *Molecular Ecology Notes*.— 2006.— №6.— P. 656–659.
10. Gen Hua Yue, Mei Yin Hoa, Laszlo Orbana. Microsatellites within genes and ESTs of common carp and their applicability in silver crucian carp// *Aquaculture*.— 2004.— Vol.234.— P. 85–98.
11. Marshall T.C., Slate J., Kruuk L., Pemberton J.M. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations // *Mol. Ecol.*— 1998.— 7.— P. 639–655.

Резюме

Проведены исследования генетической структуры популяций белого толстолоба и карпа с использованием микросателлитных маркеров. Установлен ряд видоспецифических особенностей размеров аллелей исследованных микросателлитных локусов ДНК MFW7, MFW9, Hmo11, Hmo37.

Проведені дослідження генетичної структури популяцій білого товстолоба та коропу за використанням микросателітних праймерів. Встановлено ряд видоспецифічних відмінностей розмірів алелей генетичних локусів MFW7, MFW9, Hmo11, Hmo37.

Microsatellite analysis of two populations silver carp and common carp was carried out in order to detect inter species polymorphism. It was found the species differences in alleles range of analyzed loci in MFW7, MFW9, Hmo11 and Hmo37.

МЕХАНІЗМИ ВЗАЄМОДІЇ ТА ЕКСПРЕСІЇ ГЕНЕТИЧНИХ СИСТЕМ

ДУБОВЕЦ Н.И., БОНДАРЕВИЧ Е.Б., СОЛОВЕЙ Л.А., ШТЫК Т.И.,
СЫЧЕВА Е.А.

Институт генетики и цитологии НАН Беларуси,

Беларусь, 220072, Минск, ул. Академическая, 27, e-mail: N.Dubovets@jgc.bas-net.by

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТОВ ИНТРОГРЕССИИ ХРОМОСОМ D-ГЕНОМА ПШЕНИЦЫ НА ПРОДУКТИВНОСТЬ КОЛОСА РЕКОМБИНАНТНЫХ ФОРМ ГЕКСАПЛОИДНЫХ ТРИТИКАЛЕ

Ранее нами были получены данные, свидетельствующие о перспективности синтеза гексаплоидных тритикале с множественными D(A)- и D(B)-замещениями хромосом [1, 2]. Было показано, что формы, содержащие 3–4 межгеномных замещения, характеризуются высокой цитологической стабильностью и, как следствие этого, сохраняют в своем кариотипе интродуцированные хромосомы D-генама в ряду последующих поколений, имеют более высокое содержание белка и улучшенное качество клейковины. В то же время по основным показателям продуктивности формы с реконструированным кариотипом (вне зависимости от количества пар замещенных хромосом), как правило, уступали “чистым” гексаплоидным тритикале. В связи с этим на линейном материале были начаты работы по исследованию эффектов различных типов модификаций ядерного генома тритикале на экспрессию признаков продуктивности.

Материалы и методы

Материалом для исследования послужили линии гексаплоидных тритикале с D(A)- и D(B)-замещениями хромосом, выделенные из гибридного материала от скрещивания различных форм 8х- х 4х-тритикале (таблица).

Комбинация скрещивания	Линия	Типы межгеномных замещений хромосом
25АД20 х ПРАТ21	М I(1)-1	1D(1A), 2D(2B), 6D(6B)
	М I(1)-2	1D(1A), 2D(2B)
	М II(3)-1	1D(1A), 2D(2B), 3D(3A), 6D(6B)
	М II(3)-2	1D(1A), 2D(2B), 3D(3A) и 6D(6A)
	MY(5)-1	1D(1A), 2D(2B) (T5RS.5AL)
	MY(5)-2	1D(1A), 2D(2B)
ПРАО1 х ПРАТ72	4(2)-1	1D(1A), 2D(2A), 4D(4B), 7D(7A)
	4(2)-2	2D(2A), 4D(4B), 7D(7A)
ПРАД20 х ПРАТ72	8	1R(1A), 3D(3B), 4D(4B)

Гибридный материал был маркирован с использованием молекулярно-цитогенетических маркеров (С-бэндов) [3].

Результаты и обсуждение

Для оценки возможных эффектов интрогрессии в кариотип тритикале пары хромосом 6D было проведено сравнительное исследование линий MI(1)-1 и MI(1)-2, первая из которых содержала 1D(1A), 2D(2B) и 6D(6B), а вторая — 1D(1A) и 2D(2B)-замещения хромосом.

По морфологическим признакам колоса линии отличаются друг от друга незначительно (рисунок 1). Можно лишь отметить, что у линии MI(1)-1 в меньшей степени выражена остистость и наблюдается более выраженное сужение колоса к вершине, что присуще колосьям веретеновидной формы. Кроме того, линия MI(1)-1 характеризуется более плотным колосом: среднее значение этого показателя у нее равно 2,43 против 2,17 у линии MI(1)-2. Различия по длине колоса между линиями недостоверны.

Достоверные различия между линиями наблюдались по таким показателям продуктивности колоса, как число колосков в колосе (при $P < 0,001$), число цветков в колосе ($P < 0,05$) и количество зерен в колосе ($P < 0,01$). Среднее значение первого показателя выше у линии с тремя замещениями ($27,17 \pm 0,33$ против $23,56 \pm 0,23$), а второго и третьего — у линии с двумя замещениями ($78,03 \pm 1,87$ и $72,83 \pm 1,18$; $46,13 \pm 1,55$ и $41,1 \pm 1,06$). Линия MI(1)-2 характеризуется также лучшей озерненностью колоса (59,12 против 56,4) и лучшей массой 1000 зерен (47,4 против 43,1).

На основании полученных данных можно сделать вывод, что присутствие в кариотипе гексаплоидных тритикале 6D(6B)-замещения хромосом в определенной степени оказывает негативное влияние на экспрессию ряда признаков продуктивности растений. Отмеченный негативный эффект может быть вызван как интрогрессией пары хромосом 6D, так и удалением из кариотипа растений пары хромосом 6B. Для выяснения вопроса, какое из этих двух событий наиболее значимо, было проведено сравнительное исследование линий MII(3)-1 и MII(3)-2, содержащих три идентичных замещения



Рис. 1. Зрелые колосья линий
а) MI(1)-1; б) MI(1)-2



Рис. 2. Зрелые колосья линий
а) MII(3)-1; б) MII(3)-2



Рис. 3. Зрелые колосья линий
а) №4(2)-1; б) №8; в) MIII(2)

[1D(1A), 2D(2B), 3D(3A)] и различающихся по четвертому — у первой линии хромосома 6D заменила 6B, а у второй — 6A.

Различия между этими линиями (в отличие от двух предыдущих) проявлялись уже на уровне морфологических признаков колоса. Колосья первой линии имели красную окраску и цилиндрическую форму, в то время как колосья второй линии были белыми веретеновидной формы (рисунок 2). При практически одинаковой плотности колоса (2,16 и 2,12) высоко достоверные различия (при $P < 0,001$) наблюдались по длине колоса: у линии МП(3)-1 среднее значение этого признака составило $10,32 \pm 0,16$, а у линии МП(3)-2 — $11,25 \pm 0,12$. При таком же уровне значимости достоверные различия отмечены по остальным признакам продуктивности колоса (число колосков в колосе, число цветков в колосе, количество зерен в колосе, озерненность колоса). При этом линия с 6D(6A)-замещением хромосом по всем этим показателям превосходила линию с 6D(6B)-замещением. Единственное исключение составил признак “масса 1000 зерен”, который у первой линии был равен 47,0 г, а у второй — 37,4 г. Изложенное свидетельствует о том, что снижение продуктивности растений линии МП(1)-1 не связано с наличием дополнительной пары хромосом 6D, а является следствием отсутствия в их кариотипе пары хромосом 6B. Исходя из этого можно сделать вывод о том, что интрогрессию в кариотип гексаплоидных тритикале хромосомы 6D предпочтительнее осуществлять в виде 6D(6A)-замещения.

Определенный интерес для нас представляло также исследование эффектов присутствия в кариотипе 6х-тритикале хромосомы 4D. Известно, что хромосомы четвертой гомеологической группы пшеницы содержат гены, ответственные за высоту растений: на хромосоме 4A расположен ген *Rht 1*, на хромосоме 4D — *Rht 2*. Рecessивные аллели этих генов наиболее широко используются в селекции на короткостебельность. При этом показано, что объединение их в одном генотипе приводит к суммированию положительного эффекта. Отмечается также, что при таком объединении наибольший вклад в сокращение высоты растений и одновременное удлинение колоса вносит локализованный на хромосоме 4D ген *Rht 2* [4].

В нашем материале у трех линий (4(2)-1, 4(2)-2 и 8) хромосома 4D замещает 4B. Эффекты такого замещения могут быть как положительными, так и отрицательными, в зависимости от аллельных вариантов присутствующих в линиях генов *Rht*.

Проведенное исследование показало, что у всех трех вышеперечисленных линий наблюдается существенное увеличение длины колоса растений, что особенно характерно для линий 4(2)-1 и 4(2)-2, имевших среднее значение этого признака на 4–5 см выше, чем у линий из комбинации скрещивания 25АД20 х ПРАТ 21. В то же время обе линии характеризовались низким значением показателя “плотность колоса” (1,78 и 1,85), что, безусловно, отразилось на проявлении таких признаков, как количество зерен в колосе и масса зерна с колоса. Последняя у обеих линий едва превысила 1 г. Посред-

ственным оказалось также значение такого важного в селекционном плане показателя, как масса 1000 зерен — 30,6 и 31,2.

У линии 8 значение признака “длина колоса” было в среднем на 1,5–3 см больше, чем у линий из комбинации скрещивания 25АД20 х ПРАТ 21, но на 2–3 см ниже, чем у 4(2)-1 и 4(2)-2 (рисунок 3). Несмотря на некоторое увеличение плотности колоса, линия характеризовалась более низкими (по сравнению с линиями 4(2)-1 и 4(2)-2) значениями таких показателей, как число колосков в колосе ($25,83 \pm 0,40$ против $27,53 \pm 0,26$ и $27,33 \pm 0,24$), число цветков в колосе ($80,23 \pm 1,58$ против $87,40 \pm 1,43$ и $84,50 \pm 1,51$), количество зерен в колосе ($28,97 \pm 2,22$ против $35,73 \pm 2,58$ и $35,80 \pm 2,69$). Масса зерна с колоса в среднем составила 0,83 г, а масса 1000 зерен — 28,8 г. Столь низкие показатели продуктивности этой линии, скорее всего, связаны с наличием четырех доз хромосомы 1R.

Полученные данные свидетельствуют о том, что интрогрессия в кариотип 6х-тритикале хромосомы 4D приводит к существенному увеличению длины колоса, однако, положительной корреляции между этим признаком и продуктивностью колоса в нашем материале не отмечено. К тому же у исследованных форм наблюдается увеличение высоты растений, вследствие чего они склонны к полеганию. Отмеченные эффекты можно объяснить тем, что использованные в скрещиваниях отцовские формы октоплоидных тритикале (доноры хромосом D генома) содержат доминантный аллель гена *Rht 2*.

Исходя из того, что у тритикале структурные перестройки между хромосомами пшеницы и ржи являются довольно редким событием, определенный интерес представляло сравнительное исследование линий MY(5)-1 и MY(5)-2, содержащих 1D(1A)- и 2D(2B)-замещения и различающихся по наличию у первой линии пары aberrантных T5RS.5AL хромосом. Обнаруженная в гибридном материале aberrантная хромосома образовалась в результате центрического слияния двух телосом — 5RS и 5AL, которые, в свою очередь, возникли вследствие misdivision унивалентных хромосом в анафазе мейоза. В итоге мы имеем линию, тетрасомную по короткому плечу хромосомы 5R и нуллисомную по короткому плечу хромосомы 5A. Произошедшие структурные преобразования хромосом не отразились на экспрессии морфологических признаков растений, но оказали определенное негативное влияние на их продуктивность. Линия MY(5)-2 имела достоверно более высокие (при $P < 0,01$) показатели длины колоса ($9,48 \pm 0,25$ против $8,5 \pm 0,2$), числа колосков в колосе ($22,2 \pm 0,37$ против $20,5 \pm 0,37$), числа цветков в колосе ($61,03 \pm 1,67$ против $54,2 \pm 1,41$) и количества зерен в колосе ($44,07 \pm 1,83$ против $37,53 \pm 0,94$). Единственным исключением, как и в случае с двумя предыдущими линиями, явилась масса 1000 зерен — у линии с aberrантной хромосомой она оказалась выше (50,9 г против 47,6 г), что, скорее всего, связано с более низкой озерненностью колоса. Следует, однако, отметить тот факт, что по ряду признаков продуктивности линия MY(5)-1 ничуть не уступала и даже превосхо-

дила некоторые замещенные линии из комбинации скрещивания 25АД20 х ПРАТ 21.

Выводы

Представленные выше результаты исследований с одной стороны наглядно демонстрируют возможность использования созданного нами линейного материала для изучения эффектов интрогрессии хромосом D-генома пшеницы в кариотип 6х-тритикале, а с другой стороны свидетельствуют о том, что межгеномные замещения могут иметь значимый эффект на проявление не только качественных, но и полигенно наследуемых количественных признаков. Полученную информацию следует учитывать в работах по интрогрессивной гибридизации при разработке стратегии реконструкции кариотипа тритикале с целью улучшения ряда хозяйственно-полезных признаков культуры.

Литература

1. Дубовец Н.И., Дымкова Г.В., Сычева Е.А., Соловей Л.А., Штык Т.И. О перспективности синтеза гексаплоидных тритикале с множественными межгеномными замещениями хромосом пшеницы // “Проблемы производства продукции растениеводства и пути их решения”. Материалы международной научно-практ. юбилейной конфер., посвящ. 160-ти летию БСХА. Горки. 7–9 июня 2000.— С. 212–216.

2. Dubovets N.I., Dymkova G.V., Solovej L.A., Shtyk T.I., Bormotov V.E. A study on spring hexaploid triticales with mixed wheat component of karyotype // Proc. 5th International Triticale Symposium, Poland.— 2002.— P. 303–310.

3. Бадаев Н.С., Бадаева Е.Д., Большева Н.Л., Зеленин А.В. Идентификация хромосом А и D геномов пшеницы с использованием замещений и перестроек между гомеологами у пшеницы и тритикале // Докл. Акад. Наук СССР. 1983.— Т.273, №4.— С. 994–996.

4. Worland, T., J.W. Snape. Genetic basis of worldwide wheat varietal improvement // The world wheat book: A history of wheat breeding, Lavoisier Publishing, Paris.— 2001.— P. 59–100.

Резюме

Проведен сравнительный анализ основных элементов продуктивности колоса у линий тритикале с разными типами межгеномных замещений хромосом. Показано, что в работах по реконструкции ядерного генома растений методами хромосомной инженерии следует уделять внимание не только эффектам интродуцированных хромосом, но и учитывать последствия удаления из кариотипа соответствующих гомеологов.

A comparative analysis of basic spike productivity elements was made in triticales lines with various types of intergenomic chromosome substitutions. It was shown that in research works on reconstruction of plant nuclear genome by chromosome engineering methods, attention should be paid to not only effects of introduced chromosome but also to consequences of removing appropriate homeologs from the karyotype.

ДЬЯЧЕНКО Л.Ф.¹, ТОПТИКОВ В.А.¹, ТОЦКИЙ В.Н.¹, СИЧКАРЬ В.И.²,

¹Одесский национальный университет им. И.И. Мечникова

Украина, 65058, Одесса, Шампанский пер., 2, e-mail: diachenkolff@mail.ru

²Селекционно-генетический институт НААНУ,

Украина, 65036, Одесса, Овидиопольская дор., 3

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКИХ СПЕКТРОВ ЭСТЕРАЗЫ ЛИСТЬЕВ В ОНТОГЕНЕЗЕ СОИ

Соя — одно из самых важных сельскохозяйственных растений благодаря высокому содержанию в ней белка, жира и ее способности фиксировать атмосферный азот [1]. В перспективе она может стать одной из главных культур в Украине [2]. Жизненный цикл сои состоит из нескольких этапов, которые регулируются как внешними факторами (питание, длина дня, интенсивность и качество света, температура), так и внутренними составляющими, которые находятся под контролем растительных гормонов [3]. На каждом этапе онтогенеза создается база для успешного прохождения последующего этапа роста и развития, при этом компенсировать недостатки предыдущего этапа практически невозможно [4]. Все эти процессы обеспечиваются дифференциальной экспрессией генетических систем. Ранее было показано динамичное изменение экспрессивности значительной части изоформ пероксидазы в онтогенезе сои [5]. Целью данной работы явилось изучение онтогенетических особенностей экспрессивности разных изоформ эстеразы.

Материалы и методы

Материалом служили 20 сортов сои, из которых 9 условно обозначили как “скороспелые” (Устя, Медея, Юг-30, Диона, Л-2 (Орел), Валентиа, Блискавица, Аннушка, Спринт — период вегетации 85–95 дней), а 11 — “раннеспелые” (Аметист, Елена, Марьяна, Селекта, Киевская 98, Припять, Рось, Романтика, Степовичка, Ксения, Георгина) — продолжительность вегетации 95–110 дней.

Листья для экстракции эстеразы отбирали на трех стадиях развития растений: I — появление первого тройчатого листа, II — начало цветения, III — начало созревания бобов. Для исключения влияния фактора старения листа для анализа фермента отбирали самый последний развернутый лист. Экстрагирование, разделение в полиакриламидном геле и визуализацию эстеразы проводили по ранее описанным методикам [6–7]. Анализ электрофореграмм проводили по компьютерной программе АнаИС, с помощью которой для каждой изоформы определяли удельный вес, площадь и интенсивность окрашивания (в условных единицах — пикселях) соответствующих полос. Статистическую обработку данных проводили в Excel. Оценку внутреннего разнообразия спектров проводили по формуле [8]:

$$K_D = \log_2 N / \sum p_i^2,$$

где K_D — показатель разнообразия спектра, N — количество фракций в спектре, p_i — удельный вес в спектре каждой фракции, выраженный в долях.

Результаты и обсуждение

В данном исследовании изучали динамику средне- и быстроподвижных фракций эстераз листьев сои. Всего таких форм на трех вышеуказанных этапах развития растений выявилось восемь, их электрофоретическая подвижность Rf варьировала в пределах 0,46–0,67. На электрофореграммах различные полосы окрашивались с разной интенсивностью, что свидетельствовало о неодинаковой экспрессивности отдельных форм фермента. На рис. 1 представлена денситограмма листовых эстераз сорта Диона. Видно, что экспрессивность форм эстеразы листьев в начале цветения растений существенно больше по сравнению с экспрессивностью фермента на двух других этапах их развития. На каждом из этапов выявляется от одной до трех форм эстеразы с высокой экспрессивностью. В тканях первого тройчатого листа у сорта Диона максимальной экспрессивностью характеризуется быстроподвижная форма Est 2 с Rf 0,64. В начале цветения сильнее других экспрессируется менее подвижная форма Est 4 с Rf 0,58, а также увеличена по сравнению с III этапом экспрессия Est 6 с Rf 0,53 и Est 7 с Rf 0,5. В начале созревания бобов экспрессивность листовых эстераз наименьшая.

Приблизительно такие же электрофореграммы эстераз с небольшими вариациями наблюдаются и у других исследованных сортов. На стадии первого настоящего тройчатого листа практически у всех сортов (18 из 20) сильнее других экспрессируется Est 2. Исключение составили сорта Киевская 98 и Георгина, у которых максимальная экспрессивность отмечена у изоформ Est 4 и Est 3 соответственно.

На стадии начала цветения растений, как уже отмечено ранее, повышена экспрессивность практически всех изоформ эстеразы. Максимальная экспрессивность наблюдается у изоформ: Est 1 (4 сорта), Est 2 (11 сортов), Est 3 (8 сортов), Est 4 (7 сортов), Est 6 (3 сорта). При этом почти у половины

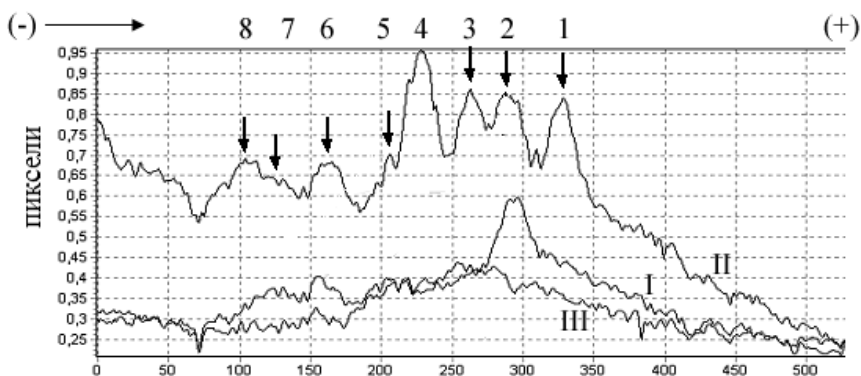
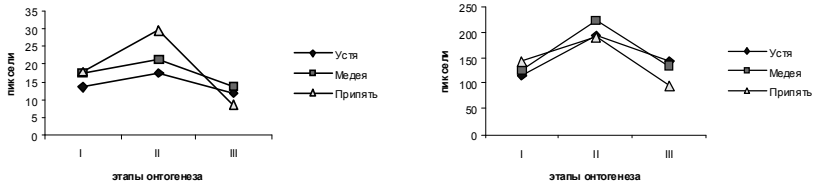


Рис. 1. Денситограмма электрофоретических спектров эстеразы листьев сои на разных этапах онтогенеза растений (сорт Диона). I, II, III — этапы онтогенеза растений



А Б
Рис. 2. Динамика экспрессивности эстеразы листьев сои. А — Est 4, С — суммарная экспрессивность

Таблица 1

Удельный вес (%) форм эстеразы листьев на разных этапах развития растений сои

№ изоформы	Rf	I стадия	II стадия	III стадия
1	0,67	16,12 ± 0,43	15,77 ± 0,48	16,12 ± 0,47
2	0,64	15,99 ± 0,37	13,77** ± 0,40	13,73** ± 0,36
3	0,61	12,36 ± 0,29	12,75 ± 0,40	12,47 ± 0,37
4	0,58	13,16 ± 0,34	11,55** ± 0,40	10,97** ± 0,32
5	0,56	11,13 ± 0,24	10,56 ± 0,25	10,69 ± 0,34
6	0,53	10,31 ± 0,34	14,11** ± 0,32	10,08^^ ± 0,53
7	0,50	9,89 ± 0,28	11,44** ± 0,28	11,29* ± 0,39
8	0,46	11,02 ± 0,34	10,04 ± 0,37	14,63**^^ ± 0,52

Примечание: n = 20 сортов, * — $P \leq 0,05$, ** — $P \leq 0,005$ при сравнении с такой же изоформой на I стадии, ^ — $P \leq 0,05$, ^^ — $P \leq 0,005$ при сравнении с такой же изоформой на II стадии.

исследованных сортов сои максимально экспрессируется не одна, а две и даже три изоформы эстеразы.

На стадии начала созревания бобов наиболее активны Est 2 и Est 3 (у 11 сортов), хотя у отдельных сортов активируются менее подвижные формы эстеразы — Est 6 и Est 7 (сорта Елена, Селекта, Рось).

Представленная на рис. 2 динамика изменений экспрессивности формы Est 4 и суммарной экспрессивности эстеразы у трех исследованных сортов сои показывает однозначную направленность изменений этих показателей в онтогенезе растений.

В табл. 1 представлено процентное содержание каждой изоформы эстеразы на трех стадиях развития растений. Видно, что по сравнению со стадией появления первого тройчатого листа на более поздних стадиях развития достоверно снижается удельный вес форм Est 2 и Est 4, но одновременно возрастает удельный вес Est 7. Увеличение доли Est 6 (37%) наблюдается только на этапе II, на III этапе эта величина снижается, оставаясь все же больше, чем на I этапе наблюдений. Удельный вес Est 8 возрастает на 33% только на стадии созревания бобов.

Изменения экспрессивности эстеразы листьев в процессе онтогенеза более значительны (табл. 2). На стадии начала цветения по сравнению со

Таблица 2

Экспрессивность (условные единицы) форм эстеразы листьев на разных этапах развития растений сои

№ изоформы	Rf	I стадия	II стадия	III стадия
1	0,67	20,48 ± 0,99	27,34** ± 1,57	17,87*^^ ± 0,70
2	0,64	20,45 ± 1,04	23,72*± 1,14	15,41***^ ± 0,74
3	0,61	15,63 ± 0,65	21,96** ± 1,07	13,94^^ ± 0,66
4	0,58	16,85 ± 0,96	19,80* ± 0,93	12,20***^ ± 0,50
5	0,56	14,06 ± 0,50	18,04** ± 0,64	12,08*^^ ± 0,77
6	0,53	12,97 ± 0,51	24,12** ± 0,80	11,49^^ ± 0,96
7	0,50	12,45 ± 0,46	19,62** ± 0,76	12,66^^ ± 0,70
8	0,46	13,88 ± 0,53	17,27** ± 0,87	16,08** ± 0,46
Σ		126,77 ± 4,62	171,86** ± 5,90	111,72*^^ ± 4,16

Примечание: обозначения, как в табл. 1. Σ — суммарная экспрессивность.

стадией I экспрессивность всех без исключения изоформ эстеразы сои достоверно возрастает в пределах 20–80%, что приводит к увеличению суммарной активности фермента на 36%. На III стадии экспрессивность всех форм фермента снижается, однако при этом она не возвращается до состояния, наблюдавшегося на I стадии развития растений сои. В начале созревания бобов экспрессивность пяти изоформ эстеразы достоверно отличается от их экспрессивности на стадии I и семи изоформ на стадии II.

Сравнительный анализ удельного веса изоформ эстеразы двух групп сортов сои, различающихся длительностью периода вегетации примерно на 10 дней, показал, что достоверные различия этого показателя наблюдаются в единичных случаях. Так, на I стадии онтогенеза у скороспелых сортов по сравнению с раннеспелыми достоверно ниже доля Est 3 ($P_d \leq 0,005$), на II стадии — выше доля Est 1 ($P_d \leq 0,05$), на III — выше доля Est 3 ($P_d \leq 0,05$). Достоверное различие экспрессивности эстеразы двух сравниваемых групп сортов сои выявлено только на ранней стадии развития растений — экспрессивность Est 1 и Est 2 больше у скороспелых сортов.

Сложность спектра, оцениваемая по показателю внутреннего разнообразия K_D , свидетельствует об уровне контроля над экспрессией исследуемого фермента. Значения данного показателя изменялись в ходе индивидуального развития растений и различались у растений сортов, отличавшихся скоростью развития. Достоверные различия между исследуемыми группами сортов сои проявлялись только на I стадии онтогенеза ($P=0,005$). На последующих этапах развития сложность спектров эстеразы у скоро- и раннеспелых сортов изменялась в разных направлениях. В первой группе сортов величина K_D в ходе развития растений возрастала и на III этапе достоверно отличалась от начального значения ($P=0,025$), у раннеспелых сортов — наоборот, снижалась ($P=0,045$). Это свидетельствует о разнонаправленности изменений системы генетического и эпигенетического контроля экспрессии

исследуемых эстераз в ходе онтогенеза у растений сои с разной скоростью развития.

Выводы

1. Удельные веса отдельных форм и в значительно большей степени экспрессивность изоформ эстеразы динамично изменяются в зависимости от стадии развития сои.

2. Максимальная экспрессивность исследуемых изоформ эстеразы наблюдается в начале цветения растений.

3. Наибольшие различия экспрессивности листовых эстераз скоро- и раннеспелых сортов сои наблюдаются на ранней стадии развития растений.

Литература

1. Schmutz J., Cannon S.B., Schluter J. et al., Genome sequence of the palaeopolyploid soybean // Nature.— 2010.— №463.— P. 178–183.

2. Бабич А.О., Бабич-Побережна А.А. Селекція і виробництво сої в Україні: Монографія.— К.: ФОП Данилюк В.Г., 2008.— 216 с.

3. Baurle J., Dean C. The Timing of Developmental Transitions in Plants // Cell, 2006.— V.125.— №19.— P. 655–633.

4. Животков Л.А., Бирюков С.В., Степаненко А.Я. и др. Пшеница.— К.: Урожай, 1989.— 320 с.

5. Дьяченко Л.Ф., Тоцкий В.Н., Топтиков В.А., Сичкарь В.И. Экспрессивность множественных форм пероксидазы в онтогенезе сои // Сб-к научн. трудов “Актуальные проблемы прикладной генетики, селекции и биотехнологии растений”.— Ялта, 2009.— Т.131.— С. 171–176.

6. Корочкин Л.П., Серов О.Л., Пудовкин А.И. и др. Генетика изоферментов.— М.: Наука, 1977.— 275 с.

7. Топтиков В.А., Мирость С.Л., Дьяченко Л.Ф., Тоцкий В.Н., Залогина М.А. Сопряженность устойчивости озимых мягких пшениц к *Fusarium graminearum* Schwabe и множественных молекулярных форм некоторых ферментов // Цитология и генетика.— 2002.— Т.36, №3.— С. 3–11.

8. Топтиков В.А., Дьяченко Л.Ф., Тоцкий В.Н. Оценка спектров множественных форм ферментов с помощью показателя уровня внутреннего разнообразия // Цитология и генетика.— 2010.— Т.44, №1.— С. 46–53.

Резюме

Исследовали электрофоретические спектры средне- и быстроподвижных форм эстераз листьев 20 сортов сои. Выявлено динамическое изменение количественных показателей изоформ фермента (удельный вес в спектре, экспрессивность) в зависимости от стадии онтогенеза растений. Выявлены различия экспрессивности отдельных изоформ эстеразы у скоро- и раннеспелых сортов сои.

Досліджували електрофоретичні спектри середньо- та швидко рухливих форм естераз листя 20 сортів сої. Виявлено динамічні зміни кількісних показників (питомої ваги в спектрі, експресивності) в залежності від стадії онтогенезу рослин. Спостерігаються розбіжності в експресивності окремих ізоформ естераз у швидко- та рано стиглих сортів сої.

The electrophoretical spectra of middle and fast leaf esterase forms in 20 varieties soybean were studied. The dynamic changes of quantity indexes (specific weight, expression) took place depending on different ontogenesis stages. There were differences in expression of some esterase isoforms in early and other varieties soybean.

КОВАЛЬЧУК М.В., ГУЛЬКО Т.П.

*Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины,
Украина, 03143, Киев, ул. Заболотного, 150*

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ ЛИНИЙ ЛАБОРАТОРНЫХ МЫШЕЙ

Использование животных в качестве биомodelей в медико-биологических исследованиях требует особенного внимания к чистоте линий. Для получения объективных и воспроизводимых результатов требуются не только стандартные условия проведения опыта, но и стандартизированный биологический материал. Использование генетически однородного материала, т.е. линейных или инбредных животных, их гибридов F₁, селективируемых аутбредных популяций, обеспечивает воспроизводимость результатов.

Каждая инбредная линия — это один закрепленный инбридингом генотип. Однако чистота линий, их гомозиготность, могут нарушаться как естественным мутационным процессом, так и вследствие технических ошибок. Генетический мониторинг дает возможность подтвердить или определить генетическую однородность инбредных линий, а также охарактеризовать аутбредные популяции. Помимо методов реципрокной изотрансплантации кожных лоскутов, проверки генотипов окраски, мандибулярных методов, анализа специфических изоферментов, выявления гетерозиготности по рецессивным летальным генам, или генам, детерминирующим морфологические признаки, в настоящее время наблюдается тенденция к накоплению данных по генотипированию по главному комплексу гистосовместимости [1, 2].

Признаком генов главного комплекса гистосовместимости является их экстраординарный высокий уровень полиморфизма. H2 локус генома мыши (главный комплекс гистосовместимости) содержит высокополиморфный микросателлит, включающий тандемные повторы (TR) из двух тетра nukлеотидных единиц, TGGA и GGCA, локализованных на 3' конце второго интрона гена *Eb*, экспрессирующем антигены второго класса. На основании длины и нуклеотидной последовательности микросателлита в 55 инбредных линиях мышей выявлено 11 TR аллелей. На линиях, несущих одинаковые и рекомбинантные H2 генотипы, подтверждена высокая стабильность TR аллелей [3, 4, 5].

Целью данного исследования было генотипирование линий лабораторных мышей по отдельным локусам главного комплекса гистосовместимости (H2), а также подбор животных для экспериментальной модели, где необходимо обеспечить генетическую стандартность, которая достигается использованием генетически контролируемых линейных животных. В основном, линии лабораторных мышей представлены гомозиготными животными и имеют уникальный гаплотип по H2 комплексу. ПЦР-генотипирование позволяет идентифицировать гомозиготные, гетерозиготные генотипы, а также по размерам и последовательностям ампликонов установить принадлежность к определенной линии [6].

Для генетического мониторинга экспериментальных животных использовался микросателлитный анализ локуса *Eb*. Выбор именно этого района был связан с тем, что ампликоны, полученные к данному локусу, могут значительно отличаться по размеру среди линий мышей (около 30 пар нуклеотидов) в отличие от ранее исследуемых нами локусов генов *Tnf α* и *Tnf β* для маркирования линий (около 2–10 пар нуклеотидов) [7].

Материалы и методы

В экспериментах использовались половозрелые аутбредные мыши ICR (2–2,5 мес.), которые являются потомством аутбредной популяции, полученной в Институте онкологических исследований (США) и путем близкородственных скрещиваний животных и тщательной селекции по фенотипу опухоленосительства поддерживаются уже долгие годы (с начала 80-х) в виварии Института молекулярной биологии и генетики НАН Украины. Также были включены в эксперимент линии BALB/c, C57BL/6, C3H, CBA, содержащиеся в разных вивариях.

Микросателлитные локусы анализировали с помощью ПЦР. Забор периферической крови производили из хвостовой вены. Тотальную ДНК из лейкоцитов периферической крови отдельных мышей выделяли путем высаливания с 6М NaCl после инкубации с проназой в течение ночи. Выявление полиморфизма микросателита в локусе гена *Eb* проводили с использованием праймеров f(5'-CGACTGTAGAACCTTAGCCTG-3') и r(5'TGGAGCTGTCCTCCTTGTAG-3') [3].

Реакционная смесь для ПЦР содержала 10х буфер, 1,8 мМ хлорид магния, 0,20 мМ нуклеотидтрифосфаты, 0,25 мкМ праймеры и Taq-полимеразу "Fermentas" (Литва). Разделение продуктов амплификации проводили в 10% ПААГ с последующей визуализацией в ультрафиолетовом освещении с использованием бромистого этидия.

Результаты и обсуждение

Сравнительный анализ линий лабораторных мышей с использованием микросателлитного маркера в гене *Eb* показал, что *Eb*-микросателлиты отличаются по размеру в пределах тестируемых линий. Известно, что микросателлит второго интрона гена *Eb*, амплифицируемый в ПЦР-реакции, имеет размер 139 п.н. у линии мышей Balb/c с d-гаплотипом по H2 комплексу. Размер аналогичного ампликона у линии C57BL/6, имеющей b-гаплотип, составляет 107 п.н. [4]. Поэтому ДНК из крови мышей этих линий мы использовали как дополнительные маркеры для определения размеров ампликонов.

У линий C3H, CBA размер полученных ампликонов был близким к 107 п.н., что характерно для линии C57BL/6. Исследуемые животные являлись гомозиготными по данному локусу. Аутбредные животные ICR в районе ампликона размером 107 п.н., характерного для b-гаплотипа, имели две близкорасположенные полосы на электрофореграмме.

Поскольку мыши BALB/c, C57BL/6 использовались для модели, требующей дальнейшего отслеживания аллелей, нам необходимо было по-

добрать доноров с H2 гаплотипами, размеры *Eb*-ампликонов которых значительно отличались бы от соответствующих ампликонов у аутобредных мышей ICR и отличие можно было детектировать как в полиакриламидных так и в агарозных гелях. К таким гаплотипам относится H2d, характерный для линии мышей BALB/c, размер соответствующего сателлита у которых составляет 139 н.п. Электрофореграммы продуктов амплификации ДНК линий BALB/c, C57BL/6 и ICR, полученных с помощью праймеров к переменным последовательностям микросателлита на 3' конце второго интрона гена *Eb* представлено на рис. 1.

Для нашего эксперимента чистота линий представляла особую важность, поэтому мы генотипировали каждую мышь, используемую в эксперименте. При индивидуальном анализе животных из выборки, представленной как линия BALB/c, были детектированы, судя из размеров ампликонов, гибриды (2, 5, 7, рис. 2) и животные (1, 3, 6), гомозиготные по локусу *Eb*, но отличающиеся от линии BALB/c. Электрофореграммы продуктов амплификации ДНК отдельных особей, содержащихся в виварии как популяция линии мышей BALB/c, представлены на рис. 2.

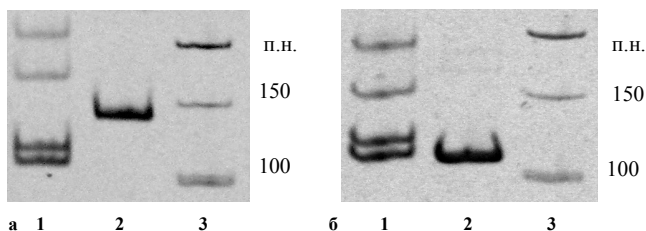


Рис. 1. Электрофореграммы продуктов амплификации ДНК линий мышей, полученных с помощью праймеров к переменным последовательностям локуса гена *Eb*: а) 1 — линия ICR; 2 — линия BALB/c (139 н.п.); 3 — маркер 50 bp DNA Ladder (Fermentas); б) 1 — линия ICR; 2 — линия C57BL/6 (107 н.п.); 3 — маркер 50 bp DNA Ladder (Fermentas)

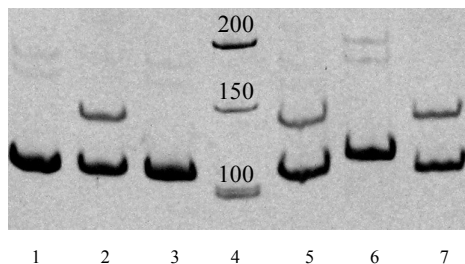


Рис. 2. Электрофореграммы продуктов амплификации ДНК отдельных особей, содержащихся как популяция линии мышей BALB/c, полученных с помощью праймеров к переменным последовательностям микросателлита на 3' конце второго интрона гена *Eb*: 1, 2, 3, 5, 6, 7 — отдельные особи; 4 — маркер 50 bp DNA Ladder (Fermentas)

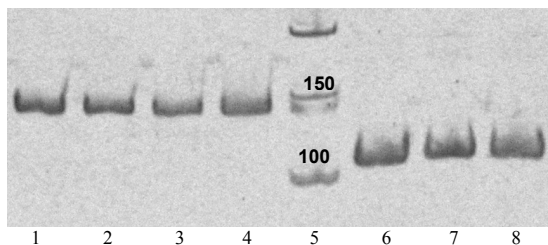


Рис. 3. Электрофореграммы продуктов ПЦР двух выборок мышей из различных источников, содержащихся как линии BALB/c, полученных с помощью праймеров к варибельным последовательностям микросателлита на 3' конце второго интрона гена *Eb*: 1, 2, 3, 4 — отдельные особи I выборки; 6, 7, 8 — отдельные особи II выборки; 5 — маркер 50 bp DNA Ladder (Fermentas)

Другой пример анализа двух выборок мышей из различных источников, содержащихся как линии BALB/c, представлено на рис. 3. Особи 1, 2, 3, 4 (рис. 3) имели ампликон, который по размерам соответствовал ампликону у линии BALB/c и были гомозиготными по исследуемому локусу *Eb* гена.

Таким образом, генетический мониторинг линий лабораторных мышей по отдельным варибельным локусам главного комплекса гистосовместимости, а именно, микросателлита второго интрона гена *Eb* позволяет не только проверить чистоту линейности мышей, полученных из различных источников, но и оптимально подобрать животных для исследовательских моделей, требующих дальнейшего отслеживания аллелей.

Литература

1. *Smith W.P., Quyen Vu, Shuying Li S.S., Hansen J.A., Zhao L.P., Daniel E. Geraghty D.E.* Toward understanding MHC disease associations: Partial resequencing of 46 distinct HLA haplotypes // *Genomics*.— 2006.— Vol.87, №5.— P. 561–571.
2. *Kumánovics A., Lindahl K. F.* Good copy, bad copy: choosing animal models for HLA-linked diseases // *Current Opinion in Genetics&Development*.— 2004.— Vol.14, №3.— P. 258–263.
3. *Saha B.K., Shields J.J., Miller R.D., Hansen T.H., Shreffler D.C.* A highly polymorphic microsatellite in the class II *Eb* gene allows tracing of major histocompatibility complex evolution in mouse // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*.— 1993.— Vol.90.— P. 312–316.
4. *Saha B.K.* Typing of murine major histocompatibility complex with a microsatellite in the class II *Eb* gene // *J. Immunol. Methods*.— 1996.— Vol.194.— P. 77–83.
5. *Mapara M.Y., Kim Y.M., Wang S.P., Bronson R., Sachs D.H., Sykes M.* Donor lymphocyte infusions mediate superior graft-versus-leukemia effects in mixed compared to fully allogeneic chimeras: a critical role for host antigen-presenting cells // *Blood*.— 2002.— Vol.100.— P. 1903–1909.
6. *Wood P.A., Hamm D.A.* Survey of genomic repeat sequence-PCR that detect differences between inbred mouse strains // *Genet. Res*.— 1995.— Vol.65.— P. 151–155.

7. Гулько Т.П., Ковальчук М.В. Изучение некоторых физиологических и молекулярно-генетических свойств мышей, предрасположенным к спонтанным новообразованиям // Матер. міжнар. конф.: “Фактори експериментальної еволюції організмів”. Т.7.— 2009.— Київ.— С. 330–336.

Резюме

Показана можливість використання варіабельного мікросателіту гена *Eb* класу II H2 комплексу для диференціації гаплотипів та селекції гомозиготних і гетерозиготних мишей. За допомогою ПЛР ампліфікації було оптимізовано відбір тварин для досліду та перевірено чистоту використаних ліній мишей.

Показана возможность использования вариабельного микросателлита гена *Eb* класса II H2 комплекса для дифференциации гаплотипов и селекции гомозиготных и гетерозиготных мышей. С помощью ПЦР амплификации был оптимизирован подбор животных в опытах и проверена чистота используемых линий мышей.

A rapid screening method for discrimination of different MHC haplotypes, homozygous and heterozygous mice with using microsatellite in the class II *Eb* gene was shown. Appropriate animals could be selected by PCR genotyping. This method was properly used for verification of mice inbred strains pure.

КОМАХИН Р.А., КОМАХИНА В.В., МИЛЮКОВА Н.А., ФАДИНА О.А., КИНАШ Е.А., ЖУЧЕНКО А.А.*

*ГНУ ВНИИ Сельскохозяйственной биотехнологии РАСХН,
Россия, 127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, д.42,
e-mail: recombination@iab.ac.ru*

**Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН,
Россия, 119991, г. Москва, ул. Губкина, д.3, ГСП 1*

ГИБРИДЫ ТОМАТА, ЭКСПРЕССИРУЮЩИЕ ГЕНЫ *recA* И *NLS-recA-licBM3*, КАК МОДЕЛЬ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ МЕЙОТИЧЕСКОЙ РЕКОМБИНАЦИИ У РАСТЕНИЙ

Гомологичная генетическая рекомбинация в клетках про- и эукариот необходима, прежде всего, для поддержания стабильности и целостности генома. Функционирование гомологичной рекомбинации основано на репарации двухцепочечных разрывов ДНК, которая является элементарным биологическим механизмом, обеспечивающим нормальную работу репликативных вилок (Cox et al., 2000). В мейозе гомологичная генетическая рекомбинация необходима для создания хиазм — крестообразных структур, которые физически удерживают гомологичные хромосомы, позволяя им правильно распределиться между дочерними клетками и обменяться гомологичными участками. Генетическая детерминированность кроссинговера при внутри-видовых скрещиваниях и нарушение сегрегации хромосом у отдаленных

гибридов, приводящее к их стерильности, существенно ограничивают интрогрессию генов и получение уникальных генотипов. Изменение рекомбинации между гомо- и гомеологичными хромосомами может повысить эффективность селекционных методов. Последнее обстоятельство особенно важно при интрогрессивной гибридизации, ставящей своей целью перенос генов хозяйственно-ценных признаков из хромосом дикорастущих видов в хромосомы культурных растений (Жученко, 2001).

В нашей лаборатории для индукции мейотической рекомбинации было предложено использовать трансгенные растения, экспрессирующие гетерологичные гены, белковые продукты которых участвуют в рекомбинации. Молекулярный процесс гомологичной рекомбинации требует поиска гомологии и обмена нитями между двумя молекулами ДНК. У эукариот основным фактором, способным в соматических клетках и в микроспорах осуществить оба этих процесса, является рекомбиназа Rad51 (Li et al., 2004). Однако белку Rad51 для эффективной работы требуется участие белков-паралогов. В тоже время, бактериальный белок RecA имеет от 40 до 60% гомологии с эукариотическими рекомбиназами, 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). Экспрессия гена *recA* *E. coli* в клетках растений табака в три раза повышала количество двухцепочечных разрывов ДНК, восстановленных по механизму гомологичной рекомбинации, и более чем в два раза увеличивала число сестринских хроматидных обменов (Reiss et al., 2000). Это позволило нам предположить, что экспрессия *recA* в клетках растений может в профазе мейоза также изменить число и распределение обменов между гомологичными или гомеологичными хромосомами.

В качестве растительного объекта были выбраны томаты, поскольку в нашей лаборатории имеется обширная коллекция различных форм. Инбредные линии томата, содержащие сцепленные фенотипические маркерные гены, могут быть использованы в гибридологических исследованиях для оценки частоты мейотической рекомбинации. Настоящая работа посвящена созданию и изучению трансгенных растений томата, экспрессирующих гены *recA* или *NLS-recA-licBM3*, с использованием которых можно достоверно оценить влияние бактериальных рекомбиназ на мейотическую гомологичную и гомеологичную рекомбинацию у растений.

Материалы и методы

В качестве растительных объектов использованы растения томата сорта Маргlobe и маркерной линии Mo938. Репортерный ген *licBM3*, кодирующий термостабильную лихеназу *C. thermocellum*, любезно предоставлен профессором Э.С. Пирузян (ИОГен РАН).

Результаты и обсуждение

Первичные трансформанты, экспрессирующие гены *recA* и *NLS-recA-licBM3*, полученные нами ранее при агробактериальной трансформации томата векторами 35S-*recA* и 35S-NLS-*recA-licBM3* (Комахин и др, 2007),

были обозначены как *RecA* и *NLS-RecA-LicBM3*, соответственно. Для дальнейших генетических исследований были отобраны независимые трансформанты, экспрессирующие целевые гены: десять растений *RecA* и семь — *NLS-RecA-LicBM3*. Первичные трансформанты томата не отличались по маркерным признакам, необходимым для изучения мейотической рекомбинации, а также форме и окраске листа, от исходного сорта Марглоб или линии Мо938. Однако, для всех трансформантов сорта Марглоб, экспрессирующих ген *NLS-recA-licBM3*, отмечено формирование меньшего количества междоузлий и, как следствие, более короткого стебля, а также раннее зацветание и завязывание плодов (на 10–15 дней), по сравнению с трансформантами популяции *RecA* и контрольными растениями. Схожие фенотипические отличия отмечены нами ранее у растений T_0 табака, экспрессирующих гены *NLS-recA*, *NLS-recA-licBM3* и *NLS-ruvC*. Можно предположить, что отмеченные фенотипические отличия у трансформантов томата популяции *NLS-RecA-LicBM3* являются результатом локализации в ядре этих растений белка *NLS-RecA-LicBM3*.

Трансгенные растения как модели для изучения и индукции мейотической рекомбинации должны не только экспрессировать целевые гены, но и не отличаться по фертильности пыльцы от исходных растений. Сравнительный анализ всех трансформантов и контрольных растений томата показал, что экспрессия генов *recA* или *NLS-recA-licBM3* не оказывает негативного влияния на фертильность пыльцы, поскольку в каждой популяции трансформантов отмечены растения, сравнимые по этому показателю с контрольными. Однако, у некоторых первичных трансформантов томата фертильность пыльцы была существенно ниже, чем у контрольных растений, что может быть обусловлено изменением функционирования собственных генов растений при интеграции Т-ДНК в функционально-активные участки генома.

Для изучения наследования целевых генов *recA* и *NLS-recA-licBM3* была проведена гибридизация. При этом первичные трансформанты томата, экспрессирующие *recA* и *NLS-recA-licBM3*, использовали в качестве материнских форм, поскольку их фертильность могла сказаться на эффективности гибридизации. В качестве отцовского родителя, при опылении трансформантов растений, полученных на основе сорта Марглоб, использовали контрольные растения линии Мо938, а при опылении трансформантов растений, полученных на основе линии Мо938 — контрольные растения сорта Марглоб. В результате гибридизации было получено 62 растения F_1 , обозначенные как F_1 -*RecA* или F_1 -*NLS-RecA-LicBM3*. Для изучения экспрессии и наследования целевых генов проводили анализ всех гибридов F_1 . Экспрессия гибридного гена *NLS-recA-licBM3* была определена методом чашечного теста (просветленные пятна вокруг лунок), который позволил выявить 16 растений томата (рис. 1).

Последующий ПЦР-анализ геномной ДНК гибридов F_1 -*NLS-RecA-LicBM3*, показал, что последовательность гена *NLS-recA-licBM3* выявлена



Рис. 1. Чашечный тест белковых экстрактов гибридов F_1 -NLS-RecA-LicBM3 томата. Гибриды томата: 1-24, 27, 30, 25 — вода. 26, 28 и 29 — контрольные растения

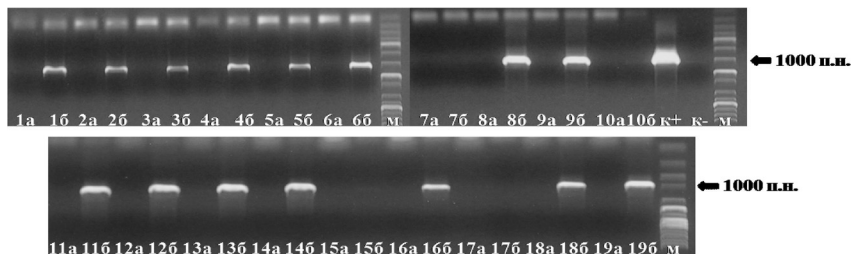


Рис. 2. Электрофореграмма продуктов амплификации РНК (а) и кДНК (б) гибридов томата F_1 -RecA *recA*-специфичных праймеров. Гибриды томата, несущие ген *recA*: 1-19. М — маркер размера фрагментов ДНК. К- — вода. К+ — положительный контроль

только у тех растений, у которых методом чашечного теста была выявлена активность репортерного белка лихеназы.

Анализ экспрессии гена *recA* у гибридов F_1 -RecA проводили методом ПЦР, используя геномную ДНК, РНК и кДНК в качестве матриц. В результате этого анализа отобрано 19 растений, большинство из которых по данным РТ-ПЦР экспрессировали нативный ген *recA* (рис. 2).

Отсутствие экспрессии целевого гена у некоторых гибридов F_1 -RecA дает основание предполагать наличие в геномах их родительских форм нескольких инсерций Т-ДНК, которые могли стать причиной замолкания *recA*. Однако среди потомства всех первичных трансформантов, за исключением растения F_1 -NLS-RecA-LicBM3 №7, отмечено расщепление по содержанию целевого гена 1:1, что свидетельствует об одной инсерции Т-ДНК в геноме растений T_0 (табл.).

Причиной отсутствия экспрессии целевого гена *recA* у гибридов F_1 -RecA, полученных от родительских форм T_0 №3, 5 и 7, может быть наличие нескольких сцепленных копий Т-ДНК, что приводит с одной стороны к наследованию их как одного локуса, а с другой к замолчанию у части потомков экспрессии целевого гена. В потомстве, полученном от трансформанта NLS-RecA-LicBM3 №7, не наблюдалось расщепления, у всех гибридов была обнаружена экспрессия целевого гена, что дает основание полагать о наличии двух и более несцепленных инсерций Т-ДНК в его геноме (табл.). Интересно,

Таблица

Анализ расщепления по целевым генам среди гибридов F₁ томата

№ растения T ₀	Целевой ген	Растений F ₁ , шт.		Расщепление		χ^2
		с ц. г.	без ц. г.	фактическое	ожидаемое	
1	recA	6	4	1 : 1	1,5 : 1	0,40
3		6	6		1 : 1	0
5		3	5		1 : 1,6	0,50
7		4	2		2 : 1	0,66
2	NLS-recA- licBM3	3	4		1 : 1,3	0,14
6		8	6		1,3 : 1	0,28
7		5	0		5 : 0	5,0

Для вероятности ошибки $pd \leq 0,05$ и $df = 1$ критическое значение $\chi^2 = 3,84$.

что потомки этого растения имели фенотипические отличия, такие как укороченный стебель, сокращенные сроки цветения и плодоношения, что косвенно подтверждает наше предположение о влиянии ядерной локализации белка NLS-RecA-LicBM3 на рост и развитие трансгенных растений.

Для того, чтобы избежать неправомερных выводов при изучении частоты мейотической рекомбинации с использованием трансгенных гибридов F₁ томата, необходимо выяснить действительно ли различия в фертильности пыльцы не связаны с экспрессией целевых генов *recA* и *NLS-recA-licBM3*? Для этого мы провели сравнительное изучение фертильности пыльцы у трансгенных и не трансгенных гибридов F₁.

Установлено, что у некоторых образцов популяции F₁-RecA фертильность пыльцы ниже, чем у стандарта. При этом пониженная фертильность пыльцы выявлена как среди трансгенных растений, экспрессирующих целевой ген, так и растений только содержащих, но не экспрессирующих его, а также у не трансгенных гибридов. В тоже время, часть растений, экспрессирующих ген *recA*, не отличается по этому показателю от контроля, а среди гибридов, популяции F₁-NLS-RecA-LicBM3 не отмечено достоверных отличий по фертильности пыльцы между трансгенными и не трансгенными растениями. Полученные результаты позволяют заключить, что различия в фертильности пыльцы между гибридами не зависят от экспрессии целевых генов *recA* или *NLS-recA-licBM3*, а, вероятно, определяются генотипом растений T₀, сформировавшимся в результате T-ДНК-инсерционного мутагенеза.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке гранта РФФИ №08-04-13596-офи_ц.

Литература

1. Жученко А.А. Адаптивная система селекции растений (эколого-генетические основы). Том I и II. М.: Агрорусс, 2001. с.780, с.1490.
2. Комахин Р.А., Комахина В.В., Жученко А.А. Создание генетических конструкций содержащих бактериальный ген *recA E. coli* для индукции рекомбинации в растениях. *Сельскохозяйственная биология*. 2007. №3. с.25–32.

3. Ланцов В.А. Гомологическая ДНК-трансфераза RecA: функциональные активности и поиск гомологов рекомбинирующими ДНК. *Молекулярная биология*. 2007. Т.41. №3. с.467–477.

4. Cox M.M., Goodman M.F., Kreuzer K.N. et al. The importance of repairing stalled replication forks. *Nature*. 2000. V.404. P.37–41.

5. Li W.X., Chen C.B., Markmann-Mulisch U. et al. The Arabidopsis AtRAD51 gene is dispensable for vegetative development but required for meiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2004. V.101. P.10596–10601.

Резюме

Полученные экспериментальные данные позволяют заключить, что гены *recA* и *NLS-recA-licBM3* экспрессируются в растениях томата и не оказывают негативного влияния на формирование пыльцы. Гены *recA* и *NLS-recA-licBM3* стабильно наследуются через яйцеклетки. Гибриды F₁ томата, экспрессирующие гены *recA* и *NLS-recA-licBM3* могут быть использованы в качестве моделей для изучения мейотической рекомбинации.

The data we obtained allow making the conclusion that gene constructions *recA* and *NLS-recA-licBM3* are expressing in tomato plant and there are no negative effects on pollen fertility. Genes *recA* and *NLS-recA-licBM3* are inherited invariably through the egg cells. F₁ tomato plant with *recA* and *NLS-recA-licBM3* gene expression may be used in meiotic recombination researches.

МАЛЕЦКАЯ Е.И., ЮДАНОВА С.С.

Институт цитологии и генетики СО РАН; пр. Лаврентьева, 10, 630090, Новосибирск, Россия; e_mal@bionet.nsc.ru

СЕМЕННАЯ ПРОДУКТИВНОСТЬ ГАПЛОИДНЫХ РАСТЕНИЙ САХАРНОЙ СВЁКЛЫ (*BETA VULGARIS* L.) ПРИ АПОЗИГОТИЧЕСКОМ СПОСОБЕ РАЗМНОЖЕНИЯ

Для решения различных цитогенетических и селекционных задач на гаплоидию возлагают большие надежды: создание нового генетического материала, новых инбредных линий. Сахарная свекла (*Beta vulgaris* L.) — перекрестноопыляющееся растение, у которого самооплодотворение присуще лишь немногим растениям в популяциях, так как предотвращается системой генов самонесовместимости. Как показывают наблюдения многих авторов, самонесовместимые формы растений нередко склонны к гамоспермному способу семенной репродукции [1–3]. Учитывая это, можно заключить, что система репродукции семян у сахарной свеклы включает разные варианты репродукции семян: перекрестное оплодотворение, самооплодотворение и гамоспермию.

В процессе формирования семян при перекрестном оплодотворении участвуют оба родителя: материнский и отцовский. Поэтому получение семян путем перекрестного оплодотворения называют “двуродительским” или гамоспермным способом семенной репродукции. В отличие от гамосперм-

ного, агамоспермный способ репродукции семян называют “однородительским”. Возможны различные варианты агамоспермного семянезиса: а) соматическая апозигота возникает из клеток нуцеллуса или интегументов (митотическая агамоспермия); б) гаметическая апозигота возникает из клеток зародышевого мешка.

Нами показано, что большая часть семян при апозиготической репродукции свеклы имеет диплоидное число хромосом и в семенном потомстве наблюдается расщепление по маркерным признакам [4–5]. Из этого следует, что дигаметоидные семена возникают из клеток зародышевого мешка, которые формируются из мегаспор, прошедших мейотические деления. Гаметы с диплоидным (нередуцированным) числом хромосом возникают спонтанно у многих видов растений, и это явление обозначается как эпигенетическая изменчивость клеток [6–8]. Понятию “эпигенетическая изменчивость” предшествовало понятие “миксометоплоидность клеточных популяций”, под которой понимают наличие в клеточных популяциях доминирующей фракции клеток с диплоидным числом хромосом и фракций, у которых число хромосом в ядрах меньше или больше их основного числа [9]. По нашим наблюдениям у растений, склонных к однородительскому способу размножения, повышен уровень миксометоплоидности клеток (эпигенетическая изменчивость), что делает возможным попадание полиметоплоидных клеток в зародышевые пути клеток и формирование дигаметоидных зародышей.

Цель настоящей работы — проанализировать семенную продуктивность у гапетоидных растений сахарной свеклы, репродуктивных семян апозиготическим способом.

Материал и методы

В качестве материала для исследования использовали пыльцестерильные растения одноростковых линий сахарной свеклы селекции лаборатории популяционной генетики растений Института цитологии и генетики СО РАН (мс704х741; мсСОАН-5; мсР17), которые репродуктивировали апозиготическим способом. От каждого потомства были взяты выборки не менее 400 плодов. Плоды промывали в проточной воде и помещали в термостат при 28 °С. После прорастания проводили отбор гапетоидных проростков по двум морфобиологическим признакам: длине и диаметру проростков [10, 11]. Гапетоидные проростки на 3-и сутки были в четыре раза короче и имели вдвое меньший диаметр, чем дигаметоидные проростки. В последующем проводили изучение клеточных популяций гапетоидных растений по числу хлоропластов в замыкающих клетках устьиц.

Хромосомный анализ показал, что в точках роста молодых листочков у гапетоидных растений наряду с гапетоидными клетками есть немало клеток с диплоидным набором хромосом. Анализ микроспорогенеза также свидетельствует о том, что гапетоидным растениям также присуща миксометоплоидность клеток — полиморфизм микроспор. На препаратах, приготовленных из пыльников гапетоидных растений, присутствуют монады, диады, триады и тетрады микроспор. Однако, большая часть микроспор в пыльниках гапетоидных растений представлена монадами [12].

Результаты эксперимента

После прохождения стадии яровизации гаплоидные корни были высажены на изолированном участке для оценки их способности к семенной репродукции в беспыльцевом режиме (таблица). Полученные от гаплоидных растений семена оценивали на всхожесть, и обнаружили, что уровень всхожести варьировал от 75% до 92,6%. Это достаточно высокий уровень всхожести, если принять во внимание, что гаплоидные семена получены апозиготическим путем. Значения показателя всхожести семян от гаплоидных растений ничем не отличается от уровня всхожести дигаплоидных семян.

При беспыльцевом способе семенной репродукции у гаплоидных растений наблюдается большой разброс по массе плодов: минимальная масса плодов на одно растение составила 2,8 г, максимальная — 262,5 г. Отметим, что плоды обычно мелкие и масса 1000 штук у некоторых растений составила 7 г, а максимальная 18 г. Средняя масса плодов на одно растение у гаплоидов первого поколения репродукции несколько ниже, чем этот же показатель в последующем поколении (90,5–93,4 г; 50,0–144,2 г). У дигаплоидных растений средняя масса плодов на растение всегда выше, чем у гаплоидов.

В таблице буква “Г” обозначает первое апозиготическое поколение, а “ГГ” — второе апозиготическое поколение. Из первого гаплоидного апозиготического поколения были повторно отобраны гаплоидные проростки по морфобиологическим признакам, из них выращены корни, и по прохождении стадии яровизации высажены в грунт. От этих растений получено второе гаплоидное апозиготическое потомство (“ГГ”). У линии мсР17 второго поколения не получали, но два корня этой линии были оставлены для репродукции семян на третий год жизни. Масса полученных плодов от растений третьего года жизни превысила в три раза массу плодов, полученных от растений второго года жизни (38,6 и 111,9). У линии мс СОАН — 5 и гибрида мс 704х741 часть семян второго апозиготического поколения “ГГ” была

Таблица

Средняя масса плодов у гаплоидных и дигаплоидных растений первого и второго поколений репродукции, полученных апозиготическим способом

Линия, гибрид	Поколение	Гаплоиды		Дигаплоиды	
		число раст.	масса плодов на растение, г	число раст.	масса плодов на растение, г
мс704 х 741	"Г"	14	90,5	26	101,8
мс704 х 741	"ГГ"	16	93,4	—	—
мс704 х 741	"ГГ"	40	118,5	—	—
мсСОАН-5	"Г"	13	50,0	30	78,9
мсСОАН-5	"ГГ"	34	144,2	—	—
мсР17	"Г"	2	38,6	19	59,8
мсР17	"Г" 3-ий год	2	111,9	—	—

получена без отбора по морфобиологическим признакам, поэтому в эту партию могли попасть и дигаплоидные плоды, полученные апозиготическим путем из первого поколения (“Г”).

Результаты и обсуждение

При миксоплоидии в меристеме клеточных популяций наряду с доминирующей фракцией клеток с основным числом хромосом встречаются клетки, у которых число хромосом в ядрах больше или меньше их основного. При таком сосуществовании разноплоидных клеток в меристемах позволяет растениям формировать апозиготическим путем как гаплоидное, так и дигаплоидное потомство. В ходе развития растений часто наблюдается эмбриональная гибель отдельных цветков и плодов на растении. Это говорит о том, что при эмбриогенезе происходит гибель гаплоидных эмбрионов из-за конкуренции с дигаплоидными, гибель может также обусловлена гемизиготностью по летальным генам.

Кроме обычного митотического деления клеток в семечках на 3–5-й день после начала цветения, возможен и другой более быстрый способ их размножения — почкование ядрышек, описанный Н.Э. Зайковской. “Деление начинается почкованием ядрышек, ... которые затем полностью отделяются и отходят к периферии ядра. Вокруг новообразовавшихся ядрышек обособляются участки ядра, что ведет к возникновению новых маленьких ядер внутри старого... Второе небольшое, молодое ядро, отделившееся раньше, лежит в центре клетки, и в цитоплазме около него закладывается клеточная перегородка. Процесс немитотического деления носит массовый характер и различные его фазы видны почти во всех ядрах ткани нуцеллуса” [13]. Если эти наблюдения верны, то это свидетельствуют о том, что гаплоидные семена можно получать не только с помощью нетрадиционных способов репродукции: опыление цветков свеклы пылью дикорастущих видов; нанесение на рыльце цветков инактивированной пыли после ее обработки радиацией; обработка растений эпимутагенами и т.д.

При беспыльцевом режиме большая часть формирующихся семян дигаплоиды, а меньшая часть — гаплоиды. Очевидно, что партеногенетическое развитие свойственно как гаплоидным, так и диплоидным (полиплоидным) клеткам зародышевых мешков. При относительно значительном уровне миксоплоидности клеточных популяций возрастает вероятность попадания полиплоидных клеток в зародышевый путь. И если тетраплоидная клетка попала в зародышевый путь (материнская клетка мегаспор), то после редукционного деления сформированная яйцеклетка будет иметь диплоидное число хромосом.

Известно, что свойство завязывать семена при апозиготической репродукции сохраняется в ряду поколений [14]. Эту же тенденцию мы наблюдаем и при беспыльцевом размножении у гаплоидов первого и второго поколения. Сравнивая завязываемость семян у гаплоидных растений в разных вариантах, можно сказать, что в последующем поколении апозиготической репродукции это свойство сохраняется, а масса плодов в среднем на растение возрастает.

Благодарности. Настоящая работа выполнена при поддержке Интеграционного гранта СО РАН №99 и гранта РФФИ 10-04-00697.

Литература

1. *Фаворский Н.В.* Материалы по биологии и эмбриологии сахарной свеклы // Тр. Научного института селекции, выпуск 2.— Киев.— 1928.— С. 1–14.
2. *Сеилова Л.Б., Абдурахманов А.А., Хайленко Н.А.* Эмбриология индуцированного апомиксиса у сахарной свеклы // Цитология и генетика.— 1984.— Т.18.— С. 90–92.
3. *Ширяева Э.И., Ярмолюк Г.И., Кулик А.Г., Червякова В.В.* Апомиксис у самоопыленных линий сахарной свеклы и использование его в селекции // Цитология и генетика.— 1989.— Т.11.— С. 32–48.
4. *Малецкий С.И., Малецкая Е.И.* Самофертильность и агамоспермия у сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) // Генетика.— 1996.— Т.32, №12.— С. 1643–1650.
5. *Левитес Е.В., Овечкина О.Н., Малецкий С.И.* Авто- и эписегрегация по признакам окраски в агамоспермных потомствах сахарной свеклы // Генетика.— 1999.— Т.35, №7.
6. *Малецкий С.И., Колодяжная Я.С.* Генетическая изменчивость в популяциях соматических клеток и ее влияние на репродуктивные признаки у покрытосеменных растений // Успехи соврем. Генетики.— 1999.— Vol.119, №2.— С. 128–143.
7. *Frenkel R.* Uber das Auftreten von unreduzieren Gameten bei Angiospermen // Arch. Zucht. Forsch.— 1975.— Vol.5.— P. 201–208.
8. *Harlan J.R., de Wet J.M.J.* The origins of polyploidy // Bot. Rev.— 1975.— Vol.41.— P. 361–390.
9. *Юданова С.С.* Миксоплоидия клеточных популяций сахарной свеклы и ее связь с репродуктивными признаками. Диссерт. на соискание ученой степени канд. биол. наук. Санкт-Петербург, Всероссийский НИИ растениеводства.— 2004.— 126 с.
10. *Карпеченко Г.Д.* Экспериментальная полиплоидия и гаплоидия // Теоретические основы селекции растений. М., Л.: “Сельхозгиз”.— 1935.— Т.1.— С. 397–432.
11. *Тырнов В.С.* Гаплоидия у растений. Научное и прикладное значение. М.: Наука.— 1998.— 54 с.
12. *Малецкая Е.И.* Получение гаплоидных растений у сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) // Сборник научных трудов X генетико-селекционной школы, посвященной 120-летию Н.И. Вавилова: Реализация идей Н.И. Вавилова на современном этапе развития генетики, селекции и семеноводства сельскохозяйственных культур.— 2007.— Новосибирск, ВАСХНИИЛ.— С. 205–211.
13. *Зайковская Н.Э.* Немитотическое деление // Биология и селекция сахарной свеклы.— 1968.— С. 141–142.
14. *Юданова С.С., Малецкая Е.И.* Связь эпигеномной изменчивости с семенной продуктивностью при апозиготическом способе размножения сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) // Сборник научных трудов: “Десятилетия і проблеми генетики, селекції та біотехнології”.— Кивп: “Логос”.— 2007.— Т.2.— С. 121–125.

Резюме

В статье приведены результаты наблюдений за завязываемостью семян у гаплоидных растений при апозиготическом способе репродукции. Показано что семенная продуктивность гаплоидов ниже, чем у дигаплоидов. В следующем поколении репродукции масса семян у гаплоидов повышается.

This paper presents the results of seed setting study in haploid plants by uniparental mode of reproduction. It was shown that seed setting of haploid plant was lower then of dihaploids. The level of seed setting increases in the next generation.

МАНДРОВСЬКА Н.М., КРУГОВА О.Д., КОЦЬ С.Я.

Інститут фізіології рослин і генетики НАН України,

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

ГЕНЕТИЧНІ ОЗНАКИ І СИМБІОТИЧНІ ВЛАСТИВОСТІ Tn5-МУТАНТА RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM BV. VICEAE M₁

Отримання високоефективних штамів бульбочкових бактерій із використанням сучасних генно-інженерних методів є важливим резервом підвищення інтенсивності біологічної азотфіксації. Сьогодні, завдяки розвитку у світі методів молекулярної генетики, з'явилася реальна можливість направлено конструювання високоефективних і конкурентоспроможних штамів ризобій [2, 6, 7, 10, 12]. Одним із таких методів є транспозоновий мутагенез [1, 5]. Метод зіграв значну роль в експериментальних дослідженнях механізмів симбіозу та вивчення генів бульбочкових бактерій, що відповідають за ці процеси. За його допомогою були виявлені основні гени, які визначають азотфіксувальну активність, вірулентність ризобій, та гени, пов'язані з формуванням симбіозу бульбочкових бактерій з рослинами [8]. Нині частіше всього використовують транспозон Tn5, що обумовлено високою частотою його інтеграції у геноми реципієнтних штамів мікроорганізмів, відсутністю специфічності до нуклеотидної послідовності ДНК при транспозиції Tn5 та низькою частотою утворення його ревертантів. Для введення транспозону Tn5 у реципієнтні штами застосовують широке коло транспозоновмісних плазмід-самовбивць, які можуть кон'югативно переноситись від спеціальних штамів *E. coli* до широкого кола грам-негативних бактерій. Ці плазміди не здатні до реплікації у реципієнтних штамів, а тому можуть зберігатися при поділі клітин хазяїна. Транспозон же за рахунок ферменту транспозази, яка транскрибується та транслюється хазяїнськими ферментними системами, може інтегрувати в його геном і стабільно підтримуватися в наступних поколіннях [13, 14].

Метою наших досліджень було вивчення генетичних ознак та симбіотичних властивостей у отриманого нами Tn5-мутанта *Rhizobium leguminosarum* bv. *Viceae* M₁.

Матеріали і методи

Мутант *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* M₁ отримано у відділі симбіотичної азотфіксації Інституту фізіології рослин і генетики НАН України методом транспозонового мутагенезу із активного штаму бульбочкових бактерій гороху 263б [9] із використанням вектора від *E. coli* S 17 pSUP2021: Tn5 [4]. Для визначення наявності транспозона Tn5 у мутантного штаму ризобій гороху був застосований метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) [5, 13]. Симбіотичні властивості Tn5-мутанта M₁ вивчали у вегетаційних і польових дослідах.

Вегетаційні досліди проводили на річковому піску, використовуючи посудини об'ємом 5 кг. Контролем був варіант із обробкою насіння гороху сорту Дамір 2 штамом-реципієнтом 263б, а також абсолютний контроль —

обробка насіння стерильною водою. Повторність досліду 5-кратна. У дослідах визначали азотфіксувальну активність бульбочок за редукцією ацетилену в етилен [11], ефективність симбіозу за приростом надземної маси і коріння та масою зерна на посудину; нодуляційну здатність — за кількістю утворених бульбочок на корені.

Польові досліді проводили у дослідному господарстві Інституту фізіології рослин і генетики НАН України (сmt Глеваха Васильківського району Київської обл.) на світло-сірих опідзолених легко-суглинистих ґрунтах. Облікова площа ділянки 5 м², повторність досліду 4-х кратна, посів рендомізований. Азотні добрива не вносили. Схема польових дослідів включала варіант із інокуляцією насіння гороху сорту Камелот штамом-реципієнтом 263б, виробничим штамом 245а і Tn5-мутантом M₁. Контролем був варіант без інокуляції — насіння замочене у стерильній воді. У польових дослідах визначали вплив інокуляції різними штамми ризобій на урожай зерна гороху. Дані оброблені статистично [3].

Результати та обговорення

Для одержання мутантів методом транспозонового мутагенезу був обраний штам-реципієнт *Rhizobium leguminosarum* bv. *vicia* 263б [9], який має високу стійкість до стрептоміцину (Str) і низьку — до канаміцину (Km). Цей штам схрещували зі штамом *E. coli* S17, трансформованого плазмідосамовбивцею pSUP2021:Tn5. У результаті мутагенезу були отримані канаміцинстійкі до 200 мкг/мл мутанти бульбочкових бактерій гороху. Одержані Tn5-мутанти досліджували спочатку у мікровегетаційних дослідах за ознакою підвищеної азотфіксувальної активності. Серед перевірених мутантів саме Tn5 M₁ мав таку ознаку. Із метою підтвердження, чи дійсно транспозон знаходиться у його геномі, був використаний метод полімеразної ланцюгової реакції [13]. Маркером відбору транспозонових мутантів слугував ген стійкості до канаміцину. Контролем були взяті штам-реципієнт 263б та штам *E. coli* S17, який містив плазміду pSUP2021:Tn5. Нами встановлено, що контрольний штам-реципієнт *Rhizobium leguminosarum* bv. *vicia* 263б не містить у своєму геномі фрагменту ДНК гена стійкості до Km транспозону (рис.).

У той час ПЛР аналіз показав наявність даного фрагмента довжиною 517 нуклеотидних пар у Tn5-мутанта ризобій гороху M₁. Це свідчить про наявність в його геномі гена неоміцинфосфаттрансферази, тобто він є Tn5-мутантом. Набута стійкість мутанта M₁ до канаміцину є результатом інтеграції в його геном транспозону Tn5.

Важливим показником при оцінці транспозонових мутантів бульбочкових бактерій гороху є нодуляційна і азотфіксувальна активність бульбочок. Як видно із даних табл. 1, у варіанті із інокуляцією рекомбінантним штамом M₁, утворилася значна кількість бульбочок — 53 шт/рослину. За показником азотфіксувальної активності цей Tn5-мутант майже у 1,7 рази перевищував штам-реципієнт.

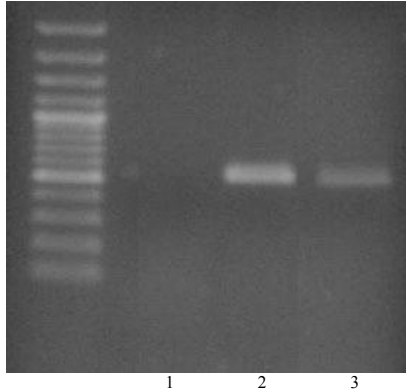


Рис. 1. Електрофорез в 0,7% агарозі продуктів ПЛР геномної ДНК бульбочкових бактерій гороху з праймерами на Tn5, що обмежують ділянку його гена стійкості до канаміцину довжиною 515 н.п. М — маркерна ДНК/ 1, 2, 3 — *Rh.leguminosarum* *bv. viciae*: 1 — вихідний штам 2636; 2 — транспозант M₁; 3 — *E. coli* S17-1, що містить плазмиду pSUP2021::Tn5

Таблиця 1

Симбіотичні властивості Tn5-мутанта M₁ *Rhizobium leguminosarum* *bv. viciae* (вегетаційний дослід, фаза бутонізації — початку цвітіння)

Варіант	Кількість бульбочок, шт/рослину	Азотфіксувальна активність, мкмоль C ₂ H ₄ /(росл-год)	Надземна маса, г/рослину	Маса кореня, г/рослину
Контроль без інокуляції	18,0 ± 1,3	1,52 ± 0,04	1,1 ± 0,02	0,98 ± 0,03
Штам-реципієнт 2636	27,0 ± 2,0	2,76 ± 0,08	1,5 ± 0,02	1,4 ± 0,09
Tn5-мутант M ₁	53,0 ± 4,0	4,58 ± 0,16	2,1 ± 0,01	1,7 ± 0,02

Відомо, що критеріями оцінки ефективності нових штамів ризобій є не тільки рівень ацетиленвідновної активності кореневих бульбочок, а й показники наростання біомаси рослин [2]. За надземною масою рослини, симбіотичні системи яких утворені за участю мутантного штаму M₁, перевищували рослини, інокульовані вихідним штамом на 14%, а за масою коріння — на 12%. Отримані дані свідчать, що Tn5-мутант M₁, який мав більш високий рівень азотфіксувальної активності, поліпшував азотне живлення рослин та сприяв збільшенню біомаси рослин.

Важливим показником в оцінці ефективності Tn5-мутантів є урожай зерна. У зв'язку з цим, ефективність нового Tn5-мутанта порівнювали не тільки із ефективністю вихідного, а й промислового штамів. За нашими даними (табл. 2 і 3), як у вегетаційному, так і польовому досліді, передпосівна обробка насіння гороху активним штамом бульбочкових бактерій і Tn5-му-

Таблиця 2

Вплив інокуляції бульбочковими бактеріями на урожай зерна гороху (вегетаційний дослід)

Варіант	Середній урожай, г/посудину	Прибавка до контролю		Прибавка до шт. 263б	
		г/посудину	%	г/посудину	%
Контроль — без інокуляції	15,5 ± 0,2	—	—	—	—
Штам-реципієнт 263б	16,5 ± 0,1	1,0	6,5	—	—
Tn5-мутант M ₁	20,0 ± 0,1	4,5	29,0	3,5	21,2

Таблиця 3

Урожай зерна гороху при інокуляції штамми бульбочкових бактерій і Tn5-мутантом M₁ (польовий дослід)

Варіант	Середній урожай, ц/га	Прибавка до контролю		Прибавка до шт. 245а		Прибавка до шт. 263б	
		ц/га	%	ц/га	%	ц/га	%
Контроль — без інокуляції	27,6						
Виробничий штам 245а	33,9	6,3	22,8				
Штам-реципієнт 263б	34,6	7,0	25,3				
Tn5-мутант M ₁	39,8	12,2	44,3	5,9	1,4	5,2	15,0
НІР _{0,5}	2,2						

тантом M₁, сприяли підвищенню продуктивності гороху. Як видно із табл. 2, маса зерна гороху в умовах вегетаційного досліді у варіанті із інокуляцією мутантом M₁ на 21% перевищувала варіант із обробкою насіння штамом-реципієнтом.

Дані, наведені у табл. 3 свідчать, що прибавки урожаю зерна за інокуляції транспозоновими мутантами і активними штамми ризобій відносно контролю (спонтанна інокуляція) була достовірною в усіх варіантах досліді. У варіанті із інокуляцією новим штамом M₁ приріст урожаю становив 5,9 ц/га порівняно зі штамом 245а і 5,2 ц/га відносно штаму 263б.

Таким чином, одержаний мутант M₁ за сукупністю експериментальних даних перевищував штам-реципієнт 263б за симбіотичними властивостями та ефективністю симбіозу. За генетичними ознаками він відрізнявся від вихідного штаму наявністю в геномі фрагменту ДНК гена стійкості до канаміцину. Транспозоновий мутант M₁ депонований у депозитарії Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України і запатентований як високоефективний симбіонт гороху.

Література

1. Молекулярная биология бактерий, взаимодействующих с растениями / Ред. Герман Спайк, Адам Кондорози, Пауль Лукас.— СПб.— 2002.— 568 с.
2. Генетические основы селекции клубеньковых бактерий / Под ред. Б.В. Симарова.— Л.: Агропромиздат. 1990.— 190 с.
3. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта.— М.: Агропромиздат, 1985.— 351 с.
4. Коць С.Я., Мандровська Н.М., Кругова О.Д. Штам бактерій *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* M₁ для одержання бактеріального добрива під горох. Патент України на винахід №81517, Бюл. №1, 2008 р.
5. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбук Дж. Молекулярное клонирование. Методы генетической инженерии. М.: Мир.— 1984.— С. 182–194.
6. Проворов Н.А., Симаров Б.В. Направления конструирования штаммов клубеньковых бактерий с повышенной симбиотической эффективностью // Молекулярные механизмы генетических процессов.— М.— 1991.— С. 190–194.
7. Симаров Б.В., Тихонович И.А. Генетические основы бобово-ризобияльного симбиоза // Минеральный и биологический азот в земледелии СССР.— М.: Наука.— 1985.— С. 165–174.
8. Симаров Б.В., Шарыпова А.А., Чеснокова О.Н. и др. Анализ Tn5-мутантов *R. meliloti* с повышенной симбиотической эффективностью // Генетика.— 1990.— 26, №4.— С. 636–639.
9. Старченков Ю.П., Мандровська Н.М., Нічик М.М., Кругова О.Д. та ін. Штам бактерій *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* для одержання бактеріальних добрив під горох. Пат. України на винахід №21012, 1997 р. Бюл. №1, 1998.
10. Biotechnical Inter (Cambridge) begins field of genetically engineer bacteria // Appl. Genet. News.— 1988.— V.8, №10.— P. 12–14.
11. Hardy R.W.F., Holsten F.D., Jackson E.K et al. The acetylene-ethylene assay for N₂ fixation: laboratory and evaluation // Plant Physiol.— 1968.— V.42, №8.— P. 1185–1207.
12. Mansanto (St. Louis Mo) reveals successful field test of genetically engineer microba // Appl. Genet. News — 1988.— V.8, №8.— P. 12–13.
13. Reznikoff W.S. The transposon Tn5 // Annu. Rev. Genet.— 2008.— V.42.— P. 151–158.
14. Simon By R., O'Connell M., Labes M., Puhler A. Plasmid vector for the genetic analysis and manipulation of *Rhizobia* and other gram-negative bacteria // Methods in Enzymology.— 1986.— V.118.— P. 645–659.

Резюме

Одержаний Tn5-мутант M₁ перевищував штам-реципієнт *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 2636 за симбіотичними властивостями і ефективністю симбіозу. Встановлено, що за генетичними ознаками він відрізняється від вихідного штаму наявністю в геномі фрагменту ДНК гена стійкості до канаміцину. Транспозоновий мутант M₁ депонований у Депозитарії Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України і запатентований як високоефективний симбіонт гороху.

Полученный Tn5-мутант M₁ превосходил штам-реципиент *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 2636 по симбиотическим показателям и эффективности симбиоза. Установлено, что по генетическим признакам он отличается от исходного штамма наличием в его геноме фрагмента ДНК гена устойчивости к канамицину.

Транспозоновый мутант M_1 депонирован в Депозитарии Института микробиологии и вирусологии Д.К. Заболотного НАН Украины и запатентован как высокоэффективный симбионт гороха.

Obtained Tn5 mutant M_1 outdid the recipient strain of *Rhizobium leguminosarum* *bv. viceae* 263в in respect to the symbiotic peculiarities and symbiosis effectivity. It was established that the Tn5 mutant was different from the recipient strain by genetic signs such as the presence kanamicine resistance gene part. The mutant M_1 have been placed to the Depositarium of the Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of NAS of Ukraine as well as have got the patent as high effective pea symbiont.

¹СМОЛИКОВА (АЛЕКСЕЙЧУК) Г.Н., ²СЛИВИНСКАЯ Э., ³ТЭЙЛОР А.

¹ Институт экспериментальной ботаники им. В.Ф. Купревича НАН Беларуси, Беларусь, 220072, Минск, ул. Академическая, 27, e-mail: aleks.galina@gmail.com

² Университет технологии и наук о жизни, лаборатория генетики и селекции растений, Быдгошч, Польша

³ Корнельский университет, сельскохозяйственная экспериментальная станция штата Нью-Йорк, США

АНАЛИЗ РЕПЛИКАЦИИ ДНК ПРИ ПРОРАСТАНИИ СЕМЯН КЛЕЩЕВИНЫ



Клещевина (*Ricinus communis* L.) принадлежит к семейству молочайных и представляет собой однолетнее растение, цветки которого собраны в соцветие типа кисть, плод — коробочка. Традиционно клещевину культивируют ради касторового масла, содержание масла в семенах колеблется от 48 до 60% в зависимости от сорта и района возделывания растения. Важное хозяйственное значение касторового масла связано с его уникальными свойствами: оно не высыхает, является самым плотным и вязким из всех растительных масел, застывает при температуре -18°C и ниже, растворяется в спирте, но не растворяется в нефти, бензине, при сгорании не оставляет остатка. Благодаря этим свойствам касторовое масло уже давно используется как лучшее, почти незаменимое смазочное масло в авиации, в ракетных двигателях, точных приборах, а также в качестве тормозной жидкости и трансформаторного масла. Наибольшие площади клещевины сосредоточены в Индии, Бразилии, США и Китае. Небольшие площади также имеются в Судане, Эфиопии, Анголе, Эквадоре. В СССР клещевину возделывали в Краснодарском крае и на Украине. Однако после распада СССР посевы клещевины в России и Украине значительно сокращены и сейчас эти страны полностью зависят от импорта касторового масла.

Возникший энергетический кризис заставил искать альтернативные источники топлива, что вновь привлекло внимание к семенам клещевины (Brigham, 1991). Клещевина может возделываться почти на всех типах почв и обладает высокой адаптивностью. Она обеспечивает в три раза больший выход масла в расчете на площадь, чем соя и на 20% больше, чем рапс. При этом масло клещевины (которое называют касторовым) может смешиваться со спиртами и имеет низкое иодное и высокое цетановое числа. Эти характеристики делают биотопливо, получаемое из семян клещевины, перспективным к использованию в странах с холодным климатом (Osava, 2003; www.dovebiotech.com).

В семенах клещевины содержится алкалоид рицинин и белок рицин, которые являются токсичными для человека. Однако при отжиме масла они остаются в водорастворимой фракции и жмыхе. Касторовое масло представляет собой смесь триглицеридов рицинолевой, линоленовой и олеиновой кислот. Большую его долю (80–85%) составляют глицериды рицинолевой (12-гидрокси-цис-9-октадеценовой) кислоты. Рицинолевая кислота синтезируется в эндосперме созревающих семян из олеиновой кислоты путем гидроксирования (Chen et al., 2007). Присутствие рицинолевой кислоты в касторовом масле нежелательно, поскольку она повышает вязкость масла и является токсичной. Селекционеры пытаются решить эту проблему путем создания сортов с более низким ее содержанием, повышая долю олеиновой кислоты в касторовом масле (Rojas-Bartos et al., 2004; 2005). Однако такие селекционные линии характеризуются более низкими показателями масличности, массы и всхожести семян.

Целью данной работы являлся анализ морфофизиологических и цитогенетических особенностей прорастания семян клещевины.

Материалы и методы

Объектом исследования являлись семена клещевины урожая 2008 года, выращенные на Краснодарской опытной станции Всероссийского института растениеводства им. Н.И. Вавилова и любезно предоставленные лабораторией масличных культур ВИР (партия “А”), и семена клещевины сорта Hale урожая 2009 года, предоставленные экспериментальной сельскохозяйственной станцией Корнельского университета США (партия “Б”). *Морфологическое строение семян* было изучено с использованием светового микроскопа и рентгенографической установки ПРДУ-2, разработанной в Санкт-Петербургском государственном электротехническом университете совместно с Агрофизическим институтом РАСХН. *Инициация клеточного цикла* в прорастающих семенах была изучена методом проточной цитометрии. В 1 мл охлажденного буфера добавляли флуоресцентный краситель 4,6-диамидино-2-фенилиндола (DAPI). Растительную ткань измельчали и фильтровали через 30 мкм фильтр. Образцы измеряли на проточном цитометре *Partec*. В каждом образце анализировали не менее 7000 ядер.

Результаты и обсуждение

Морфологическое строение семян клещевины. Семенная кожура плотная, склерифицирована, содержит лигнин и покрыта восковым налетом.

Семенной рубчик полностью закрыт и не имеет отверстия. На семенной коже в области зародышевого корешка находятся присеменники, которые у семян семейства молочайных называют карункулами (Мошкин, 1980). Между двумя долями эндосперма располагаются двулопастные осевые семядоли (рис. 1). Зародышевый корешок находится у микропиллярного конца семени. Микропиллярное отверстие у сформированного семени остается открытым.

Нами выявлено, что под семенным рубчиком в области зародышевого корешка имеется внутренняя тонкая семенная оболочка (рис. 2, слева). Эксперименты показали, что она проницаема для воды, непроницаема для химических соединений и не окрашивается хлоридом 2,3,5-трифенилтетразоля.

Семена из партии "А" характеризовались высокой всхожестью и прорастали через 72 ч при 25 °С. Семена из партии "Б" не прорастали при помещении в воду (по-видимому, они находились в состоянии послеуборочного

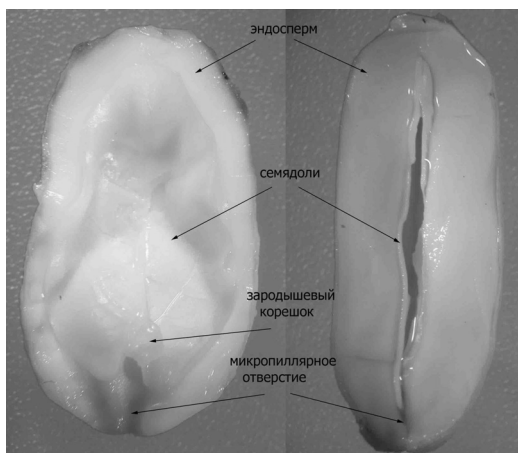
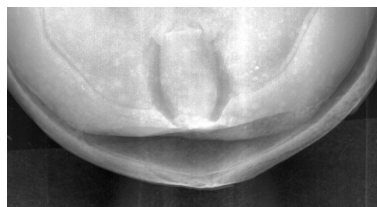
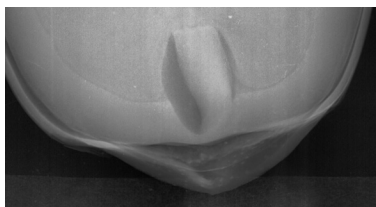


Рис. 1. Морфологическое строение семени клещевины



Партия "А" (семена способны к прорастанию)

Партия "Б" (семена не прорастают)

Рис. 2. Строение семенной оболочки у разных партий клещевины (рентгеноскопические снимки)

дозревания). Однако после того как в семенах из партии “Б” была нарушена целостность семенной оболочки в области зародышевого корешка (путем прокалывания), они проросли и развивались в нормально развитые проростки. Т.е, семенная оболочка являлась барьером, препятствующим прорастанию зародышевого корешка у семян клещевины.

На рисунке 2 видно, что у воздушно-сухих семян из партии “А”, которые обладали способностью к прорастанию, плотность семенной оболочки в области зародышевого корешка снижается. Об этом свидетельствует ослабление интенсивности рентгеновского облучения в этой области. У воздушно-сухих семян из партии “Б”, не способных к прорастанию, плотность семенной оболочки в области зародышевого корешка оставалась высокой.

Анализ репликации ДНК. Нами была проведен анализ репликации ДНК в зародышевых корешках семян клещевины партий “А” и “Б”, отличающихся по способности к проклевыванию зародышевого корешка сквозь семенную оболочку (таблица).

Известно, что в созревающих семенах клетки переходят в покой и задерживаются в основном в G_1/G_0 фазе клеточного цикла (De Castro, 1998). Клетки зародышевых корешков у семян клещевины являлись диплоидными и основное их количество (98%) уходило в покой с 2С набором ДНК в ядрах.

Через 48 ч прорастания в семенах из партии “А” появлялось 32% ядер с 4С набором ДНК, в результате отношение G_2/G_1 увеличивалось до 0,48. При этом в семенах из партии “Б” содержалось всего 10% ядер с 4С набором

Таблица

Изменение количества ядер с различным содержанием ДНК (выраженным как “С” значение) в зародышевых корешках семян клещевины

Время прорастания	Количество ядер (%)						Отношение (4С+8С)/2С	
	2С ДНК		4С ДНК		8С ДНК			
Партия “А”(1)								
0 ч	98,00		2,00		0		0,02	
24 ч	91,46		8,54		0		0,09	
48 ч	68,44		31,56		0		0,48	
72 ч (ВП)	48,24		44,38		7,38		1,08	
Партия “Б”								
	1	2	1	2	1	2	1	2
0 ч	98,32	98,32	1,68	1,68	0	0	0,02	0,02
24 ч	93,46	92,54	6,54	7,46	0	0	0,07	0,08
48 ч	90,15	88,76	9,85	11,24	0	0	0,11	0,13
72 ч	90,22	85,48	9,78	14,52	0	0	0,11	0,17
96 ч (ВП)	-	54,46	-	42,87	-	2,66	-	0,84

ВП — видимое прорастание зародышевого корешка сквозь семенную оболочку. 1 — семена с интактной семенной оболочкой; 2 — целостность семенной оболочки нарушена в области зародышевого корешка путем прокалывания.

ДНК, и отношение G_2/G_1 было равно 0,11. Через 72 ч зародышевые корешки семян из партии “А” проклевывались сквозь семенную оболочку. Это сопровождалось инициацией репликации ядерной ДНК, о чем свидетельствовало увеличение количества ядер с 4С набором ДНК до 45% и появление ядер с 8С набором ДНК. Отношение G_2/G_1 в таких семенах составляло 1,08. В то же время в набухающих семенах из партии “Б” инициации клеточного цикла не наблюдалось и отношение G_2/G_1 оставалось на уровне 0,11. Нарушение целостности семенной оболочки приводило к росту зародышевого корешка через 96 ч прорастания семян. Однако отношение G_2/G_1 увеличивалось всего до 0,84, что говорит о задержке скорости репликации ДНК.

Таким образом, проведен анализ строения семенной оболочки и репликации ядерной ДНК в клетках прорастающих зародышевых корешков в семенах клешевины, находящихся в состоянии послеуборочного дозревания (партия “Б”), и вышедших из него (партия “А”). Показано, что способность к прорастанию связана со строением семенной оболочки в области зародышевого корешка. В семенах из партии “А” репликация ДНК активировалась одновременно с проклевыванием зародышевого корешка сквозь семенную оболочку. В семенах из партии “Б” репликация ДНК задерживалась, и проклевывание зародышевого корешка происходило во многом за счет растяжения клеток.

Работа поддержана грантом БФФИ Б09МС-004.

Литература

1. Клешевина / под ред. В.А.Мошкина.— М.: Колос, 1980.— 130 с.
2. *Brigham R.D.* Castor: Return of an old crop // *New Crops / Eds. J. Janick, J.E. Simon.*— John Wiley and Sons, Inc., 1991.— P. 380–383.
3. Castor bean (*Ricinus communis*) an international botanical answer to biodiesel production and renewable energy / Dove biotech ltd.— <http://www.dovebiotech.com>.
4. *Chen G., Turner Ch., He X., Nguyen T., McKeon T., Chingcuanco D.L.* Expression Profiles of Genes Involved in Fatty Acid and Triacylglycerol Synthesis in Castor Bean (*Ricinus communis* L.) // *Lipids.*— 2007.— Vol.42.— P. 263–274.
5. *De Castro R.D.* A functional analysis of cell cycle events in developing and germinating tomato seeds: PhD thesis.— 1998.
6. *Rojas-Barros P., Haro A., Fernandez-Martinez J.M.* Inheritance of high oleic / low ricinoleic acid content in the seed oil of castor mutant OLE-1 // *Crop Science.*— 2005.— Vol.45.— P. 157–162.
7. *Osava M.* Energy in a Castor Bean (Online).— www.tierramerica.net/english/2003/0526/ianalisis.shtml.

Резюме

Проведен анализ строения семенной оболочки и репликации ядерной ДНК в клетках зародышевых корешков при прорастании семян клешевины, находящихся в состоянии послеуборочного дозревания, и вышедших из него.

Проведено аналіз будови насінневої оболонки і реплікації ядерної ДНК в клітинах зародкових корінців при проростання насіння ріцини, що знаходяться в стані післязбирального дозрівання.

The analysis of seed coat structure and replication of nuclear DNA in cells of the embryonic roots at germination of dormant and matured castor seeds has been done.

ТРУБАЧЕЕВА Н.В., ПЕРШИНА Л.А.

Институт цитологии и генетики СО РАН

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

**ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ЯДЕРНЫХ И МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ
ГЕНОМОВ В ПРОЦЕССЕ ФОРМИРОВАНИЯ
АЛЛОПЛАЗМАТИЧЕСКИХ ЛИНИЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ
T. AESTIVUM L. ($2n=42$), НЕСУЩИХ ЦИТОПЛАЗМУ
ДИКОРАСТУЩЕГО ЯЧМЕНЯ *H. MARINUM* SUBSP.
GUSSONEANUM HUDSON ($2n=28$)**

Отдаленная гибридизация и аллополиплоидизация лежат в основе видообразования многих покрытосеменных растений (Soltis, 2000). Кроме того, отдаленная гибридизация способствует переносу генов между видами без изменения их таксономической принадлежности (Rieseberg et al., 2007). Такой механизм, называемый интрогрессивной гибридизацией, способствует увеличению генетического разнообразия в природных популяциях, а в экспериментальных условиях — для создания селекционно-ценных форм культурных растений. В результате отдаленной гибридизации происходит не только реорганизация ядерных геномов, но и нарушение ядерно-цитоплазматических взаимоотношений, что в свою очередь оказывает влияние на жизнеспособность, фертильность и на проявление адаптивных признаков растений (Asakura et al., 2000; Atienza et al 2007). В связи с этим представляется актуальным одновременное исследование особенностей ядерных и цитоплазматических геномов в процессе формообразования у отдаленных гибридов. Целью данной работы было сравнительное изучение ядерных и митохондриальных геномов у беккроссных потомков гибридов между дикорастущим ячменем *H. marinum* subsp. *gussoneanum* и мягкой пшеницей *T. aestivum* в процессе формирования аллоплазматических линий мягкой пшеницы.

Материалы и методы

Изучены аллоплазматические линии, сформированные на основе самоопыленных потомков BC_1 – BC_4 поколений ячменно-пшеничных гибридов *H. marinum* subsp. *gussoneanum* Hudson ($2n=28$) x *T. aestivum* L. (Пиротрикс 28) ($2n=42$) (Першина и др., 2006). Линии разделялись на эуплоидные ($2n=42$) и анеуплоидные ($2n=40+2t$; $2n=40+4t$) и различались по проявлению фертильности. В таблице представлены данные о происхождении изученных линий. Использованы следующие методы анализа: геномная *in situ* гибридизация (GISH), ПЦР-анализ со специфическими праймерами к участку, фланкирующему $5'$ -конец 18S/5S повтора мтДНК злаков, ОТ-ПЦР 18S/5S повтора.

Результаты и обсуждение

Геномная *in situ* гибридизация (GISH). С помощью геномной гибридизации *in situ* был определен хромосомный состав аллоплазматических линий (*H. marinum* subsp. *gussoneanum*)-*T. aestivum*. Было обнаружено, что аллоплазматические линии могут содержать наряду с хромосомами мягкой

пшеницы хромосомы дикорастущего ячменя в замещенном или дополненном состоянии, или содержать только хромосомы пшеницы. Так, у линий, полученных от растений BC_1 -поколения, обнаружено либо замещение трех пар хромосом пшеницы на три пары хромосом ячменя (геномная формула $2n=36w+6b$ (w — wheat, b — barley), либо замещение одной пары хромосом пшеницы на одну пару хромосом ячменя ($2n=40w+2b$) (табл.). На основе BC_1 , BC_2 и BC_4 -поколений также выделены аллоплазматические дисомно замещенные линии. Кроме того, отдельные растения BC_2 - BC_3 -поколений стали источниками линий с замещением пары хромосомы пшеницы на телоцентрические хромосомы дикорастущего ячменя — $2n=40w+2tb$, а растения BC_1 -поколения — линий с дополнением одной или пары телоцентрических хромосом, $2n=42w+1tb$, $2n=42w+2tb$.

В то же время у некоторых эуплоидных линий BC_2 и BC_4 -поколений выявлено присутствие только хромосом мягкой пшеницы. Жизнеспособность и фертильность 42-хромосомных растений, содержащих наряду с хромосомами мягкой пшеницы и хромосомы дикорастущего ячменя, свидетельствует о компенсационной способности хромосом этого вида ячменя по отношению к гомеологичным хромосомам мягкой пшеницы.

Таблица

Происхождение и характеристики использованных в работе образцов аллоплазматических линий (*H. marinum* subsp. *gussoneanum*)-*T. aestivum*.

Происхождение линий	Геномная формула	Тип 18S/5S повтора	Проявление фертильности растений
$BC_1F_{10}:[(mar\ x\Pi)\ x\Pi]F_{10}$	$2n=40w+2b$	гетероплазмия	частично фертильные
$BC_1F_{10}:[(mar\ x\Pi)\ x\Pi]F_{10}$	$2n=34w + 6b$	гетероплазмия	частично фертильные
$BC_2F_{9,11}:[(mar\ x\Pi)\ x\Pi^2]F_{9,11}$	$2n=40w+2b$	гетероплазмия	частично фертильные
$BC_2F_8:[(mar\ x\Pi)\ x\Pi\ x H]F_8$	$2n=42w$	гомоплазмия (пшеница)	полностью фертильные
$BC_3F_8:[(mar\ x\Pi)\ x\Pi\ x H^2]F_8$	$2n=40w+2tb$	гомоплазмия (ячмень)	стерильные
$BC_3F_8:[(mar\ x\Pi)\ x\Pi\ x H^2]F_8$	$2n=40w+4tb$	гетероплазмия	частично фертильные
$BC_4F_7:[(mar\ x\Pi)\ x\Pi\ x H^3]F_7$	$2n=42w$	гомоплазмия (пшеница)	полностью фертильные
$BC_1F_8, 9:[(mar\ x\Pi)\ Am\ x\Pi]F_8,9$	$2n=42w+2tb$ $2n=42w+1tb$	гетероплазмия	полностью фертильные

Обозначения: *mar* — дикорастущий ячмень *H. marinum* subsp. *gussoneanum*, Π — сорт мягкой пшеницы *T. aestivum*, H — сорт мягкой пшеницы Новосибирская 67, Am — амфилоид, w — wheat, b — barley.

ПЦР и ОТ-ПЦР анализ митохондриального 18S/5S повтора мтДНК злаков. При изучении митохондриального 18S/5S повтора у аллоплазматических линий (*H. marinum* subsp. *gussoneanum*)-*T. aestivum* была обнаружена взаимосвязь между типом родительских последовательностей митохондриальной ДНК (мтДНК), хромосомным составом ядерного генома и фертильностью растений. Гетероплазмия (одновременное присутствие ячменных и пшеничных копий) и гомоплазмия (копии только одного из родителей) по ячменному типу была обнаружена у линий, содержащих в ядерном геноме хромосомы ячменя, гомоплазмия по пшеничному типу — только у тех линий, где хромосом ячменя найдено не было. Кроме того, тип гомоплазмии по тому или иному родительскому типу ассоциировал с проявлением фертильности. Так, полностью фертильные растения содержали только отцовские пшеничные копии мтДНК, полностью стерильные — материнские (ячменные). Гетероплазмия мтДНК была характерна как для частично, так и полностью фертильных растений, в геноме которых выявлены хромосомы дикорастущего ячменя. Изучение 18S/5S повтора, кодирующего 18S и 5S рРНК митохондрий, методом обратной транскрипции с последующей ПЦР показало, что у линий с гетероплазмией экспрессируются только материнские ячменные копии данного повтора. Этот результат согласуется с литературными данными, где была показана экспрессия только материнских копий различных митохондриальных локусов, находящихся в гетероплазматическом состоянии (Laser et al, 1997, Kitagawa et al, 2003). Как известно, транскрипция митохондриальных генов находится под контролем ядерного генома (Hedtke et al, 2000). По всей видимости, сложная структура ядерного генома, содержащего хромосомы разных видов, обуславливает не только гетероплазмия 18S/5S локуса, но и оказывает влияние на избирательную экспрессию родительских копий мтДНК.

Выводы

1. Образование аллоплазматических линий мягкой пшеницы *H. marinum* subsp. *gussoneanum*)-*T. aestivum* связано как с сохранением хромосом дикорастущего ячменя в замещенном или дополненном состоянии, так и с полной элиминацией хромосом ячменя из гибридного генома.

2. Тип родительских последовательностей 18S/5S повтора мтДНК у аллоплазматических линий (*H. marinum* subsp. *gussoneanum*)-*T. aestivum* ассоциирует с проявлением фертильности растений и наличием хромосом ячменя в ядерном геноме.

3. У аллоплазматических линий с гетероплазмией по 18S/5S повтору мтДНК наблюдается экспрессия только материнских ячменных копий.

4. Цитоплазма дикорастущего ячменя *H. marinum* subsp. *gussoneanum* не оказывает негативного действия на функционирование ядерного генома у аллоплазматических замещенных и дополненных линий мягкой пшеницы.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (№ 08-04-00598), Комплексного интеграционного проекта СО РАН, Программы Президиума РАН “Биоразнообразии и динамика генофондов”.

Литература

1. Asakura N., Nakamura C., Ohtsuka I. 2000. Homoeoallelic gene *Ncc-tmp* of *Triticum timopheevii* conferring compatibility with the cytoplasm of *Aegilops squarrosa* in the tetraploid wheat nuclear background. *Genome* 43: 503–511.
2. Atienza S.G., Martin A.C. et al. 2007. Effects of hordeum chilense cytoplasm on agronomic traits in common wheat. *Plant Breeding* 126: 5–8.
3. Baack, E.J., and L.H. Rieseberg. 2007. A genomic view of introgression and hybrid speciation.: *Current Opinion in genetics and Development* 17: 513–518.
3. Kitagawa K., Takumi S., Nakamura C. 2003. Selective transcriptional processing of the heteroplasmic mitochondrial *orf156* copies in the nucleus-cytoplasmic hybrids of wheat. *Plant Mol Biol* 53: 609–619.
4. Hedtke B., Borner T., Weihe A. 2000. One RNA polymerase serving two genomes. *EMBO Rep.* 1: 435–440.
5. Laser B., Mohr S. et al. 1997. Paternal and novel copies of the mitochondrial *orf25* gene in the hybrid crop-plant triticale: predominant transcriptional expression of the maternal gene copy. *Curr Genet* 29: 337–347.
6. Soltis P. S., Soltis D.E. 2000. The role of genetic and genomic attributes in the success of polyploids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 7051–7057.
7. Першина Л.А., Трубочеева Н.В., Раковцева Т.С., Белова Л.И., Девяткина Э.П., Кравцова Л.А. Особенности формирования самофертильных эуплоидных линий (2n=42) в результате самоопыления 46-хромосомных растений ВС1-поколения ячменно-пшеничных гибридов *Hordeum marinum* subsp. *gussoneanum* Hudson (*H. geniculatum* All.) (2n=28) x *Triticum aestivum* L. (2n=42). *Генетика*. 2006. 42: 1683–1690.

Резюме

Проведено сравнительное изучение ядерных и митохондриальных геномов аллоплазматических линий, полученных при беккроссировании и самоопылении ячменно-пшеничных гибридов *H. marinum* subsp. *gussoneanum* x *T. aestivum*. Определен их хромосомный состав и выявлена взаимосвязь между организацией ядерных геномов, родительским типом 18S/5S повтора и проявлением фертильности растений.

The comparative study of nuclear and mitochondrial genomes of alloplasmic lines produced using backcrossing and self-pollination of barley-wheat hybrids *H. marinum* subsp. *gussoneanum* x *T. aestivum* have been performed. Chromosome composition of these lines and the correlation between nuclear genome organization, parental type of the 18S/5S mitochondrial repeat and fertility of plants were established.

**ШИЛИНА Ю.В.¹, ГУЩА Н.И.¹, ДЯЧЕНКО А.И.¹, МОЛОЖАВАЯ О.С.²,
МОРОЗ Ю.И.²**

¹Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины, Украина, 003680, Киев-143, ул. Заболотного, 148, e-mail: j.shilina@gmail.com

²Киевский национальный университет им. Тараса Шевченко, Украина, 003022, Киев, пр. Глушкова, 2

ЭКСПРЕССИЯ ФАКТОРОВ ПАТОГЕННОСТИ ФИТОПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ КАК НЕСПЕЦИФИЧЕСКАЯ АДАПТИВНАЯ РЕАКЦИЯ

Известно, что бактерии и микромицеты, вызывающие заболевания у растений, в большинстве случаев способны выживать во внешней среде, а также достаточно долго сосуществовать с организмами-хозяевами, не

вызывая видимых симптомов заболеваний, пока изменения в окружающей среде не вызовут их пролиферацию и экспрессию факторов патогенности, что приводит к быстрому развитию болезни. У патогенов, при попадающих в организм хозяина или во внешнюю среду, при воздействии различных факторов, развиваются адаптивные реакции. В частности, вирулентность микроорганизмов рассматривается как функция их способности адаптироваться к организму хозяина [1]. Изменения свойств микроорганизмов при смене экологической ниши носят системный характер и связаны со значительными перестройками метаболизма, клеточной оболочки, изменением устойчивости к различным факторам, экспрессии факторов патогенности. Приспособление бактерий связано с изменениями в экспрессии генов и генных комплексов. Можно предположить, что в зависимости от условий среды в клетках микроорганизмов активируются разные эпигенетические программы. Переключение таких генных комплексов осуществляется при участии ряда регуляторных систем.

Клетки микроорганизмов могут специфически узнавать различные метаболиты хозяина, что является сигналом для активации их генов вирулентности. Распознавание химических сигналов происходит благодаря наличию у бактерий специфических рецепторов, связанных с системами трансдукции сигналов для активации транскрипции генов. Считается, что физические факторы действуют на бактерии также через соответствующие рецепторы непосредственно или путем изменения химического состава среды [1]. При достижении стрессовыми факторами определенного дозового порога они могут оказывать неспецифическое повреждающее воздействие на клетки, в частности, на их ДНК. При этом разные факторы могут вызывать сходные нарушения. Клетки способны реагировать на повреждения ДНК и запускать системы их репарации. В то же время может происходить изменение их патогенных свойств.

Целью данной работы было рассмотрение реакций фитопатогенных бактерий на повреждающие воздействия как неспецифических сигналов для экспрессии их факторов патогенности.

SOS-система репарации. Установлено, что SOS-системе репарации принадлежит важная роль в проявлении патогенности у микроорганизмов. Показана связь патогенности с функционированием локуса *recA* у *Vibrio cholerae* (биотипы *classical* и *El Tor*), энтерогеморагенных *E. coli* O157:H7, *Salmonella*, *Porphyromonas gingivalis* [2–5]. Вирулентность фитопатогенных бактерий *X. campestris* pv. *campestris* штаммов NRRL и B1459 по отношению к растениям капусты значительно снижалась у *recA*-мутантов, у которых также ослаблялась способность к гомологичной рекомбинации и репарации ДНК, повышалась чувствительность к действию метилметансульфоната и УФ [6]. У фитопатогенных бактерий мутагенная репарация имеет существенное экологическое значение, на что указывает, например, широкое распространение оперона *gul* AB (гомогичного хромосомному оперону *umu* DC и плазмидному *mus* AB) среди природных штаммов фитопатогенных бактерий

P. syringae, повышающее их выживаемость в условиях облучения солнечной радиацией и в фазе становления инфекции [7].

Данные ряда исследований свидетельствуют о возможности RecA-определенной регуляции при действии ДНК-повреждающих агентов экспрессии таких факторов патогенности, как пектинлиаза, липополисахарид и пиоцианин.

Пектинлиаза является единственным ферментом, способным гидролизовать без предварительного воздействия других ферментов высокоэтерифицированные растительные пектины [8]. Пектинлиазу считают главным ферментом, ответственным за мацерацию тканей картофеля [9]. Патогенность дефицитных по синтезу пектинлиазы мутантов *Ervinia carotovora subsp. Carotovora 71* была сниженной [10]. Нами показана возможность стимуляции пектинолитической активности разных штаммов *Ervinia carotovora* при действии ионизирующего излучения и УФ-В [11, 12]. Эти факторы одновременно являются индукторами SOS-ответа. Пектинолитические ферменты являются токсичными для растительных клеток и прямо или опосредовано вызывают их гибель [13]. Таким образом, интенсивное образование пектинолитических ферментов вызывает быструю гибель растительных клеток и препятствует развитию защитных реакций у растений.

На возможность участия SOS-системы в регуляции структуры и функции липополисахарида (ЛПС) указывают также данные о влиянии ее индуктора — налидиксовой кислоты на транскрипцию генов, связанных с регуляцией длины цепей ЛПС у *Salmonella enterica typhimurium ATCC14028* [14]. Как известно, ЛПС относится к основным компонентам внешней мембраны клеток грамотрицательных бактерий и является одним из факторов их вирулентности с выраженной плейотропностью действия на организм хозяина.

Об участии SOS-системы в регуляции экспрессии пиоцианина свидетельствуют данные о возможности индукции его синтеза налидиксовой кислотой [15]. Пиоцианин (1-гидрокси-5-метилфеназин) является пигментом из группы феназинов, синтезируемых бактериями *Pseudomonas aeruginosa* и другими флуоресцирующими видами *Pseudomonas*. Его относят к факторам вирулентности *P. aeruginosa*. Пиоцианин вызывает разные патологические эффекты у про- и эукариотических организмов, что указывает на существование эволюционно консервативных физиологических мишеней его действия [16]. Синтез пиоцианина и других феназинов *P. aeruginosa* необходим для развития симптомов заболевания у растений и гибели нематоды *Caenorhabditis elegans* [17]. Его цитотоксическое действие обусловлено образованием активных форм кислорода (O_2^- , H_2O_2).

Таким образом, функционирование глобальной регуляторной системы SOS-ответа обуславливает сопряженность экспрессии компонентов систем защиты (в частности, репарации ДНК) и факторов патогенности. Аналогичные функции свойственны также другой регуляторной системе — системе альтернативной σ -субединица РНК-полимеразы (RpoS), которая активируется в условиях стресса и определяет синтез белков, участвующих в процессах адаптации, специфически взаимодействуя с промоторами их генов.

Система глобального регулятора RpoS участвует в обеспечении защиты бактерий при их выживании на поверхности листьев растений [18, 19]. При мутациях RpoS наблюдали увеличение чувствительности фитопатогенных бактерий *P. syringae* к УФ-А [18]. Мутанты RpoS *E. coli* характеризовались повышенной чувствительностью к H₂O₂ и высокой концентрации солей [19]. Стартовый сайт гена *ogt*, который у *Salmonella* кодирует O₆-метилгуанин-ДНК-метилтрансферазу, принимающую участие в репарации алкильных повреждений в ДНК, был идентифицирован как Rpo-регулируемый промотор [20].

Под контролем RpoS находится около 50 генов (белки контроля клеточного цикла, синтеза и расхода запасных питательных веществ, защиты от стрессов — теплового, осмотического, окислительного, некоторые белки переключения метаболизма на анаэробный путь и др.), а также экспрессия ряда генов вирулентности [21, 22]. Сам RpoS рассматривают в качестве фактора вирулентности у ряда патогенов [23]. Система RpoS участвует в регуляции экспрессии факторов патогенности *Erwinia* (экстрацеллюлярных ферментов — изоформ пектацелиязы, полигалактоураназы, целлюлазы), гена элиситора харпина *hrpN* и глобального регуляторного негативного гена *rsmA* *R. solanacearum* [24, 25]. У мутанта RpoS *R. solanacearum* изменялось образование нескольких факторов вирулентности и при заражении ним растений медленнее развивались симптомы заболевания [25]. Мутанты *groN* (сигма-фактор σ^{54}) *P. syringae* pv. *maculicola* ES4326 и *P. syringae* pv. *glycinea* PG4180 были непатогенны для растений арабидопсиса и сои и утрачивали способность индуцировать реакцию сверхчувствительности у табака [26]. Альтернативный σ -фактор HrpL (σ^L) контролирует активацию транскрипции генов регулона *hrp/hrc* (в частности, авт-генов), которые детерминируют круг хозяев и устойчивость фитопатогенных бактерий к факторам среды. В частности, продукт гена *hrpL* участвует в регуляции образования токсина коронтина у *P. syringae* pv. *tomato* DC300 [26].

Существует также связь между синтезом стрессор-индуцибельных белков и фенотипическим выражением вирулентности. Например, инактивация регуляторного гена теплового шока *htrA* у *S. typhimurium* приводит к образованию авирулентных мутантов [27].

Регуляторная роль изменения конформации ДНК. Полагают, что эффекты экзогенных и эндогенных воздействий могут восприниматься непосредственно на уровне торзионного давления (конформации) клеточной ДНК [28]. Функции регуляторов транскрипции, направленные на стимуляцию открытия промоторов генов-мишеней, во многом определяются топологическим состоянием ДНК, которое, с одной стороны, является индикатором условий внешней среды, а с другой, само по себе регулирует активность промоторов. Было высказано предположение о существовании потенциально активных последовательностей генов (эпигенетических программ), специфичных к данным условиям (конформационное состояние ДНК, интервал концентрации противоионов) [29].

Экспрессия генов, связанных с вирулентностью, также зависит от суперспирализации ДНК. Мутации в генах бактериальных топоизомераз, контролирующих суперспирализацию ДНК, в некоторых случаях приводят к изменению экспрессии факторов вирулентности [30]. Изменения конформационной структуре хроматина, с одной стороны, способствует переключению режима функционирования клеток в новый режим функционирования, в частности, активация SOS-системы репарации и системы глобального регулятора *RpoS*, а с другой, сами контролируются генами SOS- и *RpoS*-регулонов.

Выводы. Накопленные к настоящему времени результаты исследований свидетельствуют, что у ряда бактерий возможна стимуляция экспрессии факторов патогенности в ответ на повреждающее действие различных стрессоров. Для факторов вирулентности, регулируемых таким способом, характерны неспецифическая токсичность и супрессивное действие на защитные системы хозяина, независимо от его таксономического положения. Ввиду этого существует потенциальная опасность преодоления такими патогенами существующих видовых барьеров и появления новых заболеваний, что особенно вероятно при действии различных стрессовых факторов в экологически неблагоприятных условиях.

Литература

1. *Домарадский И.В.* Вирулентность бактерий как функция адаптации // Журн. микробиол.— 1997.— №4.— С. 16–20.
2. *Kumar K.K., Srivastava R., Sinha V.B., Michalski J., Kaper J.B., Srivastava B.S.* RecA mutations reduce adherence and colonization by classical and El Tor strains of *Vibrio cholerae* // Microbiol.— 1994.— 140, 5.— P. 1217–1222.
3. *Fuchs S., Muhldorfer I., Donohue-Rolfe A., Kerenyi M., Emody L., Alexiev R., Nenkov P., Hacker J.* Influence of RecA on in vivo virulence and Shiga toxin 2 production in *Escherichia coli* pathogens // Microb. Pathog.— 1999.— 27, 1.— P. 13–23.
4. *Buchmeier N.A., Libby S.J., Xu Y., Loewen P.C., Switala J., Guiney D.G., Fang F.C.* DNA repair is more important than catalase for *Salmonella* virulence in mice // J. Clin. Invest.— 1995.— 95, 3.— P. 1047–1053.
5. *Liu Y., Fletcher H.M.* The *recA* gene in *Porphyromonas gingivalis* is expressed during infection of the murine host // Oral Microbiol. Immunol.— 2001.— 16, 4.— P. 218–223.
6. *Martinez S., Martinez-Salazar J., Camas A.* Evaluation of the role of *recA* protein in plant virulence with *recA* mutants of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* // Mol. Plant-Microbe Interact.— 1997.— 10, 7.— P. 911–916.
7. *Kim J.J., Sundin G.W.* Regulation of the *ruAB* mutagenic DNA repair operon of *Pseudomonas syringae* by UV-B (290 to 320 nanometers) radiation and analysis of *ruAB*-mediated mutability in vitro and in planta // J. Bacteriol.— 2000.— 182, 21.— P. 6137–6144.
8. *Alana A., Alkorta I., Dominguez J.B., Llama M.J., Serra J.L.* Pectin lyase activity in a *Penicillium italicum* strain // Appl. Environ. Microbiol.— 1990.— 56.— P. 3755–3759.
9. *Van den Broek L.A.M., den Aantrekker E.D., Voragen A.G.J., Beldman G., Vincken J.P.* Pectin lyase is a key enzyme in the maceration of potato tuber // J. Sci. Food Agric.— 1997.— 75.— P. 167–172.

10. Liu Y., Cui Y., Mukherjee A., Chatterjee A.K. Activation of the *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* pectin lyase structural gene *pnlA*: a role for *rdgB* // *Microbiology*.— 1997.— 143.— P. 705–712.
11. Шилина Ю.В., Гуца Н.И., Дяченко А.И., Ромашко В.М. Радиационный метод оценки адаптивного потенциала фитопатогенных бактерий с разной специализацией // Материалы Международной конференции “Радиопротекторы, эффективные при действии хронического облучения в малых дозах” (16–20 июня 2008 г., г.Николаев, Украина).— Николаев, 2008.— С. 63–64.
12. Шилина Ю.В., Гуца Н.И., Дяченко А.И., Ромашко В.М. Модификация взаимоотношений в системе патоген-растение, обусловленная влиянием УФ-В на фитопатогенные бактерии *Erwinia* // Материалы V з'їзду радіобіологічного товариства України (15–18 вересня 2009 р., м.Ужгород).— Ужгород, 2009.— С. 173.
13. Basham H.G., Bateman D.F. Killing of plant cells by pectic enzymes: the lack of direct injurious interaction between pectic enzymes or their soluble reaction products and plant cells // *Phytopathology*.— 1975.— 65.— P. 141–153.
14. Dowd S.E., Killinger-Mann K., Blanton J., San Francisco M., Brashears M. Positive adaptive state: microarray evaluation of gene expression in *Salmonella enterica* typhimurium exposed to nalidixic acid // *Foodborne Pathogens and Disease*.— 2007.— 4, 2.— P. 187–200.
15. <http://fr.wikipedia.org>.
16. Ran H., Hassett D.J., Lau G.W. Human targets of *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*.— 2003.— 100, 24.— P. 14315–14320.
17. Mavrodi, D.V., Bonsall R.F., Delaney S.M., Soule M. J., Phillips G., Thomashow L.S. Functional analysis of genes for biosynthesis of pyocyanin and phenazine-1-carboxamide from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 // *J. Bacteriol.*— 2001.— 183.— P. 6454–6465.
18. Miller C.D., Mortensen W.S., Braga G.U., Anderson A.J. The *rpoS* gene in *Pseudomonas syringae* is important in surviving exposure to the near-UV in sunlight // *Curr. Microbiol.*— 2001.— 43, 5.— P. 374–377.
19. Sarniguet A., Kraus J., Henkels M.D., Muehlchen A.M., Loper J.E. The sigma factors affects antibiotic production and biological control activity of *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 // *Proc. Nat. Acad. Sci.*— 1995.— 92.— P. 12255–12259.
20. Ibanez-Ruiz M., Robbe-Saule V., Hermant D., Labrude S., Norel F. Identification of RpoS (S)-regulated genes in *Salmonella enterica* serovar typhimurium // *J. Bact.*— 2000.— 182, 20.— P. 5749–5756.
21. Головлев Е.Л., Головлева Л.А. Физиология микробной клетки и метаболическая инженерия // *Микробиология*.— 2000.— 69, 2.— С. 149–162.
22. Nickerson C.A., Curtiss R. Role of sigma factor RpoS in initial stages of *Salmonella typhimurium* infection // *Infect. Immun.*— 1997.— 65, 5.— P. 1814–1823.
23. Cunning C., Brown L., Elliott T. Promoter substitution and deletion analysis of upstream region required for *rpoS* translational regulation // *J. Bact.*— 1998.— 180, 17.— P. 4564–4570.
24. Mukherjee A., Cui Y., Ma W., Liu Y., Ishihama A., Eisenstark A., Chatterjee A.K. RpoS (sigma-S) controls expression of *rsmA*, a global regulator of secondary metabolites, harpin, and extracellular proteins in *Erwinia carotovora* // *J. Bact.*— 1998.— 180, 14.— P. 3629–3634.
25. Flavie A.B., Schell M.A., Denny T.P. An RpoS (sigmaS) homologue regulates acylhomoserine lactone-dependent autoinduction in *Ralstonia solanacearum* // *Mol. Microbiol.*— 1998.— 28, 3.— P. 475–486.

26. Pecaloza-Vobzquez A., Fakhr M.K., Bailey A.M., Bender C.L. AlgR functions in algC expression and virulence in *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* // *Microbiology*.— 2004.— 150.— P. 2727–2737.

27. Баснакьян И.А., Бондаренко В.М., Мельникова В.А., Белявская В.А. Стрессор-индуцибельные бактериальные белки и вирулентность // *Журн. микробиол.*— 2001.— №5.— С. 101–108.

28. McClellan J.A., Boublikova P., Palecek E., Lilley D.M.J. Superhelical torsion in cellular DNA Responds directly to environmental and genetic factors // *Proc. Nat. Acad. Sci.*— 1990.— 87.— P. 8373–8377.

29. Снутковский Д. М. Концепция действия малых доз ионизирующих излучений на клетки и ее возможные приложения к трактовке медико-биологических последствий // *Радиобиология*.— 1992.— Т.32, №3.— С. 383–400.

30. Martinez J.L., Baquero F. Mutation frequencies and antibiotic resistance // *Antimicrob. Agents. Chemotherapy*.— 2000.— 44, 7.— P. 1771–1777.

Резюме

Розглянуто неспецифічні механізми регуляції експресії факторів патогенності з точки зору адаптивної відповіді бактерій. В якості прикладів показано роль SOS-системи репарації та глобального регулятора RpoS в цих процесах.

Рассмотрены неспецифические механизмы регуляции экспрессии факторов патогенности с точки зрения адаптивного ответа бактерий. В качестве примеров показана роль SOS-системы репарации и глобального регулятора RpoS в этих процессах.

The unspecific mechanisms of pathogenicity factors expression are considered from the point of view the adaptive answer of bacteria. As examples the role of SOS-repair and global regulator RpoS are examined in these processes.

ШИМКО В.Е., ГОРДЕЙ И.А.

Институт генетики и цитологии НАН Беларуси

Беларусь, 220027, Минск, ул. Академическая, 27, e-mail:shymko@mail.ru

МОЛЕКУЛЯРНО-ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЦМС ФОРМ В СЕЛЕКЦИИ НА ГЕТЕРОЗИС ОЗИМОЙ РЖИ (*SECALE CEREALE* L.)

Исследования, связанные с использованием эффекта гетерозиса, проводятся практически у всех культур. С точки зрения практического использования эффекта гетерозиса, рожь занимает в настоящее время лидирующее положение среди злаков. Новым подходом в гетерозисной селекции озимой ржи является использование цитоплазматической мужской стерильности (ЦМС). Современные гибриды F₁ озимой ржи с использованием ЦМС превышают по урожайности традиционные популяционные сорта на 15–20% (Geiger, 1985). Использование цитоплазматической мужской стерильности (ЦМС) даёт возможность проведения контролируемых скрещиваний у ржи.

ЦМС обусловлена специфической мутацией плазмогенов и наследуется по материнской линии. Восстановление фертильности осуществляется при взаимодействии такой цитоплазмы (цит-*s*) с ядерными генами (*Rf*) восстановления фертильности [1, 2]. Типы ЦМС *P* и *G*, открытые в свое время Гейгером (*P*-тип, 1970), Адольфом и Винклером (*G*-тип, 1985), различаются между собой по генетическому контролю [3]. Установлено, что *G*-ЦМС контролируется митохондриальным геномом и одним основным ядерным ms_1 (*rf*) геном, локализованным на хромосоме 4RL; также описаны гены-модификаторы на хромосомах 3R (ms_2) и 6R (ms_3). *P*-ЦМС имеет более сложный контроль, который до конца не изучен. По одним данным этот тип контролируется «стерильной» цитоплазмой и двумя ядерными генами. Другие исследователи утверждают, что *ms* генов не два, а четыре [4]. Согласно результатам исследований с использованием технологии ПДРФ, *P*-ЦМС контролируется двумя основными ядерными *ms* генами, локализованными на хромосомах 1R и 4R, а также тремя *ms* генами с меньшим эффектом, локализованными на хромосомах 3R, 5R и 6R [8]. Однако, до конца не выяснено, доминантными либо рецессивными генами контролируется *P*-ЦМС. Результаты исследований Гейгера показали, что в закреплении стерильности участвуют рецессивные гены, доминантные восстанавливают фертильность пыльцы. В одной из последних публикаций Мельца [2] отмечено, что закрепление стерильности контролируется доминантными генами. В настоящее время недостаточно изучен генетический контроль используемых систем ЦМС. Слабо изучены особенности взаимодействия генетических систем ЦМС и самофертильности. Использование молекулярно-генетических методов исследований позволило локализовать ряд генов самофертильности: Sf_1 (1R); Sf_2 (2R); Sf_3 (4R); Sf_5 (5R); Sf_4 (6R) [8]. Картированы 3 мутации, определяющие самофертильность в локусах *S*, *Z* и *S5* самонесовместимости на хромосомах 1R; 2R и 5R соответственно. Определены один белковый и три ДНК-маркера для этих локусов [5, 6]. В настоящее время также проводятся исследования по поиску и использованию белковых маркеров в генетическом анализе ржи, тритикале, пшеницы [5–7]. Исследования, направленные на изучение механизмов взаимодействия систем ЦМС (*S/msms*) и самофертильности (*Sf*, *Zf*), а также изучение особенностей генетического контроля различных типов ЦМС (*P*- и *G*-типов) позволят повысить эффективность создания гетерозисных гибридов F_1 озимой ржи.

Материалы и методы

В качестве исходного материала использовали самостерильный сорт озимой ржи Калинка, самофертильные линии (I_6-I_{16}), включающие высоко- и среднестебельные линии, линии с доминантным контролем короткостебельности. Объектами исследований являлись гибриды F_1 озимой диплоидной ржи с цитоплазматической мужской стерильностью (ЦМС) *P*- и *G*-типов. Исследование и идентификацию форм ржи проводили методом электрофоретического анализа белков эндосперма семян, разработанным в отделе молекулярной биологии ВИР [8], в нашей модификации, и стандартным

арбитражным методом, включенным в Международные правила анализа семян. Хромосомный анализ исследуемого материала проводили путем дифференциального окрашивания хромосом по методике, разработанной в Институте молекулярной биологии РАН[9]. Основным методом создания и изучения новых линий и гибридов F₁ являлась парная изоляция и топ-кросс МС-тестеров и самофертильных линий. В полевых условиях растения выращивали мелкоделяночным способом на опытном поле Института генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси (ИГЦ НАН Беларуси).

Результаты и обсуждение

Результаты генетического анализа у ржи все больше основываются на изучении качественного состава различных ферментных систем; расположения генов в определенных хромосомах и выявлении совместного наследования. Информация о локализации и сцеплении генов у ржи обобщена в работах Мельца и Шлегеля [2, 6]. Наибольший интерес представляют различающиеся по рисунку дифференциальной окраски хромосомом гомозиготные, инбредные линии ржи, у которых отмечается стабильное наследование С-блоков в потомстве.

В цитогенетическом исследовании использованы мужски стерильные (МС) формы и инбредные линии озимой ржи из генетической коллекции ИГЦ НАН Беларуси. В кариотипе МС-форм выявлено уменьшение гетерохроматиновых блоков по сравнению со стандартом (Sybenga, 1983). Линия 51-16 имела мелкие блоки гетерохроматина в спутнике ядрышкообразующей хромосомы 1R и на теломере короткого плеча хромосомы 6R. У линии 168 кариотип не отличался от стандарта. А линии 37-10 и 37-13 характеризовались увеличенным блоком теломерного гетерохроматина на длинном плече хромосомы 7R/2R (рис. 1).

Проведен электрофоретический анализ секалина для оценки функциональной активности хромосом генома ржи (рис. 2).

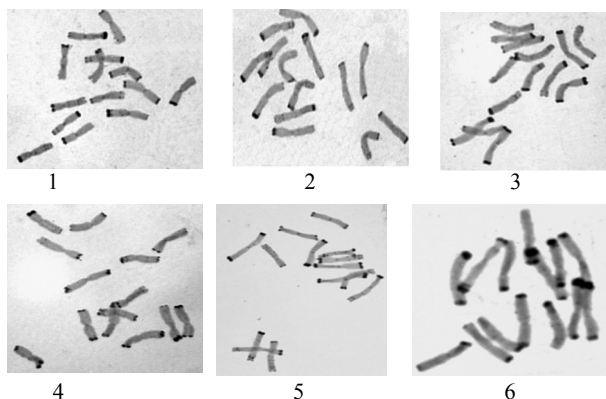


Рис. 1. Кариотипы мужски стерильных форм и инбредных линий озимой ржи: 1 — MS-2, 2 — ЗС-2, 3 — Л51-16, 4 — Л168, 5 — Л 37-13, 6 — Л37-10

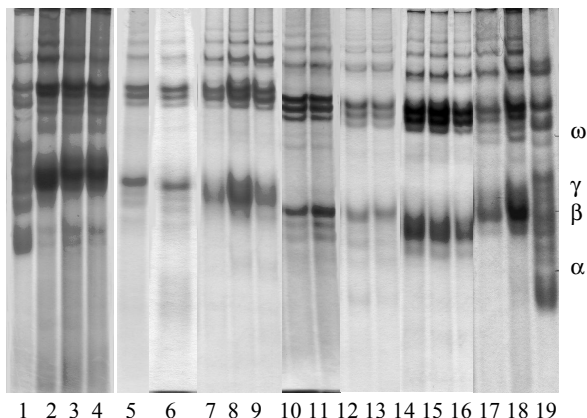


Рис. 2. Электрофоретические спектры секалина ржи сорта-анализатора Кавказ (1,19) и мужски стерильных форм: МС — Р-типа (2–4, 7–9), МС — G-типа (5, 6), ЗС — G-типа (10–13), ЗС — Р-типа (14–18)

Общим для спектра секалина мужски стерильных форм являлось наличие фракций, характерных для проламинов ржи — β , γ , и ω с четким расположением компонентов в пределах каждой фракции. МС-формы G-типа отличались от МС-форм Р-типа по составу компонентов, кодируемых локусом *Sec1* (табл.). В первом случае это компоненты $\omega 234\gamma 5$, а во втором — $\omega 234$, что связано с различным генетическим происхождением МС-форм (табл.). Показана изменчивость спектра секалина в β и γ зонах у изучаемых форм. Компонент $\gamma 1$ встречается у 63% растений МС-линий G-типа. Компоненты $\beta 3$, $\beta 4_1 4$ встречались у МС-линий Р-типа от 19 до 33% растений. Компоненты $\beta 1$ $\gamma 1$ встречались у закрепителей стерильности (ЗС) G-типа от 55–82% растений. Компоненты $\beta 3$ $\gamma 2$ $\gamma 4$ встречались у ЗС Р-типа от 9 до 75% растений. Таким образом анализ спектров секалина показал, что мужски стерильные формы генетически не однородны.

Проведены скрещивания доноров ЦМС и самофертильных линий озимой ржи, что позволило выделить высокопродуктивные гибриды, а также закрепители стерильности (S/rf) и восстановители фертильности (N/Rf). Как показали результаты наших исследований, создание гетерозисных гибридов F_1 с использованием ЦМС Р- и G-типов, и современных популяционных сортов и самофертильных линий позволило достичь высокого уровня восстановления фертильности пыльцы и эффекта гетерозиса по зерновой продуктивности.

При простом скрещивании ЦМС-форм Р- и G-типа с самофертильными линиями не выявлено гибридов, превышающих стандарт по зерновой продуктивности. Двойные межлинейные и линейнопопуляционные гибриды на основе ЦМС-форм Р- и G-типа, превышали стандарт по изучаемым признакам. Двойные линейнопопуляционные гибриды с участием самофертиль-

Белковые формулы суммарных спектров запасных белков секалинов сорта-анализатора Кавказ и мужски стерильных форм озимой ржи

NN	Белковая формула			
	α	β	γ	ω
Пшеница Кавказ	5 6 7	<u>2 3 4 5</u>	<u>2 3 5</u>	<u>2 3 4</u> <u>5 6</u> <u>8 9</u>
МС –G типа		<u>1 2 3 4 5</u>	<u>1</u> <u>4 5</u>	<u>2 3 4</u> <u>7 8</u> 10 <u>12</u>
МС –P типа		<u>3 4</u> 4 5	1 <u>4</u>	<u>2 3 4 5</u> <u>7 8</u> <u>10</u> <u>12</u>
ЗС –G типа		2 3 ₁ 4 ₁ 5	1 4 5	<u>2 3 4</u> <u>7 8</u> <u>10</u> 12
ЗС –P типа		3 4 ₁ 4 5	1 4	1 <u>2 3 4 5</u> <u>7 8</u> 10 12

ных линий (♂37–10, 51–16) превосходили стандарт по всем анализируемым признакам зерновой продуктивности. Уровень конкурсного гетерозиса составлял в отдельных комбинациях 40–93%. Для гибридов на основе ЦМС G-типа характерна низкая частота генов закрепления стерильности [2]. Результаты наших исследований показали, что наиболее высокий эффект гетерозиса по признакам продуктивности растений проявлялся у простых межлинейных гибридов с использованием ЦМС G-типа и самофертильных линий. Уровень конкурсного гетерозиса составлял 7–59%, и зависел от характера взаимодействия отцовского и материнского компонента скрещивания. Между гибридами F_1 на основе ЦМС P- и ЦМС G-типов выявлены достоверные различия по всем изучаемым признакам продуктивности растений.

Выводы

Показано, что мужски стерильные формы и самофертильные линии различаются по рисунку C-бэндинга хромосом. Мужски стерильные формы идентифицированы по наличию определенных типов спектра, частоте встречаемости и особенности экспрессии генов запасных белков семян в геноме ржи.

Изменчивость спектра секалина связана в основном с компонентами β и γ зон что связано с различным генетическим происхождением. В ω зоне четко представлены компоненты $\omega 234$, $\omega 234g5$, кодируемые транслоцированным локусом хромосомы 1R. Мужски стерильные формы генетически не однородны.

Создание гетерозисных гибридов F_1 с использованием как ЦМС P- и G-типа и самофертильных линий озимой ржи позволило достичь уровня конкурсного гетерозиса (20–40%) по зерновой продуктивности.

Литература

1. *Rafalski A.* The genetic diversity of components of rye hybrids. / A. Rafalski, L. Madej, I. Wisniewska, M. Gawel // Cellular&Molecular biology letters.— 2002.— V.7.— P. 471–475.
2. *Melz Gi.* Genetics of a male-sterile rye of “G-type” with results of the first F₁ hybrids / Gi. Melz, Gu. Melz, F. Hartmann // In proc. Int. Symp. on rye breed. and gen. EUCARPIA.— 2001.— P. 43–50.
3. *Steinborn R.* A new type of cytoplasmic male sterility in rye (*Secale cereale* L.): analysis of mitochondrial DNA / R. Steinborn, W. Schwabe, A. Weihe, K. Adolf I, G. Melz, and T. Berner // Theor Appl Genet.— 1993.— V.85.— P. 822–824.
4. *Madej L.* Ocena plodnosci mieszanow zyta / L. Madej, R. Osinski, J. Jagodinski // Biuletyn Inst. Hodowli i Aklimat. Roslin., Radzikow, Poland.— 1995.— N195/196.— P. 283–290.
5. Теоретические основы селекции зерновых культур на продуктивность / Л.В. Хотылева [и др.]; под общ. ред. Д.Ф. Санько.— Минск: Наука и техника, 1987.— 279 с.
6. *Schlegel R.* Genes, marker and linkage data of rye (*Secale cereale* L.): 5th updated inventory / R. Schlegel, G. Melz, V. Korzun // Euphytica.— 1998.— N101.— P. 23–67.
7. *Егорова И.А.* Анализ сцепления биохимических и морфологических маркеров 1R-, 2R-, и 5R-хромосом ржи с мутациями автофертильности в основных локусах несовместимости / И.А. Егорова, Т.И. Пенева, О.А. Баранова, А.В. Войлоков // Генетика.— 2000.— Т.36, №12.— С. 1688–1696.
8. *Пенева Т.И.* Анализ и регистрация сортов и линий ржи по секалину методом электрофореза (методические указания) / Т.И. Пенева, Н.М. Мартыненко, В.Г. Конарев.— Л.— 1989.— 52 с.
9. *Бадаев Н.С.* Идентификация хромосом А и D геномов пшеницы с использованием замещений и перестроек между гомеологами у пшениц и тритикале / Н.С. Бадаев, Е.Д. Бадаева, Н.Л. Большева, А.В. Зеленин // Докл. АН СССР.— 1983.— Т.273, №4.— С. 994–996.

Резюме

Показано, что мужски стерильные формы и самофертильные линии различаются по рисунку С-бэндинга хромосом. Мужски стерильные формы идентифицированы по наличию определенных типов спектра, частоте встречаемости и особенности экспрессии генов запасных белков семян в геноме ржи. Изменчивость спектра секалина связана в основном с компонентами β и γ зон. Создание гетерозисных гибридов F₁ с использованием как ЦМСП- и G-типа и самофертильных линий озимой ржи позволило достичь эффекта гетерозиса по зерновой продуктивности.

Male-sterile forms and self-fertile lines differ in C-banding of chromosomes. Male-sterile forms are identified by the presence of certain types of spectrum, their occurrence frequency and the feature of gene expression of reserve proteins in rye. Variability of secaline spectrum is related basically to components of β and γ zones. Development of heterotic hybrids F₁ using CMS P- and G-type and self-fertile lines differ of winter rye has allowed us to reach heterosis effect for grain productivity.

ЮДАНОВА¹ С.С., ПОЗНЯК^{1,2} С.И., МАЛЕЦКАЯ¹ Е.И.

¹ *Институт цитологии и генетики СО РАН,*

Россия, 630090, Новосибирск, пр. Лаврентьева, 10; e-mail: sonia_y@ngs.ru

² *Новосибирский Государственный Аграрный Университет, МСХ РФ,*

Россия, 630039, Новосибирск, ул. Добролюбова, 160

ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ ГОДА НА ЗАВЯЗЫВАЕМОСТЬ АГАМОСПЕРМНЫХ СЕМЯН И ПАРТЕНОКАРПИЧЕСКИХ ПЛОДОВ У САХАРНОЙ СВЕКЛЫ

Возникновение семян без участия пыльцевых зерен обозначают терминами “однородительская”, “апозиготическая” или “агамоспермая” репродукция. На цветоносных побегах свеклы образуется огромное, исчисляемое тысячами, число цветков (или соцветий-клубочков). Развитие плода (плодоили карпогенез) из тканей неоплодотворенного цветка называют партенокарпией. Эмбриогенез семени как при однородительской, так и двуродительской репродукции схожи. Цитоэмбриологические механизмы репродукции семян при апозиготии у свеклы включают: а) соматическую (нуцеллярную) эмбрионию — развитие зародыша из соматических клеток цветка; б) генеративную эмбрионию — развитие зародыша в закрытом цветке из клеток зародышевого мешка [1, 2, 3].

Как показали наблюдения, уровень семенной продуктивности пыльцестерильных растений при выращивании без опылителей сильно варьирует, однако в среднем этот уровень вполне сравним с пыльцефертильными растениями [3, 4, 5]. Внутрипопуляционная вариабельность числа плодов (и семян) на растениях амбивалентный признак: он детерминируется генотипом растений, а также автономными процессами самоорганизации, происходящими в тканях растений при морфогенезе в ходе вегетации растений (эпигенетическая изменчивость), которые напрямую от генотипа не зависят.

Цель настоящей работы — провести сравнительный анализ изменчивости долей агамоспермных семян и партенокарпических плодов, получаемых при однородительском размножении сахарной свеклы в различные годы и в смежных поколениях.

Материал и методы

Материалом для исследования послужили: 1) подлиння, созданная на основе пыльцестерильной линии мсСОАН-5 с S-типом цитоплазмы селекции лаборатории популяционной генетики ИЦиГ СО РАН (мсСОАН-5-А-пА6)_{аз}-35А и 2) потомство этой подлинни, полученное при однородительской репродукции — (мсСОАН-5-А-пА6)_{аз}-35А-34А. В дальнейшем при описании результатов наблюдений будем использовать сокращенное обозначение “35А” и “35А-34А” соответственно.

Методика апозиготической семенной репродукции заключается в выращивании пыльцестерильных растений на изолированном участке [3,4]. У таких растений во время цветения нередко наблюдается мультивидуальная¹

¹ “мультивидуум” — полисистема, составленная из множества повторяющихся единиц, реализующих собственные программы индивидуального развития. Растительный организм состоит из множества фито- или метамеров (субиндивидов), каждый из которых реализует собственную программу индивидуального развития [6].

изменчивость: на цветоносных побегах закладывается множество цветков, одна часть которых формирует полностью дефектную пыльцу ($m\sigma$ и $m\sigma 1$), а другая часть — полуфертильную пыльцу ($m\sigma 2$). Для создания беспыльцевого режима на участке в период бутонизации и ежедневно во время цветения у всех растений определяют фенотип пыльцы. Растения с полуфертильной пыльцой ($m\sigma 2$) удаляют с поля и они не участвуют в размножении. Удаление таких растений требует чистота эксперимента, хотя наличие небольшого числа $m\sigma 2$ -растений не может оказать влияния на формирование семян у пыльцестерильных растений. В норме для реализации перекрестного оплодотворения требуется, чтобы на рыльце каждого цветка попало и проросло до 300–400 пыльцевых зерен [7]. “Многие исследователи..., работавшие с разнообразными растениями, показали, что единичные пыльцевые зерна часто совсем не прорастают на рыльцах, а если и прорастают, то обеспечить нормальное течение процесса оплодотворения не могут” [8, с. 195]. Говоря другими словами, оплодотворение у растений представляет собой кооперативный (синергетический) процесс с непременным участием большого числа пыльцевых зерен и пыльцевых трубок. Поэтому, даже если не проводить в поле выбраковки $m\sigma 2$ растений, то достаточного числа пыльцевых зерен, необходимого для осуществления перекрестного оплодотворения эти растения произвести не в состоянии.

В течение 4 лет (2004–2006 гг., 2008 г.) у растений образца “35А” проводили изучение семенной продуктивности при однополой (апоизоготической) репродукции. Такую же работу проводили с образцом “35А-34А” в 2006 и 2008 гг.

Определение доли партенокарпических плодов оценивали выборочным методом, проращивая их в чашках Петри (по 100 шт. от каждого растения). Плоды промывали в проточной воде (2 сут.), затем помещали в термостат на проращивание ($T=25\text{ }^{\circ}\text{C}$). Первый подсчет проросших плодов проводили в конце 2-х суток после закладки в термостат, окончательный — на 10-е сутки. Плод, давший хотя бы один нормальный проросток, относили к группе агамоспермных. Плоды, не проросшие в течение 10 дней — к партенокарпическим.

Статистические методы. По каждой выборке находили средние геометрические (y) и их ошибки (m). Использование средней геометрической вызвано тем, что “число плодов на растениях” — признак счетный и в каждой выборке наблюдается очень большой разброс значений. Сравнение уровня семенной продуктивности проводили с помощью t -критерия Стьюдента [9].

Доли агамоспермных и партенокарпических плодов в семенных партиях сравнивали с нуль гипотезой, согласно которой процессы эмбрио- и карпогенеза независимы и реализуются случайным образом. В этом случае на побегах два типа плодов (агамоспермных и партенокарпических) должны встречаться в пропорции 1:1. При сравнении доли партенокарпических плодов в семенной партии (p) с нуль-гипотезой ($p_0=50\%$) u -критерий Фишера

рассчитывали по формуле $u = |\varphi - \varphi_0| \sqrt{n}$, а при сравнении двух семенных партий — $u = |\varphi_1 - \varphi_2| \sqrt{\frac{n_1 n_2}{n_1 + n_2}}$, где $\varphi = 2 \arcsin \sqrt{p}$, n — объем выборки [9].

Результаты и обсуждение

В таблице представлены наблюдения за семенной продуктивностью у образцов “35А” и “35А-34А”, полученные в 2004–2008 гг. Проведено сравнение этих данных с нуль-гипотезой, согласно которой процессы эмбрио- и карпогенеза независимы и реализуются случайным образом (столбец U -критерий “1:1”). Как следует из представленных данных, только в одной из шести семенных партий соотношение двух типов плодов соответствовало пропорции 1:1, т.е. образование партенокарпических плодов и плодов с агамоспермными семенами на побегах не является случайным событием. Это наблюдение находится в соответствии с результатами анализа серийных последовательностей двух типов плодов на побегах свеклы, проведенных нами ранее. “Неслучайность возникновения ассоциаций двух типов плодов на побегах можно связать с действиями сигналов (или их отсутствием), распространяемых от восходящих субиндивидов к нисходящим... Гибель зародышевого мешка в неоплодотворенном цветке формирует бессемянный плод и выше расположенный цветок не получает индуктивного “сигнала”, в нем реализуется сценарий гибели зародышевого мешка, как и в нижележащем цветке: в этом случае на побеге рядом с одним пустым плодом возникает второй, затем третий и т.д. Чтобы прервать серию бессемянных плодов в очередном цветке необходимо спонтанное или индуцированное возникновение партеногенетического эмбриона, чтобы от него вновь исходил индуктивный “сигнал”, запускающий процесс партеногенеза в очередном цветке...” [6].

Следовало бы предположить, что в одном и том же материале в различные годы выращивания уровень семенной продуктивности и доля партенокарпических плодов в семенных партиях не должны существенно различаться. Наблюдения же за образцом “35А” в течение 4-х лет свидетельствует об обратном. Показатель “число плодов на одно растение” год от года возрастал: 1896 шт.— 2004 г., 3331 шт.— 2005 г., 4844 шт.— 2006 г. и 6805 шт.— 2008 г. Статистическое сравнение между вариантами опыта свидетельствует о достоверности различий в пяти случаях из шести: $t_{2004/2005} = 2,20^*$; $t_{2004/2006} = 3,348^{***}$; $t_{2004/2008} = 4,909^{***}$; $t_{2005/2006} = 1,198$; $t_{2005/2008} = 3,03^{**}$; $T_{2006/2008} = 2,03^*$. Сравнение долей партенокарпических плодов в разные годы так же свидетельствует о достоверных различиях между этим показателем в 5 случаях из шести: $u_{2004/2005} = 16,20^{**}$; $u_{2004/2006} = 0,25$; $u_{2004/2008} = 33,08^{**}$; $u_{2005/2006} = 20,63^{**}$; $u_{2005/2008} = 19,01^{**}$; $u_{2006/2008} = 45,93^{**}$. За исключением 2006 года с увеличением семенной продуктивности снижалась доля партенокарпических плодов.

Сходные результаты демонстрирует родственный образец “35А-34А”, наблюдения за которым проводили 2006 и 2008 гг. (таблица). Как по

Таблица

Статистические параметры семенной продуктивности в разные годы выращивания

п/п	Образец	Год	Число раст.	Число смян на раст.	$\bar{y} \pm m^1$	Доля плодов, %		U-критерий, «1.» ¹
						агамо-	партено-	
1	35А	2004	12	1809	7,01±0,31	51,17	48,83	1,021
2	35А	2005	14	3332	7,86±0,23	73,74	26,26	28,631***
3	35А	2006	20	4759	8,21±0,18	52,33	47,67	3,17**
4	35А	2008	24	6805	8,66±0,13	89,07	10,93	74,078**
5	35А -34	2006	3	3626	8,19±0,09	41,37	58,63	10,417**
6	35А -34	2008	22	8064	8,79±0,14	69,43	30,57	35,920**

* P>0,95; ** P>0,99; *** P>0,999.

¹ Доли партенокарпических плодов в семенных партиях сравнивали с нуль гипотезой — теоретическое ожидание, согласно которому на побегах два типа плодов встречаются в равной пропорции (1:1), если процессы эмбрио- и карпогенеза независимы и реализуются случайным образом.

семенной продуктивности ($t_{2006/2008} = 3,6051***$), так и по доле партенокарпических плодов ($u_{2006/2008} = 28,66***$) наблюдаются достоверные различия. Увеличению общей завязываемости семян сопутствовало снижение доли партенокарпических плодов в семенной партии.

Вероятнее всего, что на уровень семенной продуктивности огромное влияние оказывают условия года. В таком случае близкородственные материалы не должны иметь существенных различий при их выращивании в одинаковых условиях. Наблюдения, проведенные за образцами “35А” и “35А-34А” в 2006 и 2008 гг. подтверждают это предположение: семенная продуктивность в обоих вариантах существенно не различалась ($t_{35А/35А-34А, 2006} = 0,099$; $t_{35А/35А-34А, 2008} = 0,680$). Однако, не смотря на идентичность условий выращивания этих родственных образцов, показатель “доля партенокарпических плодов в семенной партии” существенно различался ($U_{35А/35А-34А, 2006} = 9,21**$; $U_{35А/35А-34А, 2008} = 30,25***$).

Общепринятой теории морфогенеза растений в целом или его частей не существует. С одной стороны, монистический взгляд на развитие предполагает, что морфогенез запрограммирован геномом клетки и потому полностью должен быть им определен. С другой стороны, наблюдаемая картина формирования двух типов плодов у свеклы, однозначно свидетельствует о том, что динамика плодо- и семягенеза на растениях всегда неповторима (индивидуальна), несмотря на генетическую идентичность сравниваемых образцов. Это указывает на множественность факторов, определяющих ход морфогенеза: “геном и морфогенез — сущности совершенно разного порядка ... Морфогенез — это разворачивающейся в пространстве и времени континуальный ... процесс. Даже если принять, что каждый шаг морфогенеза связан с активацией или репрессией определенных генов..., то пространственно временное расписание активации/репрессии генов должно опреде-

ляться не ими самими, а ...эпигенетическими факторами, прямо или косвенно связанными с морфогенезом” [10, с. 29].

Очевидно, что процессы эмбрио- и карпогенеза определяются в отдельном цветке как внутренними (программой онтогенеза и процессами морфогенетической саморганизации), так и внешними (морфогенетические корреляции) факторами. Имеет место прямая корреляция между местоположением цветка на побеге и обеспеченностью этого цветка в ходе эмбрио- и карпогенеза питательными веществами, что служит одной из причин больших различий между числом цветков и числом сформированных плодов на побегах. Неудивительно, что верхушки цветоносных побегов, как правило, оказываются бесплодными и бессемянными, т.к. не получают необходимого количества пластических веществ.

На примере плодо- и семяобразования у свеклы при апозиготической репродукции мы констатируем наличие особого типа мультидивидуальной количественной изменчивости, где сам мультидивидуум определяет динамику морфогенетических процессов формирования семян и плодов во времени. Так как наблюдаемая изменчивость возникает в ходе развития растений, то ее следует отнести к одному из вариантов эпигенетической изменчивости, в основе которой лежат автономные процессы самоорганизации и самоусложнения, происходящие в ходе процессов семя- и плодообразования. Специфика морфогенетических процессов при семя- и плодообразовании в апозиготических семенных потомствах сахарной свеклы подтверждает известное изречение об изменчивости: в природе нет двух одинаковых растений, как нет и двух одинаковых животных, несмотря на то, что сравниваемые между собой растения могут быть генетически идентичными.

Настоящая работа выполнена при поддержке Интеграционного гранта СО РАН №99 и гранта РФФИ 10-04-00697.

Литература

1. Семенова Л.Б., Абдурахманов А.А., Хайленко Н.А. Эмбриология индуцированного апомиксиса у сахарной свеклы // Цитология и генетика, 1984. Т.18, №2.— С. 90–92.
2. Ширяева Э.И., Ярмолюк Г.И., Кулик А.Г., Червякова В.В. Апомиксис у самоопыленных линий сахарной свёклы и использование его в селекции // Цитология и генетика. 1989. Т.23, №3.— С. 39–44.
3. Малецкий С. И., Малецкая Е. И. Самофертильность и агамоспермия у сахарной свеклы (*Beta vulgaris*L.) // Генетика. 1996. 32. №12.— С. 1643–1650.
4. Юданова С.С., Малецкая Е.И. Связь эпигеномной изменчивости с семенной продуктивностью при апозиготическом способе размножения сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) // Достижения и проблемы генетики, селекции та биотехнологии. Киев.— Логос, 2007. Збірник наукових праць.— Т. 2.— С. 221–225.
5. Юданова С.С., Позняк С.И., Малецкая Е.И. Семенная продуктивность у диплоидной линии СОАН 5 при апозиготическом способе репродукции // Факторы экспериментальной эволюции организмов. Киев Логос, 2009, Том 6.— С. 101–105.
6. Малецкий С.И., Малецкая Е.И., Юданова С.С., Колодяжная Я.С. Серийные последовательности двух типов плодов у сахарной свёклы при апозиготической репродукции // Генетика, 2008, т.44, №1.— С. 72–80.

7. *Ter-Avanesian D.V.* The effect of varying the number of pollen grains used in fertilization // TAG, 1978, v. 52, p. 77–79.

8. *Зайковская Н.Э.* Биология цветения, цитология и эмбриология сахарной свеклы // Биология и селекция сахарной свёклы. М.: Колос, 1968.— С. 137–206.

9. *Урбах В.Ю.* Непараметрические критерии различия // Биометрические методы (статистическая обработка опытных данных в биологии, сельском хозяйстве и медицине). М.: Наука, 1964.— С. 245–267.

10. *Белоусов Л.В.* Морфогенез, морфомеханика и геном // Вестник ВОГиС, 2009, том 13, №1.— С. 29–35.

Резюме

В работе анализируются завязываемость семян и изменчивость долей агамо-спермных семян и партенокарпических плодов в семенных партиях, получаемых при однородительском размножении сахарной свеклы за 4 года в двух смежных поколениях.

A paper presents the four-year study of the seed setting and a variability of agamospermic seeds and parthenocarpic fruits parts in seed population of two allied generation, obtained by uniparental reproduction.

TSYGANKOVA V. A.

*Institute of Bioorganic Chemistry and Petrochemistry, NAS of Ukraine,
Kiev, Murmanskaya str., 1*

CIRCADIAN RHYTHMS OF GENE EXPRESSION AT LEAVES OF VEGETATING PLANTS

Using DOT-blot method the degree homology of cytoplasmical mRNA populations of plant leaves from different intervals of light day according to mRNAs of dark phase was investigated.

Materials and methods

The isolation of poly(A)⁺RNA, obtaining cDNA and conditions of hybridization cDNA with mRNA are presented early [1].

The leaves of dicotyledonous (soya, pea) and monocotyledonous plants (wheat, corn) at ten-day period of their vegetation after initiation of seed germination, sprouting in environmental (field) standard conditions, and first of all at strong clear and weak sunshine were used as a model. The leaves were separated from plants in different periods of light day: in the early morning (at 5 a.m.) — in the period of appearance of the first rays of a sun; then in the middle of day (at 2 p.m.) — in the period of maximal sunshine and in the evening period (at 9 p.m.). All of experiments were conducted at the beginning of June, when the most optimal growth and development of plant occur. The preparations of cytoplasmical mRNA were selected from leaves and as control were the

preparations mRNA from leaves in the period of absence of lighting in the middle of night-time (at 2 a.m.).

Experiments were repeated every day consecutively during for three days, in order that the indexes of divergence of mRNA homology were not laid on due to the stage changes of mRNA populations. The degree of mRNA homology from leaves on the farther stage of plant development (over subsequent 10 days) was determined in relation to the same control preparation of mRNA for establishment of the stage distinctions.

Results and discussion

The data of the conducted experiments are resulted in a table 1, from which it is ensued, that both at dicotyledonous, and at monocotyledonous plants, already with appearance of sunrays in the early morning (at 5 a.m.) there is a small decline of homology degree of mRNA in experience as compared to control (up to 91% for different plants).

To midday (at 2 p.m.) there is yet greater divergence between control (“nightly”) mRNA and mRNA from the plant leaves at powerful sunshine.

To the evening there is “fading” of photosynthetic processes by the “windmill” switching genes. The difference at mRNA populations from leaves of control plants and plants on 20-th day of vegetation after start of experiments is observed. It is interpreted, possibly, by switching on at expression particularly and other genes, providing translational processes of differentiation of plant cells on subsequent stages of their vegetation [2].

In works of E.N. Tischenko and O.V. Dubrovnoy it was showed, that following transition of sugar beet seedlings| from the etiolated state to the photomorphogenesis in the cotyledons of seedlings the approximately 2000 specific poly(A)⁺mRNAs appear and about 400 specific poly(A)⁺mRNAs disappear, i.e. there is a sharp reprogramming of genome of plant cells following transition their from the etiolated stage into morphogenesis stage. Similar results were given by authors and also on sunflower [3, 4].

The decrease of DNA content at cells of *Helianthus annuus* Linnaeus plant under influence of light was found at investigations of H. Price and J. Johnston [5].

By the present time it is known that the majority of genes in the plant cells (as and in the cells of animals) are presented by families. For example, multifamily of photomorphogenesis genes [6–8]; phospholipase C genes consist from 9 members [9]; phospholipase D gene — from 12 members [10]; patatin gene — from 70 members on tetraploidy genome *Solanum tuberosum* L. [11, 12]; genes of cell wall protein extensin — from 5 members [13]; RNases gene are presented by super- or multifamily [14] et cet.).

Each member of gene family differs from each other by microheterogeneity on a nucleotide sequence at variable part of genes and accordingly on mechanisms of their intracellular regulation [6–10]. The reflection of structural microheterogeneity in the families of genes are also mini differences in the structures of

Table 1

Percent of a homology of cytoplasmical mRNA populations from plant leaves during the different periods light (morning, day and evening) phase (experience) in relation to mRNA of dark (the middle of night) phase (control)*

Time	Objects of investigation and variants of experiments							
	Soya bean		Pea		Wheat		Corn	
	light	over 10 days	light	over 10 days	light	over 10 days	light	over 10 days
5:00AM	95±2,2	86±1,7	97±2,1	89±1,4	91±1,6	88±1,3	94±1,5	85±2,1
2:00 PM	86±2,3	81±1,8	85±1,4	84±1,3	79±2,3	86±1,6	79±2,1	78±1,7
9:00 PM	89±1,4	78±1,3	94±1,8	86±2,1	93±1,4	88±1,8	92±1,9	87±1,4

*Percent of cytoplasmical mRNA homology in relation to control mRNA preparation (taken for 100%) was determined for an index differences in the level of hybridization of P³² cDNA with mRNA populations, which change during a day and differ by nucleotide sequence in variable part of gene structure within the limits of family. For 100% (control) the level of hybridization of P³² cDNA (copies from “nightly” mRNA) is accepted with “nightly” mRNA of plant leaves (hybridization “on itself”). Error of experience is ±2% (the average data from 3 experiences are presented). Unit of dimension is the level of radioactivity in impulses at each probe.

gene products — proteins (polymorphism of reserve proteins, isoenzymes et cet.) [15, 16].

We supposed, that the variability in the structures of members of gene family, the distinctions in the mechanism of regulation of their activity and, accordingly, mini differences in the structures of the end-products of gene expression provide high mobility and plasticity of adaptive reactions of cells to the environment signals.

It is obviously that under weak promoters are variants of genes from gene families which form an answer for a weak external signal (for example, on a weak thermal, light signals, or signal of chemical nature); under promoters of moderate force are located genes, forming an answer for the signals of middle force, and under strong promoters are genes from gene families, forming the return reactions of cells on strong external or internal signals (for example, on maximal photosynthesis in the period of strong sunshine and, accordingly, strong heating).

According to this supposition the increasing of photosynthetic process occur as a result of “windmill” switching corresponding genes under weak promoters on genes with promoters of moderate force and further on genes under strong promoters in process of increase of sun activity and on the contrary following decrease of sun activity the opposite process switching genes is observed.

Conclusions

Thus, obviously, that the presence of gene families and specific mechanisms of their regulation are provided “windmill” switching genes (under influence those or other signals), executing the same functions, but possessing microheterogeneity on nucleotides sequences and different level of activity. It provides adaptation of

plants to the varied environment and reproducing to itself similar individuals in a greater or less amount at different conditions for maintenance and saving in nature of one or another specific population of plants.

References

1. Tsygankova V. A., Iutinskaya G. A. The investigation of degree of mRNA homology at normal plant growth and stimulated by plant growth regulators / In Factors of experimental evolution of organisms. M.I. Vavilov. Society of genetics and breeders of Ukraine.— K.: Logos, 2009.— Vol.7.— P. 74–78.
2. Galau G. A., Dure 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.— Vol.20.— P. 4169–4178.
3. Tischenko E. N., Dubrovnaya O. V. Epigenetic regulation. The methylation of DNA of plant genes and transgenes.— K.: Logos, 2004.— 236 p.
4. Tischenko E.N., Dubrovnaya O.V., Topchiy N.M. The methylation of DNA at plant ontogenesis.— K.: Logos, 2008.— 264 p.
5. Price H.J., Johnston J.S. Influence of light on DNA content of *Helianthus annuus* Linnaeus // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.— 1996.— Vol.93.— P. 11264–11267.
6. Argüello-Astorga G.R., Herrera-Estrella L.R. Ancestral multipartite units in light-responsive plant promoters have structural features correlating with specific photo-transduction pathways // Plant Physiol.— 1996.— Vol.112.— P. 1151–1166.
7. Neff M. M., Fankhauser C., Chory J. Light: an indicator of time and place // Genes and Develop.— 2000.— Vol.14.— P. 257–271.
8. Tsygankova V.A., Galkina L.A., Musatenko L.I., Sytnik K.M. Genetical and epigenetical control of plant growth and development. Genes of photomorphogenesis and regulation of their expression by light // Biopolymers and cell.— 2004.— Vol.20, №6.— P. 451–471.
9. Tasma I.M., Brendel V., Whitham S.A., Bhattacharyya M.K. Expression and evolution of the phosphoinositide-specific phospholipase C gene family in *Arabidopsis thaliana* // Plant Physiology and Biochemistry.— 2008.— Vol.46.— P. 627–637.
10. Li G., Lin F., Xue H.W. Genome-wide analysis of the phospholipase D family in *Oryza sativa* and functional characterization of PLD b1 in seed germination // Cell Research.— 2007.— Vol.17.— P. 881–894.
11. Liu X. Y., Rocha-Sosa M. et al. A detailed study of the regulation and evolution of the two classes of patatin genes in *Solanum tuberosum* L. // Plant Mol. Biol.— 1991.— Vol.17.— P. 1139–1154.
12. Yefimenko I.M., Medvedeva T.V., Kovalenko P.G., Gazaryan K.G., Galkin A.P. Organ-specific gene expression in transgenic potato: the cloning a new promoter of a class I patatine gene // Biopolymers and cell.— 1995.— 11, №6.— P. 96–103.
13. Ahn J.H., Choi Y., Kwon Y.M., Kim S.G., Choi Y.D., Lee J.S. A novel extensin gene encoding a hydroxyproline-rich glycoprotein requires sucrose for its wound-inducible expression in transgenic plants // The Plant Cell.— 1996.— Vol.8.— P. 1477–1490.
14. Green P. The ribonucleases of higher plants. // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.— 1994.— Vol.45.— P. 421–445.
15. Vishnyakova M.A., Burlyayeva M.O., Alpatyeva N.B. et al. RAPD analysis species polymorphism of China *Lathyrus* L. kind of *Fabaceae* Lindl. family // Vestnik USG@S.— 2008.— Vol.12, №4.— P. 595.

16. Romanova J.A., Gubareva N.K., Konarev A.V. et al. Research of collection of wheat variety *Triticum spelta* L. on polymorphism of gliadines // Genetics.— 2001.— Vol.37, №9.— P. 1258–1263.

Abstract

Using DOT-blot hybridization DNA with RNA the analysis of degree homology of products of gene expression (cytoplasmic mRNAs) is fulfilled from the cells of dicotyledonous (soya, pea) and monocotyledonous plants (wheat, corn) leaves, after their separation from plants in an early period with weak photosynthesis (at 5 a.m.), in a middle period (at 2 p.m.) with strong photosynthesis and in the evening period with weak photosynthesis to the relation to mRNA from plant leaves, being in a dark phase (at 2 a.m.). It is shown that divergence in populations between experience and control begins in the early morning at weak sunshine, sharply increases at daily light (at 2 p.m.) and goes out on sunset. It is assumed that these changes occur by the “windmill” switching genes, belonging to one family, but possessing different activity due to location them under promoters of different force (promoters of weak, moderate and strong force) and that plasticity (maneuverability) of plant adaptation to the environment is arrived by such mechanism.

Методом ДОТ-блот гібридизації ДНК з РНК проведено аналіз ступеня гомології продуктів експресії генів (цитоплазматических мРНК) із кліток листьєв двудольних (сои, гороха) і однодольних рослин (пшениці, кукурузи), после відділення їх від рослин в ранній період со слабым фотосинтезом (5 утра), в середній період (14 часов дня) с сильным фотосинтезом і в вечерний період с угасающим фотосинтезом по отношению к мРНК листьєв растений, находящихся в темновой фазе (2 часа ночи — контроль). Показано, что разница в популяциях между опытом и контролем начинается ранним утром при слабом солнечном освещении, резко усиливается при дневном освещении (14 часов дня) и угасает на заходе солнца. Предполагается, что эти изменения происходят путем “веерного” переключения генів, принадлежащих к одному семейству, но обладающих разной активностью за счет расположения их под промоторами разной силы (промоторах слабой силы, умеренной силы и сильных промоторах) и что путем такого механизма достигается пластичность (маневренность) адаптации растений к окружающей среде.

Методом ДОТ-блот гібридизації ДНК із РНК проведено аналіз ступеня гомології продуктів експресії генів (цитоплазматических мРНК) з клітин листків двудольних (сої, гороху) і однодольних (пшениці, кукурудзи) рослин, після відділення їх від рослин в ранній період зі слабким фотосинтезом (о 5-й годині ранку), в середній період (о 14-й годині) з сильным фотосинтезом і в вечірній період із згасающим фотосинтезом по відношенню до мРНК листків рослин, що знаходились в темновій фазі (о 2-й години ночі — контроль). Показано, що різниця в популяціях між дослідом і контролем починається вже вранці при слабкому сонячному освітленні, різко посилюється при денному освітленні (о 14-й годині дня) та знижується на заході сонця. Припускається, що ці зміни відбуваються шляхом “віяльного” переключення генів, що належать до однієї родини, але виявляють різну активність за рахунок розташування їх під промоторами різної сили (промоторах слабой сили, помірної сили та сильних промоторах) і що шляхом такого механізму досягається пластичність (маневренность) адаптації рослин до оточуючого середовища.

БАВОЛ А. В., ДУБРОВНА О. В., ЛЯЛЬКО І. І., ЗІНЧЕНКО М. П.

Інститут фізіології рослин і генетики НАН України

Україна, 03022, Київ, вул. Васильківська, 31/17, e-mail: bavo11@rambler.ru

**ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ ТИДІАЗУРОНУ НА ЧАСТОТУ
УТВОРЕННЯ МОРФОГЕННОГО КАЛЮСУ ТА РЕГЕНЕРАЦІЮ
ПАГОНІВ У КУЛЬТУРІ *IN VITRO* М'ЯКОЇ ПШЕНИЦІ**

На сьогодні біотехнологічні методи широко використовуються для вирішення прикладних задач селекції цінних сільськогосподарських культур і, зокрема, пшениці [1–3]. Одержання морфогенного калюсу і наступна регенерація рослин — невід'ємна частина багатьох біотехнологій цієї культури. Однак, до цього часу одним із факторів, що обмежує широке впровадження біотехнологій у генетико-селекційний процес є відсутність ефективних методів масової регенерації рослин із клітинних ліній. Одним із головних чинників, що впливає на регенераційну здатність калюсних культур, є склад живильного середовища. З метою стимулювання процесів морфогенезу до середовищ культивування додають різні біологічно активні речовини — синтетичні аналоги фітогормонів. Зокрема, для вирішення цього завдання дослідниками показана значна ефективність тидіазурону.

Тидіазурон (ТДЗ) — 3-(1,2,3-тіадіазолін-5)-1-фенілсечовина, що використовується як гербіцид та стимулятор росту, одночасно є ефективним регулятором морфогенезу *in vitro* у багатьох дводольних рослин. Показано, що ТДЗ характеризується більшою активністю ніж цитокінін та зеатин. Він стимулює розвиток бічних бруньок пагона та сприяє формуванню стебел у багатьох видів покритонасінних. Згідно сучасних уявлень ТДЗ безпосередньо стимулює ріст через власну біологічну (цитокінінову) активність та здатний стимулювати синтез і накопичення ендогенних цитокінінів. Низькі концентрації ТДЗ у рослин стимулюють ріст пазушних бруньок, однак високі — здатні його інгібувати. Відомо також, що відносно високі концентрації ТДЗ здатні індукувати утворення калюсу та стимулювати формування соматичних ембріоїдів [4].

Однак, на сьогодні інформації щодо дії ТДЗ на культуру пшениці *in vitro* недостатньо. У зв'язку з цим метою нашої роботи було дослідження впливу ТДЗ на індукцію морфогенного калюсу та регенерацію пагонів у калюсних культур пшениці.

Матеріали і методи

Матеріалом досліджень був сорт-дворучка м'якої пшениці — Зимоярка, отриманий у відділі експериментального мутагенезу ІФРГ НАН України. В якості експлантів використовували верхівки пагона 1–3 добових проростків, розмір яких варіював у межах 1,5–2,0 мм. Для отримання донорних рослин насіння стерилізували 3 %-вим розчином NaOCl протягом 15 хв, чотири рази відмивали стерильною дистильованою водою і пророщували

на світлі при 24 °С на безгормональному середовищі МС 1–3 доби. Експланти висаджували на живильне середовище МС, яке додатково містило L-аспарагін — 150 мг/л, AgNO₃ — 10 мг/л та 2,4-Д 2 мг/л та культивували при 26 °С в темряві протягом двох тижнів. Потім калюси переносили на світло і далі вирощували при освітленні 3–4 клк, відносній вологості повітря 70% і 16-годинному фотоперіоді, ще протягом двох тижнів. Сформовані таким чином калюси для регенерації переносили на середовище МС, яке додатково містило 10 мг/л AgNO₃ і ТДЗ у різних концентраціях: 0,1–1,5 мг/л (залежно від варіанту досліджу). Для контролю калюси висаджували на регенераційне середовище МС, що додатково містило 10 мг/л AgNO₃, 1 мг/л БАП та 0,5 мг/л ІОК, ефективність якого була нами продемонстрована раніше [5]. Досліджували по 160 експлантів, представлених 4-ма чашками Петрі (по 40 експлантів в чашці) на кожну концентрацію ТДЗ. Частоту індукції морфогенного калюсу визначали на 21 добу культивування. Число пагонів, отриманих з калюсних культур, підраховували після 8 тижнів вирощування. Частоту регенерації рослин (у відсотках), визначали як співвідношення числа експлантів, які утворили рослини-регенеранти, до загального числа експлантів.

Результати та обговорення

У злаків регенераційну здатність досить часто пов'язують з появою в калюсній тканині щільних ділянок, утворених меристеміодними клітинами, або морфогенних зон [6–8]. Нами досліджувався вплив різних концентрацій ТДЗ на процеси морфогенезу калюсних культур пшениці. Препарат додавали до живильного середовища в концентраціях 0,10; 0,25; 0,50; 0,75; 1,00; 1,25 та 1,50 мг/л.

Після переносу калюсів на світло, через 14 діб вирощування, на частині з них спостерігали появу щільних зелених ділянок. Такий калюс ми відносили до морфогенного типу. При подальшому культивуванні частина з них формувала регенеранти. У всіх варіантах досліджу, відмічено утворення морфогенного калюсу, однак частота його формування була різною (рис. 1).

Слід відмітити, що за концентрації ТДЗ в середовищі 0,25 мг/л, частота утворення морфогенного калюсу була найбільшою і сягала 94%. У варіантах з концентрацією ТДЗ 1,25 та 1,50 мг/л морфогенний калюс практично не утворювався. У цих варіантах через 16–20 діб, калюс припиняв ріст, спостерігалось утворення некротичних зон, що в подальшому приводило до його загибелі.

На регенераційному середовищі в калюсах відмічено наступні шляхи морфогенезу: органогенез за типом гемморизогенезу (формування бруньки та кореня), ризогенез (формування кореня) та соматичний ембріодогенез — формування соматичних зародків. Пагони починали розвиватися з морфогенних зон після двох-трьох тижнів культивування.

Низький вміст ТДЗ (0,10 мг/л) спричиняв зниження частоти регенерації пагонів в порівнянні з контролем (рис. 2). При високих дозах ТДЗ (1,00; 1,25 та 1,50 мг/л) спостерігалось погіршення фізіологічного стану калюсів

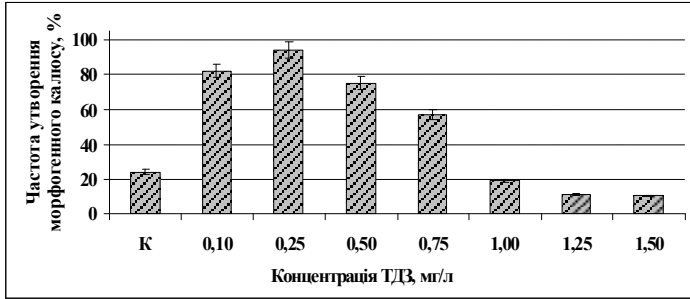


Рис. 1. Частота утворення морфогенного калюсу на середовищах з різною концентрацією ТДЗ

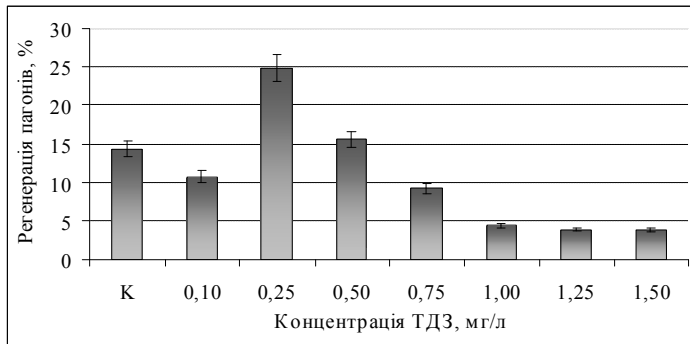


Рис. 2. Вплив різних концентрацій ТДЗ на регенерацію пагонів з калюсних культур пшениці

і їх регенераційна здатність істотно знижувалась. Достовірне підвищення регенераційної здатності виявлено при наявності у живильному середовищі ТДЗ у концентрації 0,25 мг/л.

Слід зазначити, що ряд авторів схиляються до думки, що цитокініни не відіграють суттєвої ролі в соматичному ембріогенезі більшості рослин. Однак, потрібно розділяти різні цитокініни за хімічною будовою на аденинового типу (кінетин, зеатин, 6-бензиламінопурин) та феніл-сечовинного типу (ТДЗ). Для індукції утворення ембріогенного калюсу в багатьох випадках доцільно використовувати кінетин, БАП та бензиладенін (БА). Останній також часто використовують на етапах проліферації соматичних зародків та їх регенерації в повноцінні рослини [9, 10]. На сьогоднішній день, для індукції прямого соматичного ембріогенезу і органогенезу із вегетативних та генеративних тканин, все частіше застосовують цитокініни феніл-сечовинного типу. Особливо це стосується тих видів рослин, які складно культивувати в умовах *in vitro*, до яких належать також злакові культури. Зокрема ряд авторів [4, 11, 12] наводять приклади успішного використання

ТДЗ для підвищення регенераційної здатності пшениці *in vitro*, що в цілому підтверджують наші дослідження.

Таким чином, дослідження впливу ТДЗ на утворення морфогенного калюсу з експлантів верхівки пагона проростків пшениці, ріст калюсних культур та процеси регенерації пагонів показало, що процеси морфогенезу залежать від концентрації ТДЗ в середовищі. Відповідно до отриманих результатів, ТДЗ має здатність стимулювати утворення морфогенного калюсу та регенерацію пагонів у м'якої пшениці за концентрації 0,25 мг/л. В ході дослідження нами не виявлено прямої залежності між частотою утворення морфогенного калюсу та частотою регенерації пагонів.

Література

1. Patnaik D., Khurana P. Wheat Biotechnology: A minireview plant biotechnology // Electronic J. Biotech.— 2001.— V.4.— P. 74–102.
2. Волощук С.І., Волощук Г.Д., Гірко В.С. Створення вихідного матеріалу озимої пшениці, стійкого до грибних патогенів методами клітинної селекції // Захист рослин.— 1998.— №8.— С. 4–5.
3. Логвиненко ВФ., Моргун В.В., Карнець А.І. Індукована *in vitro* мутаційна мінливість озимої пшениці // Генетика і селекція в Україні на межі тисячоліть.— Київ: Логос, 2001.— Т.1.— С. 616–624.
4. Xueyan S., Desen L., Rongda Q. Thidiazuron promotes *in vitro* regeneration of wheat and barley // *In vitro Cellular and Development Biology*.— 2000.— Vol.36, №3.— P. 207–210.
5. Бавол А.В., Дубровна О.В., Лялько І.І. Регенерація рослин із експлантів верхівки пагона проростків пшениці // Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів.— 2007.— Т.5, №1–2.— С. 3–10.
6. Eudes F., Achatya S., Laroche A. et al. A novel method to induce direct somatic embryogenesis, secondary embryogenesis and regeneration of fertile green cereal plants // *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*— 2003.— Vol.73, №2.— P. 147–157.
7. Chen H., Xu G., Loschke D. et al. Efficient callus formation and plant regeneration from leaves of oats (*Avena sativa* L.) // *Plant Cell Reports*.— 1995.— Vol.14, №6.— P. 393–397.
8. Becher T., Haberland G., Koop H. Callus formation and plant regeneration in standart and microexplants from seedlings of barley (*Hordeum vulgare* L.) // *Plant Cell Rep.*— 1992.— Vol.11.— P. 39–43.
9. Hamama L., Baaziz M., Letouze R. Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf tissue of jojoba // *Plant Cell Tissue and Organ Cultures*.— 2001.— Vol.65, N2.— P. 109–113.
10. Nonda R., Rout G. *In vitro* somatic embryogenesis and plant regeneration in *Acacia arabica* // *Plant Cell Tissue and Organ Cultures*.— 2003.— Vol.73, N2.— P. 131–135.
11. Birsin M., Ozgen M. A comparison of callus induction and plant regeneration from different embryo explants of Triticale (*Triticosecale* Wittmack) // *Cellular&Molecular Biology Letters*.— 2004.— Vol.9.— P. 353–361.
12. Yaqubov N., Onde S., Osdemir B. The effects of thidiazuron on callus development and organogenesis from mature embryos of selected // Turkish bread and durum wheat varieties // *Proceedings of the Balkan scientific conference of biology*.— 2005.— P. 192–201.

Резюме

Досліджено вплив тидіазурона (ТДЗ) на утворення морфогенного калюсу та регенерацію пагонів м'якої пшениці. Показано, що процеси морфогенезу залежать від концентрації ТДЗ в поживному середовищі. Найбільшою частотою утворення морфогенного калюсу (94%) спостерігалась за концентрації ТДЗ 0,25 мг/л. У варіанті з концентрацією ТДЗ 0,25 мг/л, також виявлено достовірне підвищення частоти регенерації пагонів до 24%, в порівнянні з контролем, де цей показник складає 18,5%.

Исследовано влияние тидиазулона (ТДЗ) на образование морфогенного каллуса и регенерацию побегов мягкой пшеницы. Показано, что процессы морфогенеза зависят от концентрации ТДЗ в питательной среде. Наибольшую частоту образования морфогенного каллуса (94%) наблюдали при концентрации 0,25 мг/л. В варианте с концентрацией ТДЗ 0,25 мг/л, также выявлено достоверное увеличение частоты регенерации побегов до 24%, в сравнении с контролем, где этот показатель составляет 18,5%.

The effect of thidiazuron (TDZ) on formation morphogenic callus and shoot regeneration of wheat has been investigated. It is shown, that processes of morphogenesis depend at concentration of TDZ in a nutrient medium. The highest frequency of formation morphogenic callus (94%) was observed at concentration 0,25 mg/l. In the variant, with concentration TDZ 0,25 mg/l, we observed increasing of frequency shoot regeneration to 24%, in comparison with 18,5% in the control.

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*

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МАННИТОЛА И АБСЦИЗОВОЙ КИСЛОТЫ ДЛЯ ДЛИТЕЛЬНОГО ХРАНЕНИЯ *IN VITRO* РАСТЕНИЙ СЕМЕЙСТВА *CARYOPHYLLACEAE*

Использование методов биотехнологии, в том числе путём создания банков *in vitro*, рассматривается как важный элемент охраны биоразнообразия растений [1–5]. Уменьшить затраты материалов и труда на поддержание асептических коллекций можно за счёт использования так называемого “замедленного” роста (“slow growth”), который даёт возможность увеличить интервалы субкультивирования. Замедлить или полностью остановить рост *in vitro* можно с помощью ряда методов — снижения температуры, создания осмотического стресса или использования соединений, замедляющих рост [6]. В ряде публикаций сообщается об использовании для этой цели маннитола [2, 5–8], а также абсцизовой кислоты [9–11].

Нами начата работа по изучению возможностей использования замедленного роста для поддержания коллекции растений *in vitro*. Семейство *Caryophyllaceae* в банке представителей мировой флоры *in vitro*, созданном

в ИКБГИ, является одним из наиболее многочисленных (22 рода). Цель работы — на примере двух видов семейства *Caryophyllaceae* изучить влияние маннитола и абсцизовой кислоты на рост растений в культуре *in vitro* и подобрать оптимальные условия длительного культивирования без частых пересадок на свежие среды.

Материалы и методы

Материалом для работы были растения *Dianthus monspessulanus* L. и *Ихоса quadrifida* (L.) Sojak. Для замедления роста *in vitro* применяли маннитол или абсцизовую кислоту. В контрольном эксперименте использовали безгормональную среду MS₀ с 30 г/л сахарозы [12]. Исследовали три варианта питательных сред с маннитолом, состав которых приведен в табл. 1. Концентрация маннитола варьировала от 10 до 20 г/л. Второй вариант ингибирования роста осуществляли с помощью абсцизовой кислоты (АБК). Учитывая, что в работе использовали раствор АБК в диметилсульфоксиде (ДМСО), в данном варианте опыта было два контроля — безгормональная среда MS₀ и среда MS_{КД}, содержащая 5 мл/л ДМСО, для проверки, не оказывает ли ДМСО существенного влияния на темпы роста растений *in vitro*. В разных вариантах опыта использовали АБК в концентрациях от 0,1 до 10 мг/л (табл. 1).

Выборка в каждом варианте опыта составляла 10 растений. Верхушки побегов длиной 10–12 мм отрезали от исходных растений и переносили в пробирки Sigma высотой 12 см с пластиковыми крышками на среды разного состава и выращивали в условиях культуральной комнаты при 24 °С и 16-часовом фотопериоде. Оценивали эффективность укоренения (отношение числа укоренённых побегов к общему числу побегов, в %), высоту растений и коэффициент выживания при длительном культивировании без переноса на свежие среды. Статистическую обработку результатов проводили согласно стандартному методу оценки достоверности разницы между средними значениями по коэффициенту Стьюдента t_d [13].

Таблица 1

Варианты ингибирующих обработок, использованные в экспериментах

Вариант среды	Сахароза, г/л	Маннит, г/л	ДМСО, мл/л	АБК, мг/л
MS ₀	30	-	-	-
MS _{КД}	30	-	5	-
MS ₁₀	20	10	-	-
MS ₁₅	15	15	-	-
MS ₂₀	10	20	-	-
MS _{А01}	30	-	0,01	0,1
MS _{А1}	30	-	0,1	1,0
MS _{А5}	30	-	0,5	5,0
MS _{А10}	30	-	5,0	10,0

Результаты и обсуждение

Результаты изучения влияния маннитола и абсцизовой кислоты на укоренение верхушек побегов *in vitro* представлены в табл. 2. Увеличение содержания маннитола в среде не сказывалось на сроках и эффективности укоренения побегов *D. monspessulanus*, но несколько снижало данные показатели для *I. quadrifida*. Тем не менее, и в последнем случае эффективность укоренения была достаточно высокой (90%). При использовании АБК уже в течение первого месяца укоренялось 100% побегов, за исключением варианта со средой MS_{A10} (40%). При этом если для *D. monspessulanus* отмечали только замедление сроков укоренения, и к концу второго месяца 100% побегов формировали корни, то для *I. quadrifida* даже к концу второго месяца культивирования число укоренённых побегов было существенно ниже — 30%.

Результаты оценки средней высоты и выживания растений *in vitro* при использовании маннитола и АБК представлены в табл. 2.

Таблица 2

Средняя высота растений и коэффициент выживания при использовании различных вариантов ингибирующих обработок

Вид	Среда	1 месяц		3 месяца		6 месяцев		9 месяцев	
		Средняя высота растений	% живых растений	Средняя высота растений	% живых растений	Средняя высота растений	% живых растений	Средняя высота растений	% живых растений
<i>D. monspessulanus</i>	MS ₀	36,5±3,7	100,0	94,0±6,6	100,0	-	-	-	-
	MSKD	45,8±4,5	100,0	97,5±1,5	100,0	-	-	-	-
	MS ₁₀	18,3±3,1	100,0	22,3±2,5	100,0	27,6±2,9	100,0	29,2±0,6	50
	MS ₁₅	13,0±1,7	100,0	17,5±2,0	100,0	19,4±1,5	100,0	21,0±0,9	30
	MS ₂₀	12,1±0,9	100,0	14,8±1,7	100,0	16,9±1,3	100,0	17,0±0,9	30
	MS _{A01}	21,9±4,5	100,0	65,7±8,9	100,0	-	-	-	-
	MS _{A1}	23,0±4,5	100,0	73,4±5,9	100,0	-	-	-	-
	MS _{A5}	13,1±1,9	100,0	70,8±9,6	100,0	-	-	-	-
	MS _{A10}	15,5±3,4	100,0	72,5±9,9	100,0	-	-	-	-
<i>I. quadrifida</i>	MS ₀	36,4±9,1	100,0	104,5±7,2	100,0	-	-	-	-
	MS _{KD}	32,2±3,7	100,0	83,8±6,0	100,0	-	-	-	-
	MS ₁₀	22,5±2,1	100,0	28,8±4,1	100,0	33,6±2,3	100,0	39,4±4,8	100,0
	MS ₁₅	14,7±1,9	100,0	21,2±2,4	100,0	23,1±3,6	100,0	25,9±2,3	100,0
	MS ₂₀	11,3±0,8	100,0	13,7±1,2	100,0	19,2±1,6	100,0	20,3±1,2	70,0
	MS _{A01}	27,1±3,7	100,0	82,9±12,2	100,0	-	-	-	-
	MS _{A1}	20,3±3,7	100,0	74,8±9,3	100,0	-	-	-	-
	MS _{A5}	21,5±3,4	100,0	76,8±5,4	100,0	-	-	-	-
	MS _{A10}	18,4±3,4	100,0	33,5±5,1	100,0	не опр.	не опр.	не опр.	не опр.

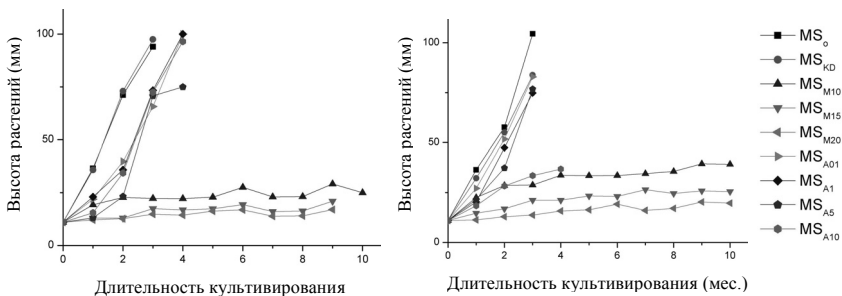


Рис. Динамика изменения средней высоты растений *D. monspessulanus* (слева) и *I. quadrifida* (справа) при длительном культивировании на средах с маннитолом и АБК

Характер изменения средней высоты растений при использовании различных ингибирующих обработок в течение 10 месяцев культивирования представлен на графиках (рис.).

Как видно из данных табл. 2 и рисунка, в контроле (MS₀ и MS_{КД}) к концу третьего месяца культивирования растения обоих видов достигали максимально возможной в данных условиях высоты. При этом достоверных различий между средней высотой растений не было, т.е. ДСМО не оказывал негативного влияния на темпы роста.

Существенные различия между средней высотой растений на разных этапах культивирования наблюдали на средах с маннитолом. Уже в концентрации 10 г/л он оказывал значительное ингибирующее действие на темпы роста растений обоих видов. Так, для *D. monspessulanus* при сравнении средней высоты растений в вариантах MS₀ и MS₁₀ коэффициент Стьюдента t_d равнялся 6,5 в первый месяц культивирования и 17,8 на 3-й месяц; для *I. quadrifida* эти показатели составили 2,8 и 16,4, соответственно. Достоверность различий по сравнению с контролем, а также между вариантами с разным содержанием маннитолом сохранялась для *I. quadrifida* на протяжении всего периода культивирования. Для *D. monspessulanus* достоверные различия по высоте растений не выявлены только в варианте MS₁₅–MS₂₀ ($t_d = 0,9; 0,3$ и 1,2 на 1-й, 2-й и 3-й месяц культивирования, соответственно). На поздних стадиях культивирования наблюдалось снижение коэффициента выживания. На среде MS₁₀ на 9-й месяц сохранилось 50% живых растений *D. monspessulanus*, в двух остальных вариантах — по 30% (к концу 7-го месяца этот показатель составлял 100% для всех вариантов, данные в табл. 2 не представлены). Для *I. quadrifida* на 9-й месяц культивирования коэффициент выживания составил 100%, кроме варианта MS₂₀ (70%).

Данные о влиянии АБК на темпы роста растений обоих видов *in vitro* не так однозначны. Для *D. monspessulanus* отмечены достоверные различия в высоте растений между контрольными значениями и всеми вариантами АБК, начиная с минимальной концентрации 0,1 мг/л ($t_d = 5,2, 5,8$ и 4,8 на 1-й, 2-й и

3-й месяц культивирования, соответственно). Достоверной разницы между вариантами с АБК в минимальной (0,1 мг/л) и максимальной (10 мг/л) концентрациях не выявлено ($t_d = 1,8; 0,7$ и $0,8$). Для *I. quadrifida* также показаны достоверные различия в высоте растений в контроле и на средах с АБК, в том числе между вариантами $MS_{A01} - MS_{A10}$ ($t_d = 5,2; 5,8$ и $4,8$). Промежуточные в отношении концентрации АБК варианты сред показывали как достоверность различий, так и её отсутствие в течение 3-х месяцев.

Несмотря на достоверность разницы в средней высоте растений по сравнению с контролем, увеличить интервал субкультивирования при использовании АБК удалось всего до 4 месяцев и только для *D. monspessulanus*. Для второго вида, *I. quadrifida*, максимальный интервал субкультивирования составил 3 мес., как и в контроле, за исключением варианта с 10 мг/л АБК, где средняя высота растений в конце 4-го месяца культивирования составляет 36,8 при 100% выживании растений. Из графика видно, что в этом варианте опыта кривая роста растений приближается к варианту MS_{10} .

Таким образом, полученные результаты согласуются с данными, приведенными в работах [2, 4, 5, 6, 7, 8] о том, что маннитол в концентрациях 1–2% может быть успешно использован *in vitro* как ретардант, позволяя увеличить интервал субкультивирования до 8–12 месяцев. Более высокие концентрации были токсичными для растений [4, 6]. Использование АБК в наших опытах не было столь же эффективным, как применение маннитола, что отличается от данных, полученных на некоторых других видах растений [9, 10], и может свидетельствовать о видоспецифичности ответа культуры.

Выводы

Использование маннитола для удлинения общего срока хранения *in vitro* растений *D. monspessulanus* и *I. quadrifida* без субкультивирований оказалось более действенным, чем применение АБК, и может рассматриваться как эффективный и простой способ сохранения асептических культур этих видов в условиях минимального роста.

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

Литература

1. Hao Y.-J., Wen X.-P., Deng X.-X. Genetic and epigenetic evaluations of citrus callus recovered from slow-growth culture // J. Plant Physiol., 2004, v.161, 479–484.
2. Divakaran M., Babu K.N., Peter K.V. Conservation of *Vanilla* species, *in vitro* // Scientia Horticultuirae, 2006, v.110, 175–180.
3. Keller E.R.J., Senula A., Leunufna S., Grube M. Slow growth storage and cryopreservation — tools to facilitate germplasm maintenance of vegetatively propagated crops in living plant collections // International J. of Refrigeration, 2006, v.29, 411–417.
4. Renau-Morata B., Arrillaga I., Segura J. *In vitro* storage of cedar shoot cultures under minimal growth conditions // Plant Cell Reports, 2006, v.25, 636–642.
5. Gonzalves S., Romano A. *In vitro* minimum growth for conservation of *Drosophyllum lusitanicum* // Biologia Plantarum, 2007, v.51, №4, 795–798.
6. Bessembinder J.J.E., Staritsky G., Zandvoort E.A. Long-term *in vitro* storage of *Colocasia esculenta* under minimal growth conditions // Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1993, v.33, 121–127.

7. Negash A., Krens F., Schaart J., Visser B. *In vitro* conservation of enset under slow-growth conditions // Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2001, v.66, №2, 107–111.
8. Borges M., Ceiro W., Meneses S., Aguilera N., Vázquez J., Infante Z., Fonseca M. Regeneration and multiplication of *Dioscorea alata* germplasm maintained *in vitro* // Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2004, vol.76, №1, 87–90.
9. Watt M.P., Thokoane N.L., Mycock D., Blakeway F. *In vitro* storage of *Eucalyptus grandis* germplasm under minimal growth conditions // Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2000, v.61, №2, 161–164.
10. Lemos E.E.P. de Ferreira, Alencar M. de S., Ramalho Neto L.M.C., Albuquerque C.E. *In vitro* conservation of sugarcane germplasm // Pesquisa Agropecuaria Brasileira, 2002, v.37, N10, 1359–1364.
11. Gopal J., Chamail A., Sarkar D. *In vitro* production of microtubers for conservation of potato germplasm: effect of genotype, abscisic acid, and sucrose // *In vitro* — Cell Dev. Biol. — Plant, 2004, v.40, 485–490.
12. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiologia Plantarum, 1962, v.15, 473–497.
13. Лакин Г.Ф. Биометрия // М.: Высш. школа. — 1990. — 352 с.

Резюме

Проведена сравнительная оценка влияния маннитола и абсцизовой кислоты на рост асептически культивируемых растений *D. monspessulanus* и *I. quadrifida*. Показано, что маннитол в составе питательных сред может применяться для длительного хранения растений этих видов *in vitro*.

Проведено порівняльну оцінку впливу манітолу та абсцизової кислоти на ріст асептично культивованих рослин *D. monspessulanus* и *I. quadrifida*. Показано, що манітол у складі живильних середовищ може застосовуватись для тривалого зберігання рослин цих видів *in vitro*.

Comparative study of the influence of mannitol and abscisic acid on the growth of aseptically cultured *D. monspessulanus* and *I. quadrifida* plants has been carried out. Culture media supplied with mannitol can be used for long-term *in vitro* conservation of plants of both species.

ВЛАСОВ В.Г., САВЕНКО Е.Г.

ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт риса
Россия, г. Краснодар, 350921, н/о Белозерное, E-mail: arrri_kub@mail.ru

ЦИТОЛОГО-ГИСТОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ АНДРОКЛИННОГО КАЛЛУСА РИСА В ОНТОГЕНЕЗЕ

Культивирование пыльников связано с реализацией таких путей морфогенеза *in vitro*, как эмбриоидогенез и каллусогенез. При каллусогенезе инициальная клетка — микроспора сначала формирует недифференцированный каллус. После переноса на регенерационные питательные среды в каллусе отмечаются различные морфогенетические процессы.

Цель работы

Получить экспериментальные данные о структуре андроклинного каллуса риса, выявить пути морфогенеза *in vitro* каллусов.

Материал и методы

Инокуляцию пыльников проводили согласно методике для культуры клеток и тканей *in vitro*, предусматривающей асептические условия культивирования. Постоянные препараты получали согласно методике приготовления гистологических срезов с использованием микротомы. Окрашивание проводили гематоксилин-эозином, бромфеноловым синим, забуференным кислым тионином, реактивом Шиффа и красителя крезоловым фиолетовым для выявления общей морфологии клеток и наличия в них полисахаридов и белков.

Результаты и обсуждение

Эмбриониды или андрогенные зародыши, они же глобулярные пыльцевые зародыши, которые образуются из пыльцевых зерен, не рассматривались ввиду их отсутствия в исследованиях, проводившихся в динамике.

Для стимуляции процесса каллусообразования использовали питательную среду Блейдса с 2 мг/л 2,4-Д, для регенерации — среду MS с 1 мг/л α -НУК, 5 мг/л кинетин.

Каллусы из пыльников появлялись на 20–40 день с момента инокуляции в зависимости от генотипа, и этот показатель колебался от 2,7% до 20,8%.

Отбирались каллусы разного типа по структуре — белые, плотные, компактные. Они классифицировались как морфогенные. Мягкие, рыхлые, желтоватые каллусы рассматривались как неморфогенные (рис. 1).

Ранняя стадия развития каллуса (находится внутри гнезда пыльника) представлена беспорядочным скоплением клеток и не имеет зачатков зародышеподобных структур, которые появятся в более поздней стадии с образованием выступов-протуберанцев, которые являются следствием неравномерного разрастания массы каллуса. В дальнейшем происходит дифференцировка его тканей.

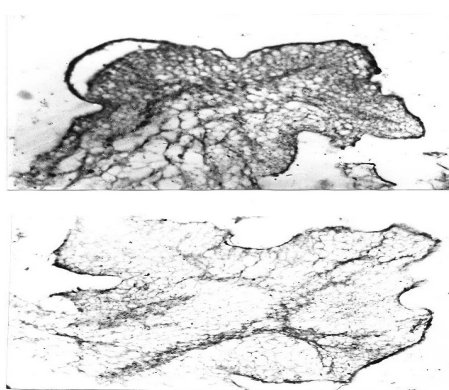


Рис. 1. Морфогенный (вверху) и неморфогенный (внизу) каллусы

На гистологических срезах различаются в основном три вида клеток — корона, меристема и паренхима.

Корона состоит из рыхлой ткани, состоящей из небольших, вакуолизованных клеток, вероятно ограничивающих массу каллуса от атмосферного воздуха. Меристема образует по периферии выступы, неравномерно растущие, называемые протуберанцами. Паренхима залегает в глубине каллуса и состоит из округлых или полигональных клеток различной величины. Впоследствии в этой ткани закладываются элементы сосудов и формируются сосудистые пучки.

На поверхности протуберанцев, в меристеме появляются инициалы, точки роста, зоны роста, которые бугорками выступают над поверхностью протуберанца. Они более интенсивно окрашены. Такие зоны обладают выраженными меристематическими признаками — клетки расположены рядами, они крупные, с крупным округлым ядром и заметным ядрышком. В таких зонах и появляются зародышеподобные структуры — эмбриониды каллуса, зачатки нового растительного организма.

В эмбриоидах появляются закладка колеоптиля, точки роста побега с зачатками листьев и меристема зародышевого корня (рис. 2). Следует отметить, что появление эмбрионидов в каллусе происходит не одновременно.

При развитии эмбрионидов каллуса закономерности, отмеченные в зиготических зародышах, не всегда соблюдаются. В таких эмбриоидах, в отличие от строгого дорзовентрального строения зародышей, наблюдается искажение стебля и корня. Процесс органогенеза часто имеет отклонения: недоразвитие и отсутствие колеоптиля, искажение формы эмбриогенеза (два и три эмбриоида стебля), зародышевый корень часто многолопастный, направления стебля и корня могут взаимно перекрещиваться. Впоследствии соблюдается физиологический градиент — корнестеблевая полярность.

Гистохимически в зонах роста уже на ранних стадиях выявляется накопление белков. Белки являются коллоидными телами сложной природы, содержащие азот, серу, углерод, водород, кислород. С бромфеноловым синим реагируют все белки и большинство свободных аминокислот. В исследованиях отмечали два типа накопления красителя — очаговый и сплошной.

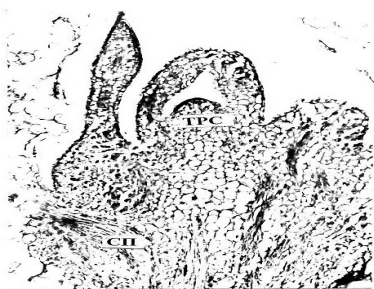


Рис. 2. Закладка сосудистых пучков, точки роста стебля, листьев

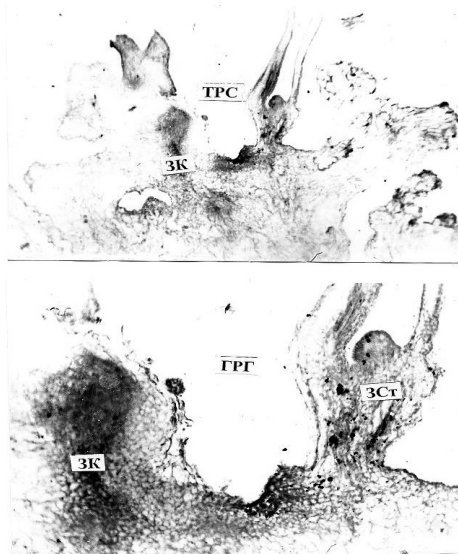


Рис. 3. Гемморизогенез. Образование регенеранта

В рыхлых каллусах белки концентрировались в отдельных участках, особенно в зонах роста, в других — вся поверхность каллуса давала резко положительную реакцию на белок, что свидетельствовало о высокой ростовой активности в этих зонах.

0,1% краситель тионин, тиазинный ядерный краситель, при pH 5,0 окрашивает суммарно нуклеиновые кислоты, особенно в зонах активного роста клеток, так как и ДНК и РНК участвуют в важных процессах жизнедеятельности клеток, особенно в структурах хромосом и синтезе белка.

Углеводы растительных тканей делятся на три основные группы: моносахариды, дисахариды и полисахариды. Нерастворимые полисахариды содержатся в стенках клеток — это пектины и клетчатка. Таким образом, полисахаридные комплексы определяют структуру каллуса. Окрашивание реактивом Шиффа и крезильовым фиолетовым дополняют друг друга и позволяют следить за развитием каллуса.

Применение анатомических и гистохимических методов дает возможность более детально разобраться в структурах исследуемой ткани, понять и правильно оценить ее структурную сложность.

Вывод

В исследованиях изучалась структура андроклинового каллуса, возникшего в результате непрямого андрогенеза *in vitro*, гистологические и гистохимические особенности этапов его развития. Наблюдались явления эмбриогенеза, ризогенеза, геммогенеза и гемморизогенеза (одновременное образование почки и корешка). Последнее и дает начало жизнеспособным проросткам риза.

Литература

1. Атабекова А.И. Цитология растений / А.И. Атабекова, Е.И. Устинова // М.: Колос, 1980.— С. 105–176.
2. Кучеренко Л.А. Каллусогенез, выход и характеристика регенерирующих растений риса в культуре тканей в зависимости от гормонального состава индукционной среды // Доклад РАСХН, 1993.— №4.— С. 3–6.
3. Круглова Н.Н. Морфогенетический потенциал спорогенных клеток пыльника злаков / Н.Н. Круглова, Т.Б. Багыгина, О.А. Сельдиминова // 2008.— С. 21.
4. Либберт Э. Физиология растений // М.: Мир, 1976.— С. 353–370.
5. Методические указания “Анатомия риса” // ВНИИ риса, 1982.— 110 с.
6. Паушева З.П. Практикум по цитологии растений // М.: Колос.— 1974.— 284 с.
7. Тутаюк В.Х. Анатомия и морфология растений // М.: Высшая школа, 1980.— 315 с.
8. Шевелуха В.С. Морфогенез в каллусных тканях // Сельскохозяйственная биотехнология, 1996.— С. 29–35.
9. Фурст Т.Г. Методы анатомо-гистологического исследования растительных тканей // М.: Наука, 1979.— С. 42–115.
10. Лили Р. Патогистологическая техника и практическая гистохимия // М.: Мир, 1969.— С. 109–445.

Резюме

Применение анатомических и гистохимических методов позволяет детально разобраться в структурах исследуемой ткани. Благодаря этим методам выявлены этапы развития андроклининого каллуса риса и определены пути морфогенеза в нем.

Application of anatomical and histochemical methods allows to understand the structures of studied tissue in detail. Thanks to these methods stages of development of rice androclinium callus were found out and the ways of morphogenesis in it were determined.

ЗАХАРОВА Е.В.², ВОРОНКОВ А.С.¹, СКОРОБОГАТОВА И.В.², КОВАЛЕВА Л.В.¹

¹Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева РАН, Россия, 127276, Москва, Ботаническая ул., 35, e-mail: kovaleva_l@mail.ru

²Московская сельскохозяйственная академия им. К. А. Тимирязева

ГОРМОНАЛЬНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ *IN VITRO* ПРОРАСТАЮЩЕГО МУЖСКОГО ГАМЕТОФИТА ПЕТУНИИ: УЧАСТИЕ АКТИНОВОГО ЦИТОСКЕЛЕТА

Имеющиеся немногочисленные сведения о регуляции прорастания пыльцевых зерен на поверхности рыльца и росте пыльцевых трубок в тканях столбика свидетельствуют о сложных перестройках в гормональной системе пестика (Kovaleva and Zakharova, 2003). Исследования, проведенные ранее на модельной системе, *in vitro* прорастающих пыльцевых зернах петунии (*Petunia hybrida* L.), показали, что динамика эндогенного содержания каждо-

го из фитогормонов и эффекты экзогенных фитогормонов на прорастание и рост пыльцевых трубок характеризовались индивидуальной спецификой (Ковалева и др., 2005). Экзогенные ИУК, АБК и гиббереллин A_3 стимулировали, а синтетический цитокинин 6-БАП ингибировал прорастание и рост мужского гаметофита. Ингибитор транспорта ИУК (2,4-хлорфенокси-2 метилпропионовая кислота) полностью подавляла, а ингибиторы синтеза АБК (флуридон) и гиббереллинов (паклобутразол) тормозили прорастание мужского гаметофита.

Целью данной работы было выяснение вопроса о потенциальном участии цитоскелета в гормональной регуляции прорастания и роста мужского гаметофита петунии.

Актиновый цитоскелет пыльцевой трубки является основным компонентом, участвующим в направленном токе цитоплазмы и вместе с ней органелл и везикул, обеспечивающих апикальный рост (Steer and Steer, 1989; Vidali and Hepler, 2001). Актиновый цитоскелет существует в равновесии между мономерной формой (G-актин) и полимерной формой (F-актин). Быстрое превращение одной формы в другую является обязательным условием для его функционирования. Переориентация структур цитоскелета на разных стадиях роста пыльцевых трубок предполагает, что они отвечают на внутри- и внеклеточные сигналы. Актиновый цитоскелет, наряду с секреторным аппаратом (везикулярным транспортом), является структурой, в которой, по-видимому, сходится большая часть сигнальных путей пыльцевой трубки. Известно, что есть целый ряд путей передачи сигналов, с которыми связаны актиновый цитоскелет и рост пыльцевой трубки, в том числе Ca^{2+} , показатель степени кислотности среды, обратимое фосфорилирование белков, фосфоинозитиды, фосфолипиды и Rop GTPases (Malho et al., 2006).

Материалы и методы

Растения выращивали в условиях почвенной культуры в оранжерее и вегетационном домике Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН.

Свежесобранную пыльцу культивировали при 26 °С на среде, содержащей 0,4 М сахарозу, 1,6 мМ H_3BO_3 , 1,3 мМ $Ca(NO_3)_2$, 0,9 мМ KNO_3 и 0,8 мМ $MgSO_4$.

За прорастанием пыльцы и ростом пыльцевых трубок следили на флуоресцентном микроскопе Axio Imagedge D1, снимки получали с помощью камеры Axio Cam MRC. Измерения длины пыльцевых трубок выполняли в программе AxioVizion 4.5.

Содержание фитогормонов (АБК — абсцизовая кислота, ГК — гибберелловая кислота, ЦК — цитокинины, ИУК — индолилуксусная кислота) определяли методом ВЭЖХ в одной навеске пыльцы (Скоробогатова и др., 1999). Навеску растительного материала заливали охлажденным 80%-ным раствором метанола в воде в соотношении 1:20 и оставляли при 4 °С в холодильнике на две недели. Затем растительную массу отфильтровывали, а раствор метанола упаривали до водного остатка, который затем подкисляли

1%-ным раствором HCl до pH 2–3. Подкисленный водный остаток очищали трехкратной экстракцией гексаном в соотношении 1:1. Гексановые экстракты отбрасывали, а к водному остатку добавляли 1%-ный раствор антиоксиданта (неозон Д — 1 мл на пробу). Все пробы доводили до одного объема дистиллированной водой. Затем эти растворы трижды экстрагировали на качалке этилацетатом в соотношении 1:1 (30 мин при 200 об/мин). Этилацетатные вытяжки объединяли и после их высушивания досуха выпариванием использовали для определения ГК, АБК и ИУК. Оставшийся после экстракции водный осадок доводили 20%-ным раствором КОН до pH 8 и два раза экстрагировали бутанолом, насыщенным водой (30 мин при 200 об/мин). Бутанольную фракцию высушивали испарением и использовали для определения ЦК. АБК, ИУК и цитокинины анализировали методом ВЭЖХ, ГК — по методу Frankland and Wareing (1960) с использованием салата сорта “Берлинский”, обладающего высокой чувствительностью к данному фитогормону.

Результаты и обсуждение

В серии экспериментов мы исследовали действие ингибитора полимеризации F-актина латрункулина Б на прорастание, рост и эндогенный уровень фитогормонов в *in vitro* прорастающих пыльцевых трубках петунии.

Установлено, что прорастание и рост мужского гаметофита чувствительны к латрункулину Б. Ингибитор полимеризации актина, в зависимости от его концентрации, оказывал различные эффекты. Латрункулин в концентрации 100 нМ, связываясь с актиновыми филаментами, приводил к их деполимеризации до мономерного актина после 20 минут воздействия, вследствие чего прорастание пыльцевых зёрен полностью блокировалось. В концентрации 2 нМ латрункулин приводил к блокированию прорастания пыльцевых трубок, при их прорастании наблюдали потерю униполярности. Низкая концентрация ингибитора (0,2 нМ) не приводила к ингибированию роста пыльцевых трубок, а лишь замедляла его.

В опытах по изучению эффектов латрункулина на эндогенное содержание фитогормонов мы использовали пыльцу, прорастающую на среде без латрункулина (контрольный вариант) и с латрункулином в концентрации 0,2 нМ (опытный вариант). Содержание фитогормонов (ИУК, АБК, гиббереллинов и цитокининов) определяли в пыльце и среде культивирования в трех точках: 0, 1 и 4 часа культивирования. Пыльцу отделяли от среды на бумажном фильтре (для нулевой точки — 3–5 минутное смачивание пыльцы). Как показали результаты, прорастание пыльцы на среде с ингибитором полимеризации актина сопровождалось изменением динамики содержания фитогормонов (рис.).

В первой точке (0 часов) латрункулин не успевал повлиять на структуру актина мужского гаметофита и, как следует из данных, представленных на графиках, не выявлено какой-либо разницы в уровнях всех исследованных гормонов в опытном варианте (с латрункулином) по сравнению с контрольным (без латрункулина). Следует отметить, что за очень короткое время смачивания пыльцы (3–5 минут) ИУК, АБК и гиббереллины активно выхо-

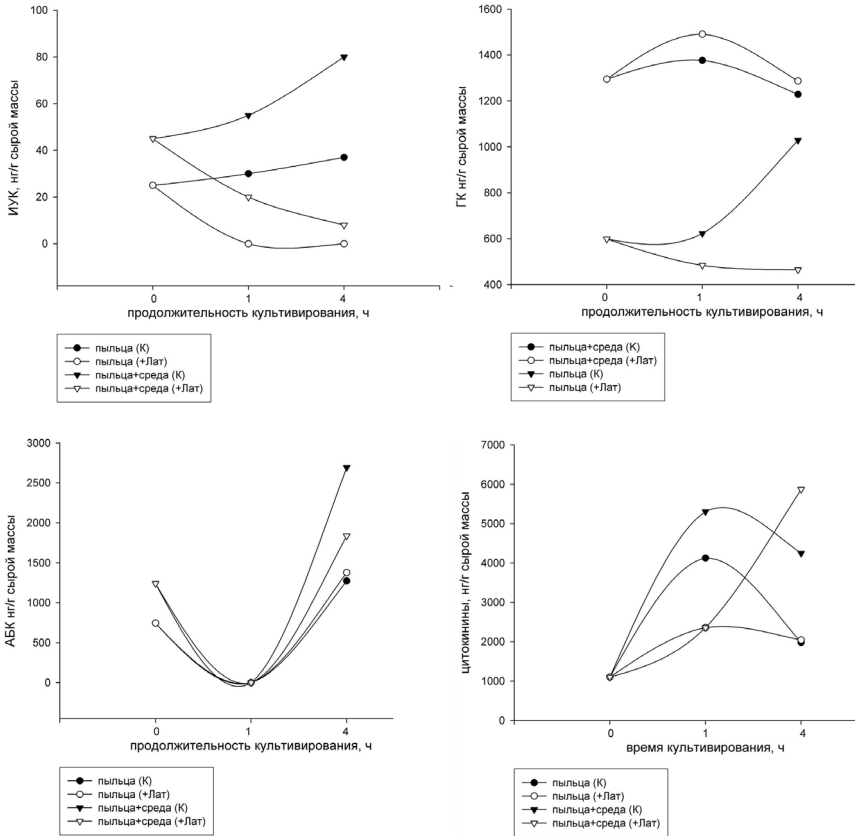


Рис. 1. Динамика содержания фитогормонов в прорастающем мужском гаметофите петунии на среде без латрункулина (контроль) и с 0,2 нМ латрункулина Б (опыт)

дили из нее в среду культивирования, где их концентрация была сопоставима с их содержанием в пыльце. Цитокинины, напротив, практически не выходили из пыльцевых зерен, и их концентрация в среде была очень низкой.

Культивирование пыльцы в течение одного часа на среде в присутствии латрункулина, очевидно, приводило к нарушению citoархитектуры актинового цитоскелета мужского гаметофита и, как следствие, к последующему ингибированию его роста. Торможение роста сопровождалось резким (до нуля) падением содержания ИУК в пыльцевых зернах, в отличие от контрольного варианта, где рост пыльцевых трубок сопровождался резким подъемом уровня ИУК. В содержании других гормонов каких-либо значительных различий между контрольным и опытным вариантами не наблюдали.

При дальнейшем культивировании, через 4 часа длина пыльцевых трубок на среде с латрункулином была в 5 раз меньше длины пыльцевых трубок, растущих на среде без латрункулина. В опытном варианте продолжалось снижение общего уровня ИУК (в отличие от контрольного варианта). Уровень гиббереллинов в опытном варианте заметно снижался в пыльцевых зернах, но возрастал в среде культивирования, в результате их общий уровень в опытном варианте сохранялся на уровне контроля. Концентрация зеатина в пыльце контрольного и опытного вариантов была одинаковой, но в среде культивирования она возрастала.

Таким образом, проведенные исследования выявили взаимосвязь функционирования актинового цитоскелета мужского гаметофита с гормональной регуляцией. Если при культивировании пыльцы на среде без латрункулина мы наблюдали увеличение содержания ИУК в течение 4 часов, как в самой пыльце, так и среде культивирования, то на среде с латрункулином содержание ИУК в пыльцевых зернах падало до нуля на фоне постоянного ее снижения в среде культивирования. Следовательно, резкое снижение темпов роста пыльцевых трубок на среде с латрункулином, очевидно, обусловлено нарушением полимеризации актинового цитоскелета и падением содержания эндогенной ИУК, играющей центральную роль в поддержании апикально-направленного роста пыльцевых трубок.

Литература

1. Steer M.W., Steer J.L. Pollen tube tip growth // *New Phytol.*— 1989.— 111.— P. 323–358.
2. Vidali L., Hepler P.K. Actin and pollen tube growth // *Protoplasma.*— 2001.— 215.— P. 64–76.
3. Vidali L., McKenna S.T., Hepler P.K. Actin polymerization is essential for pollen tube growth // *Mol. Boil. Cell.*— 2001.— 12.— P. 2534–2545.
4. Malho R., Liu Q., Monteiro D., Rato C., Camacho L., Dinis A. Signalling pathways in pollen germination and tube growth // *Protoplasma.*— 2006.— 228.— P. 21–30.
5. Kovaleva L., Zakharova E. Hormonal control of pollen-pistil interactions at the progamic phase of fertilization after compatible and incompatible pollination in *petunia* (*Petunia hybrida* L.) // *Sex. Plant. Reprod.*— 2003.— 16.— P. 191–196.
6. Скоробогатова И.В., Захарова Е.В., Карсункина Н.П., Курапова П.Б., Соркина Г.Л., Кислин Е.Н. Изменения содержания фитогормонов в проростках ячменя в онтогенезе и при внесении регуляторов, стимулирующих рост. // *Агрохимия.*— 1999.— 8.— С. 49–53.
7. 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 фитогормонов и сопровождаются изменением эндогенного уровня фитогормонов // *Физиология растений.*— 2005.— 52.— С. 584–590.

Резюме

Ингибирование роста пыльцевых трубок петунии на среде культивирования в присутствии ингибитора полимеризации актина латрункулина Б сопровождалось резким (до нуля) падением эндогенного содержания ИУК, что свидетельствует о роли этого фитогормона в поддержании полярного роста мужского гаметофита.

Інгібування росту пилкових трубок петунії на середовищі культивування в присутності інгібітору полімеризації актину латрункуліна В супроводжувалося різким (до нуля) падінням ендogenous змісту ІОК, що свідчить про роль цього фітогормону в підтримці полярного росту чоловічого гаметофіту.

The inhibition of petunia pollen tube growth on the culture medium at presence of latrunculin B, inhibitor of actin polymerization, would be accompanied sharp (to zero) by falling of IAA contain that testifies to a role of this phytohormone in maintenance of polar growth of male gametophyte.

КАРПЕЧЕНКО К.А.*, **КАРПЕЧЕНКО Н.А.***, **ЗЕМЛЯНУХИНА О.А.***,
ДЖАНГИРОВ М.Ю.**, **СКРЫПНИК И.А.****

* ФГУП «НИИ лесной генетики и селекции» (НИИЛГиС),
Россия, 394087, Воронеж, ул.Ломоносова, 105, e-mail: oz54@mail.ru

** ФГУ «НИИ горного лесоводства и экологии леса» (НИИ горлесэкологии),
Россия, 354002, Сочи, Курортный пр., 74, nikiforovdn@mail.ru

ВЛИЯНИЕ КУЛЬТУРАЛЬНЫХ УСЛОВИЙ НА РЕГЕНЕРАЦИЮ ДУБА ЧЕРЕШЧАТОГО И ДУБА СКАЛЬНОГО *IN VITRO*

В настоящее время отмечается деградация и массовое усыхание дубрав, что стало глобальным явлением и отмечено практически во всех ареалах многих видов дуба по всему миру. В этой связи встает проблема лесовосстановления дубрав, которая затруднена периодичностью плодоношения и трудностями закладки лесосеменных плантаций.

Основные проблемы при закладке ЛСП дуба:

- плодоношение с 15–60-летнего возраста;
- интенсивное плодоношение раз в 4–5 лет;
- затруднено определение генетической ценности плюсовых деревьев и их семенного потомства;
- отторжение значительной части прививок от подвоя.

Целью настоящей работы является изучение минерального состава питательных сред и гормональных добавок на регенерацию, размножение и укоренение микрочеренков *Q. robur* L. (дуб черешчатый) и *Q. petraea* (Matt.) Liebl. (дуб скальный).

Материалы и методы

Объекты исследования. Желуди дуба черешчатого были собраны осенью 2009 г. в санатории им. Горького (1 дерево), в парке “Динамо” (2 дерева) (г. Воронеж). Желуди дуба скального были присланы осенью 2009 г. из НИИ горного лесоводства (г. Сочи).

Желуди проращивали в условиях 16-часового фотопериода, в лесной почве, взятой в окрестностях НИИЛГиС.

Стерилизация растительного материала. По достижении достаточной длины для 3–4 сегментов проростки желудей отрезали и стерилизовали.

Срезанные побеги протирали мочалкой со стиральным порошком, тщательно отмывали в проточной воде и помещали на 10 мин. в стеклянные ёмкости с дистиллированной водой, дополненной несколькими каплями жидкого моющего средства. Отмывание проводили на качалке. Затем черенки помещали под проточную водопроводную воду на 20 мин., после чего переносили их в дистиллированную воду на 10 мин. на качалку.

Все последующие стадии проводили в стерильных условиях.

Черенки заливали стерилизующим раствором, содержащим 4% хлорсодержащего отбеливателя “Белизна” и 0,015% мертиолята. Растения выдерживали в течение 15 мин. на качалке, после чего отмывали стерильной дистиллированной водой (трижды по 5 мин.).

Концы проростков подрезали, нарезали на отрезки с одной почкой (верхушечные и боковые сегменты) и помещали в пенициллиновые пузырьки на питательные среды разного минерального состава, содержащие БАП.

Образование микропобегов. На питательных средах почки образовывали побеги, которые по достижении 2 см длины отрезали и переносили либо на дальнейшее субкультивирование на средах того же состава, либо на укоренение.

Укоренение. Для укоренения были использованы среды различного минерального состава, а в качестве гормонов укоренения выбраны ИУК и ИМК в различных концентрациях.

Результаты и обсуждение

В НИИЛГиС исследования по микроклональному размножению дуба черешчатого начались в конце прошлого столетия в работах Г.П. Бутовой, Т.М. Табацкой, Л.Л. Скробовой, Л.Я. Алексеевой [1, 2]. В качестве исходного материала использовались сеянцы дуба от 1 месяца до 1 года, порослевые побеги взрослых деревьев, сегменты одревесневших побегов с пазушными почками, взятые от поросли пня и живых 15–20-летних деревьев дуба. Авторам удалось добиться регенерации адвентивных побегов на ювенильном материале, считая один желудь за один генотип. Отмечено, что морфогенная активность зависит от типа и генотипа экспланта, от возраста материнского дерева.

В наших экспериментах мы использовали только ювенильный материал, полученный из 2-месячных проростков желудей дубов черешчатого и скального.

На первом этапе работы проводили поверхностную стерилизацию растительного материала и выясняли её влияние на жизнеспособность экплантов. Оказалось, что стерилизация проростков дуба черешчатого и скального без добавления мертиолята приводит к усилению роста растений без выявления инфекции (жизнеспособность до 100%).

Биотехнологические методы для тиражирования вида начали применяться давно [3]. Основная проблема, с которой сталкивались исследователи, — апикальный некроз: после введения в культуру *in vitro*, верхняя часть главного побега начинала усыхать, а развивающиеся боковые (адвен-

тивные) побеги росли укороченными, с неразвитыми листьями и в конце также некротизировали [4]. Предотвращением апикального некроза стало микроклональное размножение дуба расширенного (*Q. floribunda* Lindl.) не меристемными тканями, а путем образования адвентивных побегов на стерильных семядолях на гормональных питательных средах [5]. После поверхностной стерилизации с желудей снимали чешуи, дополнительно стерилизовали и помещали в условия 16-часового фотопериода. У позеленевших семядолей аккуратно убирали зародыш, и через 2–3 недели на поверхности образовывались адвентивные почки, развивающиеся в проростки. Нам, однако, не удалось добиться прорастания желудей в безгормональных условиях: даже на средах с фитагелем (0,24%) желуди выделяли фенолы, не зеленели и их выделенные зародыши погибали. Метод, на наш взгляд, подходит для редких, исчезающих видов дуба (например, дуба ножкоцветного) или для сохранения биоразнообразия, но не для размножения ценного генофонда, т.к. ткани семядолей миксоплоидны.

Необходимо отметить, что при введении верхушечных почек дуба в культуру *in vitro* наблюдалось неразвитие меристем. Побег не рос и через некоторое время погибал.

Для микроклонального размножения использовали среды WPM и BTM, дополненные БАП. Хорошо развивались побеги из боковых почек; на этой

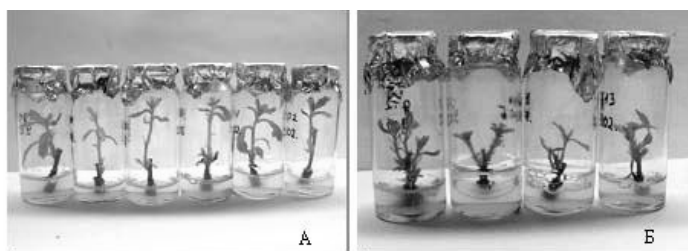


Рис. 1. Типы роста пробирочных растений:

А — растения, растущие одиночным побегом; Б — растения, растущие кустом

Таблица

Укореняемость эксплантов дуба черешчатого на разных типах питательных сред

Питательная среда	Исходное количество эксплантов, %	Конечное количество эксплантов, %		
		всего	из них с корнями	из них с ризогенным каллусом
Агар, 1/2WPM + 0.5 ИМК	100	62,5	60	0
Агар, 1/2WPM + 0.1 ИМК	100	100	12,5	25
Фитагель, 1/2 WPM + 0.5 ИМК	100	37,5	33,3	33,3
Фитагель, 1/2 WPM + 0.1 ИМК	100	75	0	50

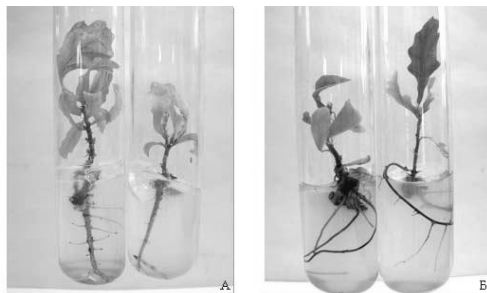


Рис. 2. Ризогенез микрочеренков дуба черешчатого и скального:

А — растения, имеющие мощный одиночный корень; Б — множественные корни
 стадии было заметно отличие генотипов: одни растения росли одиночным прямым побегом, другие — с множеством боковых коротких побегов, в виде куста (рис. 1).

Апикальное усыхание было частым явлением, выход в этой ситуации найден следующим образом: в отличие от исследований, в которых использовались концентрации БАП 1 мг/л, мы добавляли сразу, на первых этапах только 0,2 мг/л бензиламинопурина для дуба черешчатого, и 0,05 мг/л — для дуба скального. При этом развивались нормальные зеленые побеги, которые по достижении длины 2 см отрезали и переносили или на дальнейшее микроразмножение на среды того же состава или на укоренение.

Элонгация побегов достигалась добавлением в среду регенерации (1/2 ВТМ) GA_3 в концентрации 0,1 мг/л. Длительность черенкования адвентивных эксплантов с первичного побега наблюдалась, по крайней мере, в течение полугода без потери регенерационной способности.

Во многих статьях по микрочеренкованию дуба в качестве желирующего агента при укоренении используется наряду с агаром фитагель в концентрации последнего 0,24%. В наших исследованиях оказалось, что фитагель не только не способствовал укоренению, напротив, тормозил его, при этом в среду выделялось значительное количество фенолов, тормозящих развитие побега и корней.

Для укоренения черенков мы использовали среды MS, WPM как полные, так и 1/2, 1/4, 1/8 по макросолям с добавлением ИУК и ИМК в концентрациях 0,5, 0,01 и 0,05 мг/л. Наилучшие результаты получены на среде S WPM, содержащей 0,5 мг/л ИМК (табл.).

В наших экспериментах наблюдалось развитие корней разного типа. Одни появлялись в середине базальной части и росли мощным одиночным корнем, другие образовывали несколько корней, быстро дающих дополнительные корневые волоски (рис. 2).

Выводы

Значение дуба не только в его экономической ценности, связанной с источником ценнейшей древесины, но и в его влиянии на оздоровление всей

экосистемы за счет водоохраных и защитных функций. С другой стороны, состояние насаждений дуба постоянно ухудшается по целому ряду причин: усыхание дубрав; нерегулярное плодоношение; длинный репродуктивный цикл; сильное заражение желудей различного рода паразитами как в природе, так и при хранении; поедание семян мелкими и крупными животными (кабанами, оленями, белками, мышами, птицами); короткий срок жизнеспособности желудей.

Большинство проблем можно было бы решить методами микроклонального размножения дуба. Авторами подобрана оптимальная среда для длительного микрочеренкования: 1/2 ВТМ, содержащая 0,2 мг/л БАП и 0,1 мг/л GA_3 . Укоренение (до 60% для дуба черешчатого и 63% для дуба скального) достигалось добавлением к низкосолевой среде S WPM 0,5 мг/л ИМК. Нами ставится задача отбора клонов (линий) одного растения, наиболее идентичного по генотипу исходному плюсовому дереву. Полученный генетически-улучшенный материал будет использован при закладке лесосеменных плантаций и питомников. Следующей стадией исследования будет генетическая оценка полученных объектов, в том числе с использованием физиолого-биохимических, цитологических и ДНК-технологий.

Литература

1. Бутова Г.П., Табацкая Т.М., Скробова Л.Л. Генетика и селекция в лесоводстве. — М., 1991. — С. 41–49.
2. Алексеева Л.А., Нечаева М.Ю., Бутова Г.П. Сб. науч. тр. НИИЛГиС. — Воронеж. — 1993. — С. 65–73.
3. Vengadesan G., Pijut P.M. *In vitro* Cell. Dev. Biol.-Plant. — 2009. — V.45. — P. 474–482.
4. Veitez A.M., Pintos F., San-Jose M.C., Ballester A. *Tree Physiol.* — 1993. — V.12. — P. 107–117.
5. Purohit V.K., L.V.S.Palni, Nandi S.K., Rikhari H.C. *Current science.* — 2002. — V.83, N.3. — P. 312–316.

Резюме

Описаны условия микроклонального размножения и элонгации черенков желудей *Q. robur* и *Q. petraea*: подобрана низкосолевая среда 1/2 ВТМ, содержащая 0,2 мг/л (дуб черешчатый) и 0,05 мг/л БАП (дуб скальный) и 0,1 мг/л GA_3 . Длительность черенкования при отделении побегов на свежие среды достигала полугода. Укоренение побегов происходило при добавлении к 1/2 WPM 0,5 мг/л ИМК.

Визначені умови мікрочнонального розмноження та елонгації черенків жолудів *Q. robur* і *Q. petraea*: підібрано низькосольове середовище 1/2 ВТМ, яке вміщує 0,2 мг/л (дуб черешковий) і 0,05 мг/л БАП (дуб скальний), а також 0,1 мг/л GA_3 . Тривалість черенкування при відділенні пагонів на свіжі середовища досягало півроку. Укорення пагонів проходило за додавання до 1/2 WPM 0,5 мг/л ІМК.

Acorns from *Q. robur* and *Q. petraea* trees were used as initial explants for micropropagation. WPM and BTM supplemented by low concentrations BAP (0,2 mg/l) and GA_3 (0,1 mg/l) were used as basal mediums. 1/2 WPM with 0,5 mg/l IBM gave the best rooting results. Explants which subcultured to fresh medium after harvesting shoots increased shoot regeneration up to six months.

КОВТУН С.І., ЗЮЗІОН А.Б., ЩЕРБАК О.В., ГОНЧАРЕНКО Л.М.

Інститут розведення і генетики тварин НААН України

Україна, 08321, Київська обл., Бориспільський р-н.,

с. Чубинське, вул. Погребняка, 1, e-mail: kovtun_si@gala.net

ДОСЛІДЖЕННЯ ЕФЕКТИВНОСТІ ФОРМУВАННЯ ЕМБРІОНІВ КРОЛІВ *IN VITRO*

Одним із етапів технології формування ембріонів ссавців *in vitro* є забезпечення ядерного та цитоплазматичного дозрівання ооцитів для більш повного використання генетичного потенціалу самиць. Сучасні репродуктивні технології, які ґрунтуються на розумінні закономірностей біології розвитку, ембріологічної генетики, забезпечують одержання тварин із бажаними та якісно новими ознаками. Клонування шляхом переносу ядер клітин з бажаними генетичними характеристиками дозволяє створювати трансгенних тварин, які продукують біологічно активні речовини [1, 2]. Наразі одним із методів отримання трансгенних тварин є мікроін'єкція розчину генних конструкцій у чоловічий пронуклеус зигот. Хоча цей підхід широко розповсюджений, ефективність переносу генів залишається на досить низькому рівні, що створює проблеми в отриманні трансгенних тварин [3].

В якості клітин-реципієнтів при клонуванні кролів слугують дозрілі *in vivo* яйцеклітини після гормональної обробки самиць, проте синхронізація овуляції гамет ускладнюється часовими параметрами від 10,5 до 14 годин після ін'єкції лютеїнізуючого гормону (ЛГ) [2]. Тому існує необхідність удосконалення методик одержання *in vitro* дозрілих яйцеклітини кролів для вивчення генетичних закономірностей проходження мейозу поза організмом, формування ембріонів та застосування їх для удосконалення методичних підходів щодо одержання клонованих та трансгенних особин.

Практичне застосування методу одержання ембріонів *in vitro* неможливе без відпрацювань методик оцінки ефективності дозрівання та запліднення *in vitro* гамет самиць. Метою наших досліджень було вивчити ефективність дозрівання *in vitro* ооцитів кролиць до стадії метафази II мейозу і проаналізувати сформовані поза організмом ембріони кролів.

Матеріали і методи

Яєчники отримували від забитих клінічно здорових кролиць віком 7,5 міс. Відібрані яєчники не мали ознак патології та знаходились на стадії фолікулярного росту. Ооцит-кумулясні комплекси вилучали шляхом розсічення стінок антральних фолікулів. Гамети із розпушеним кумулюсом, темною гомогенною ооплазмою дозрівали *in vitro* в середовищі ТСМ 199 (Sigma, M-5017) з додаванням 20% еструсної сироватки корів і $3-5 \times 10^6$ клітин гранулози в 1 мл. Для вивчення дозрівання ооцитів кролиць до стадії метафази II мейозу культивування *in vitro* проводили 6 та 24 години при температурі +38,8 °C і 4% CO₂ у повітрі. Після 24 годин дозрівання поза організмом яйцеклітини осіменяли свіжоотриманими сперматозоїдами, які вилучали із хвостової частини придатка сім'яника кроля. Капацитовані поза організмом

епідидимальні сперматозоїди (концентрація — $1,5 \times 10^6$ в 1 мл) та ооцити спільно інкубували в середовищі TALP-IVF з додаванням суміші ПГЕ (20 мкМ пеніциламіну, 10 мкМ гіпотаурину та 1 мкМ епінефрину) упродовж 22 годин. Культивування ембріонів проводили у середовищі TCM 199 (Sigma, M-5017) з додаванням 10% фетальної сироватки теляти (Sigma, F-9665) на моношарі епітеліальних клітин яйцепроводу кроля. Для дослідження стану мейотичних хромосом ооцитів кролиць та хроматину ядер ембріонів готували сухоповітряні препарати за модифікованим методом А. Тарковського [4]. Препарати фарбували з використанням 2%-го розчину барвника Гімза і аналізували їх під світловим мікроскопом.

Результати та обговорення

Відомо, що овуляція ооцитів ссавців із фолікулів яєчників співпадає з часом дозрівання гамет. Морфологічними ознаками дозрівання ядра ооцитів є досягнення ними стадії метафази II мейозу. Дозрівання цитоплазми полягає у синтезі РНК і білків, які необхідні для повноцінного запліднення та здійснення перших поділів дроблення зародків. Також відбувається синтез факторів руйнування ядерної оболонки незрілих ооцитів, синтез фактора деконденсації хроматину головки сперматозоїда, фактора формування чоловічого пронуклеуса та інше. Дозрівання ядра і дозрівання цитоплазми ооцитів ссавців є відносно незалежними процесами, тому розвиток ооцитів до метафази II мейозу не може вказувати на достатню їх зрілість і готовність до запліднення.

У деяких тварин, зокрема кролів, процес парування індукує виділення ЛГ, що викликає овуляцію. Відомо, що часові параметри дозрівання ооцитів кролів від піку ЛГ до овуляції становить 10–12 годин [5]. Для вивчення генетичних закономірностей проходження мейозу в ооцитах кролів поза організмом проводили їх культивування упродовж 6 годин. Аналіз цитогенетичних препаратів показав, що через 6 годин дозрівання *in vitro* у 70% ооцитів відбулось руйнування цілісності ядерної мембрани і такі клітини перебували на стадії діакінезу і метафази I мейозу (табл. 1). Решта ооцитів кролів залишалась на стадії диплотени. Отже, 6-годинне культивування незрілих ооцитів кролів забезпечує ініціацію їх дозрівання *in vitro*, а подовження часу їх куль-

Таблиця 1

Вплив тривалості культивування ооцит-кумулясних комплексів на дозрівання ооцитів кролів *in vitro*

Час культивування ОКК (год.)	Кількість ооцитів	Ооцити на стадії				Кількість ооцитів з хромосомними порушеннями, n (%)
		диплотени, n (%)	діакінезу, n (%)	метафази I, n (%)	метафази II, n (%)	
6	50	15 ^a (30,0±6,48)	23 (46,0±7,05)	12 (24,0±6,04)	-	8 ^b (16,0±5,18)
24	38	4 ^b (10,5±4,97)	-	-	34 (89,5±4,97)	4 ^b (10,5±4,97)

a:b — $p = 0,05$, критерій χ^2 .

тивування необхідне для виявлення повного дозрівання *in vitro* гамет кролиць до стадії метафази II мейозу та забезпечення цитоплазматичного дозрівання.

У дослідження С. Стайса і Дж. Робла при одержанні клонованих ембріонів кролів після використання ооцитів, які вилучали через 16–20 годин після ін'єкції хоріонічного гонадотропіну людини, рівень активації реконструйованих зародків кролів становив лише 4%. З використанням ооцитів, які одержували через 20–24 години після ін'єкції гормону рівень активації ембріонів був 52% [6]. Тому в наступних дослідженнях час культивування *in vitro* незрілих ооцитів кролів нами був подовжений до 24 годин.

За результатами морфоцитогенетичного аналізу встановлено, що рівень дозрівання *in vitro* ооцитів кролів до стадії метафази II мейозу досягає 89,5% (табл. 1). Критерієм морфологічної оцінки дозрівання ооцитів була наявність першого полярного тільца (рис. 1).

За даними цитогенетичного аналізу ооцитів кролів виявлено, що через 24 години дозрівання *in vitro* лише 10,5% гамет знаходилось на стадії диплотени. Кількість ооцитів із хромосомними порушеннями суттєво не відрізнявся, коли їх культивували поза організмом 6 і 24 години (16,0% та 10,5%, відповідно).

Через 24 години дозрівання *in vitro* яйцеклітини кролів співкультивували із свіжовилученими епідидимальними сперматозоїдами кроля. Встановлено, що такі сперматозоїди кролів проявляють рухливість на рівні 80%. Після 22 годин сумісного культивування яйцеклітини відмили від сперматозоїдів і розмістили на подальше культивування.

За даними морфологічного аналізу рівень дроблення ембріонів кролів *in vitro* становив 84,2% (32/38). Сформовані 2-клітинні ембріони проявляли ознаки повноцінного розвитку (рис. 2). Слід зазначити, що одержаний нами рівень дроблення ембріонів кролів поза організмом є вірогідно вищим, порівняно із формуванням таких ембріонів великої рогатої худоби ($p < 0,05$, крите-



Рис. 1. Зажиттєве фото яйцеклітини кроля після культивування *in vitro*.

Ідентифіковано перше полярне тіло (стрілка). Об.10х, ок. 10х

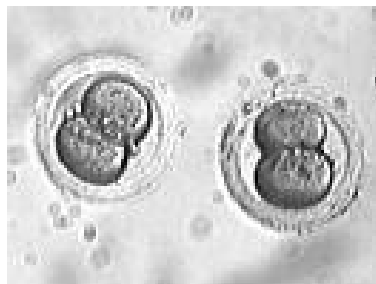


Рис. 2. Двоклітинні ембріони кроля, сформовані *in vitro*.

Збільшення у 100 разів

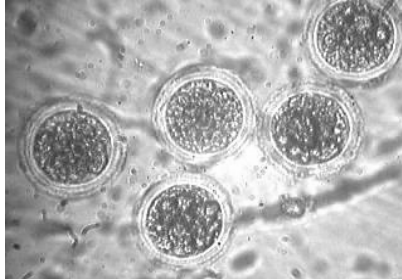


Рис. 3. **Зажиттєве фото сформованих поза організмом раних морул кроля.**
Збільшення у 100 разів

рій χ^2) та свиней ($p < 0,001$) [7]. Відсоток роздроблених ембріонів великої рогатої худоби був 62,9% (180/286), а свиней — 52,8% (75/142) [7].

Одержаний нами відсоток дроблення *in vitro* ембріонів кролів (84,2%) також вищий, порівняно із одержаними шляхом вимивання через 48 годин після осіменіння кролиць (64,4%, 38/59) [8]. На п'ятий день розвитку ембріонів кролів поза організмом до стадії ранньої морули (рис. 3) розвинулось 18,8% (6/32).

Після цитогенетичного аналізу препаратів ембріонів кролів на різних стадіях розвитку (від двох бластомерів до ранньої морули) встановлено, що ембріони які за візуальною оцінкою були визначені як морфологічно нормальні містили повноцінні ядра із ядерцями, кількість яких відповідала кількості бластомерів ембріонів, хроматин цих ядер теж відповідав стадії розвитку зародка.

Висновки

Отже, використання ооцит-кумулюсних комплексів кролів забезпечує ефективне формування ембріонів *in vitro*. За умови використання епідидимальних сперматозоїдів для запліднення дозрілих поза організмом яйцеклітин кролів рівень розвитку ембріонів дозволяє додатково використовувати генетичний потенціал тварин і удосконалювати вітчизняні біотехнологічні методи.

Література

1. *Challah-Jacques M., Chesne P., Renard J.P.* Production of cloned rabbits by somatic nuclear transfer // Cloning and stem cells.— 2003.— №5 (4).— P. 295–299.
2. *Kosenyuk Y.* Nuclear transfer in rabbit: the state of the art // Ann. Anim. Sci.— 2006.— Suppl., No1.— P. 109–122.
3. *Эрнст Л.К., Прокофьев М.И.* Биотехнология — новый этап развития генетики, биохимии и физиологии сельскохозяйственных животных. В сб.: Актуальные проблемы биологии в животноводстве. Мат. II Междунар. конф., 5–8 сентября 1995 года. Боровск.—1997.— С. 232–240.
4. *Tarkowski A.K.* An air-drying method for chromosome preparation from mouse eggs // Cytogenetics.— 1966.— Vol.5, №3.— P. 394–400.
5. *Дыбан А. П.* Раннее развитие млекопитающих.— Л.: Наука, 1988.— 228 с.

6. Stice S.L., Robl J.M. Nuclear reprogramming in nuclear transplant rabbit embryos // Biol. Reprod.— 1988.— №39 (3).— P. 657–664.

7. Ковтун С.І. Одержання зародків свиней *in vitro*: стан та перспективи використання / С.І. Ковтун // Вісн. аграр. науки.— 2004.— №5.— С. 52–54.

8. Щит И.Ю., Кузнецов А.В., Каурова С.А. и др. Негативное действие экзогенной ДНК на оплодотворение // Проблемы репродукции.— 1998.— №4.— С. 5–10.

Резюме

Обсуждается эффективность получения эмбрионов кроликов *in vitro* с использованием эпидидимальных сперматозоидов для оплодотворения яйцеклеток вне организма. Установлено, что высокий уровень формирования эмбрионов кроликов *in vitro* позволяет использовать их в исследованиях по трансгенезу и клонированию животных.

Обговорюється ефективність одержання ембріонів кролів *in vitro* з використанням епідидимальних сперматозоїдів для запліднення яйцеклітин поза організмом. Встановлено, що високий рівень формування ембріонів кролів *in vitro* дозволяє застосовувати їх у дослідженнях з трансгенезу та клонування тварин.

It is discussed effects of production rabbit embryo *in vitro* with using epididymal spermatozoa for *in vitro* ova fertilization. It is set high level forming *in vitro* rabbit embryos allows to using them in researches of animal transgenic and cloning.

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

КАЛЮСОГЕНЕЗ *IN VITRO* ПШЕНИЦІ ЯРОЇ: ПЕРЕДУМОВИ КУЛЬТИВУВАННЯ КЛІТИН І РЕПРОДУКЦІЇ РОСЛИН-РЕГЕНЕРАНТІВ

Найпріоритетнішим завданням усіх цивілізованих країн є забезпечення своїх громадян продуктами харчування, вживання яких у фізіологічно необхідних нормах і асортименті сприяє нормальному функціонуванню організму та його працездатності. З багатющого набору продуктів харчування, що входять до споживчого кошика, найбільшої уваги заслуговують зернові культури, адже їхнє безпосереднє споживання та споживання продуктів їхньої переробки посідають чільне місце у раціоні харчування людини. Саме до таких культур належить пшениця.

Пшениця займає провідне місце серед оброблених у всьому світі культур за посівними площами. Таке її розповсюдження пояснюється високою поживністю та можливістю різностороннього використання і переробки. Зерно пшениці використовується для виготовлення найбільш масових про-

дуктів повсякденного харчування населення, таких як хлібобулочні, борошняні, кондитерські, макаронні вироби, крупи, екструдовані продукти і інші вироби, отримані на основі борошна. Якість зерна — це сукупність біологічних, фізико-хімічних, технологічних і споживчих властивостей зерна, що визначають його придатність до використання на продовольчі потреби. Масло зародків пшениці містить понад 75% тригліцеридів різних жирних кислот, до 6% вільних жирних кислот та до 4% гліколіпідів і фосфоліпідів. Вміст поліненасичених жирних кислот понад 70%, при цьому співвідношення лінолевої і ліноленової кислот 3:1, що є найоптимальнішим для ліпідного обміну в організмі. Масло також містить міристинову, олеїнову, ерукову і близько 10 нуклеїнових кислот. Ніби сама природа сконцентрувала унікальний збалансований комплекс біологічно активних речовин, вітамінів, ліпідів, незамінних амінокислот і мінералів для відновлення життя [9].

В теперішній час для вирішення прикладних завдань селекції цінних сільськогосподарських рослин [2, 4, 8] і зокрема ярої пшениці — основного хлібного злаку [1, 6, 9], широко використовуються біотехнологічні методи культури *in vitro*, зокрема регенерація рослин в морфогенних калюсних культурах *in vitro*. Сучасна біотехнологія кардинально змінює процес селекційної роботи щодо виведення нових високопродуктивних гібридних ліній і сортів ярої пшениці. Практичне значення більшості методів культури *in vitro* визначається утворенням на кінцевому етапі повноцінних фертильних рослин-регенерантів.

Основна проблема, пов'язана з розробкою ефективної біотехнології масового стабільного отримання фертильних рослин-регенерантів, полягає в їхньому низькому виході. Вирішення цієї проблеми безпосередньо пов'язане з виявленням шляхів морфогенезу *in vitro* калюсів на живильному середовищі для регенерації і можливістю регуляції цих шляхів в контрольованих експериментальних умовах *in vitro*.

Пшениця, як і всі злаки, належить до групи гормонзалежних об'єктів культивування *in vitro*. Підбір оптимальної концентрації певних гормонів, що вводяться до складу живильного середовища, — один з ключових етапів в роботі з культурою *in vitro*.

Метою нашої роботи було отримання морфогенного калюсу, рослин-регенерантів та визначення жирнокислотного складу ліпідів калюсних тканин пшениці сорту Рання 93, що буде слугувати підґрунтям для подальших досліджень з підвищення адаптивних властивостей та продуктивності пшениці.

Матеріали і методи

Об'єктами досліджень були калюсні тканини пшениці сорту Рання 93. Для одержання первинного калюсу як експлантат використовували дозріле насіння, апікальні ділянки асептичного коріння і листкові експлантати. Насіння стерилізували 5 хв. в 70%-вому розчині спирту, потім 20 хв. в 16,5% розчині пероксиду водню, далі насіння занурювали у спирт і обпалювали двічі в полум'ї. Для індукції калюсогенезу простерилізоване насіння висад-

жували на модифіковані середовища Мурасіге-Скуга (МС) [12], які містили 0,5 мг/л 6-бензиламінопурину (6-БАП), 3,0 мг/л 2,4-дихлорфеноксіцтової кислоти (МС1); 2,0–4,0 мг/л 2,4-дихлорфеноксіцтової кислоти, 150 мг/л *l*-аспарагіну, 146 мг/л глютаміну (МС2). Для використання як експлантатів апікальних ділянок коріння заздалегідь вирощували 4–5-денні асептичні проростки пшениці на безгормональному середовищі МС в темряві при 25 ± 1 °С. Потім видаляли апікальні сегменти коріння завдовжки 1–1,5 см і переносили їх на середовище МС для індукції калусогенезу. У разі використання листових експлантатів вирощували асептичні проростки на безгормональному середовищі МС протягом 5–7 днів та в асептичних умовах з колеоптиля вичленяли первинний лист. Для культивування застосовували його базальну частину розміром 1–1,5 см. Експлантати вирощували при 26 °С в темряві протягом 10–14 діб. Після утворення первинного калюсу продовжували інкубування при освітленні 2 клк і 16-годинному фотоперіоді. Частоту індукції калусогенезу (у відсотках) визначали як відношення числа експлантатів, що утворили калус, до початкової кількості експлантатів. Для індукції морфогенезу калус, отриманий на різних експлантатах, переносили на регенераційне середовище МС, доповнене 2 мг/л 6-БАП і 1,0 мг/л індоліцтової кислоти.

Ліпіди з калусних клітин екстрагували сумішшю хлороформ-метанол-вода (1:2:0,8). Жирно-кислотний склад ліпідів калусних тканин вивчали методом газорідної хроматографії їхніх метилових ефірів [5, 11]. Для одержання метилових ефірів жирних кислот висушені ліпіди суспендували в 5 мл метанолу, що містив 1,5% H_2SO_4 . Метилування здійснювали в запаяних ампулах при 80 °С протягом 1 год. Метилові ефіри жирних кислот екстрагували сумішшю ефір-гексан (1:1). Проби перемішували та, після їхнього розшарування, відбирали верхню фракцію, яка містить метилові ефіри жирних кислот. Екстракцію здійснювали тричі. Одержані екстракти об'єднували і упарювали на вакуумному роторному випаровувачі.

Результати і обговорення

У досліджах ми використовували різні типи експлантатів для отримання первинного калюсу: зрілі зародки, апікальні ділянки асептичного коріння і листові експлантати. На всіх типах експлантатів формувався калус, але з різною частотою — від 9 до 100%. Зрілі зародки і апікальні ділянки асептичного коріння були ефективнішими експлантатами для отримання первинного калюсу в порівнянні з первинним листям. Частота індукції калусоутворення при використанні листових експлантатів була мінімальною і становила 9,2–24,2%. При цьому найвищий відсоток калусоутворення спостерігали на середовищі МС1. При формуванні первинного калюсу із зрілих зародків частота калусогенезу на середовищі МС1 була 100%, при цьому приріст калусної маси становив 410 мг, тоді як на середовищі МС2 — 198 мг. При використанні коріння як первинного експлантату максимальна частота калусогенезу становила 87%. Отже, тип експлантату визначає максимальні і мінімальні показники частоти калусогенезу.

За використання різних типів експлантатів встановлені відмінності в типах і швидкості формування первинного калюсу. Початок калюсогенезу при формуванні калюсних тканин з асептичного коріння відбувався найшвидше — на 2–5 добу з дня перенесення на середовище для культивування. За культивування насіння на поверхні живильного середовища протягом перших трьох днів спостерігали значне його набухання. На четвертий день культивування в районі щитка у 33% експлантатів відмічали початок калюсоутворення, а на 10 добу калюс утворювався у 100% експлантатів. Довше за все формувалася калюс з листових експлантатів — на 30–35 добу. Відмінності зафіксовані також за ступенем оводненості, щільності, кольору, наявності елементів диференціювання і прояву морфогенетичного потенціалу.

З асептичного коріння формувалася сильно оводнений рихлий майже прозорий злегка білуватий калюс (рис. 1). Із зрілих зародків — щільніший менш оводнений жовтуватий калюс (рис. 2), що характеризується наявністю елементів диференціації. Такого ж типу калюс — щільний і жовтуватий, формувалася при використанні в якості експлантатів первинних листків.

У подальших дослідженнях при перенесенні калюсних тканин, сформованих з різних експлантатів, на середовище для індукції морфогенезу встановлено відмінності в морфогенетичному потенціалі різних типів калюсу. Щільний жовтуватий морфогенетичний калюс, сформований із зрілих зародків, характеризувався регенераційною здатністю. На 10–15 добу культивування на середовищі для регенерації було відмічено формування проростків і коріння. Частота регенерації становила 65,9–75,0%. Морфогенез прозорого гомогенного рихлого калюсу, сформованого з асептичного коріння, відбувався лише по шляху інтенсивного формування коріння. Багатьма дослідниками відмічено, що такий тип морфогенезу не є регенераційно здатним, тобто надалі неможливе формування повноцінних фертильних рослин-регенерантів [3, 7, 10].

Наступним етапом нашої роботи було вивчення жирнокислотного складу ліпідів калюсних тканин пшениці сорту Рання 93. Ліпіди калюсних тканин пшениці характеризувалися наявністю жирних кислот з числом вуглецевих атомів від C_{15} до C_{24} . Серед них насичені (тетрадеканова, пентадеканова, гексадеканова, октадеканова, ейкозанова, докозанова, тетракозанова),



Рис. 1. Рихлий калюс з асептичного коріння

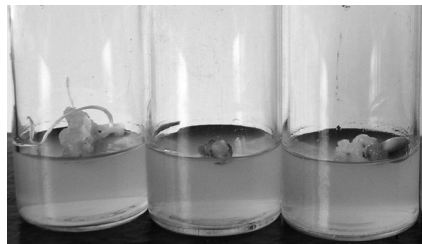


Рис. 2. Щільний, жовтуватий калюс із зрілих зародків

мононенасичені (гексадецена, *cis*-октадецена, *trans*-октадецена), диненасичені (9,12-октадекадієнова) жирні кислоти. В ліпідах калюсних клітин виявлені жирні кислоти переважно з парним числом вуглецевих атомів. Ліпіди характеризуються високим вмістом ненасичених кислот. Вміст мононенасичених жирних кислот становив 21,9%, диненасиченої кислоти — 43,7%. Серед мононенасичених кислот переважала *cis*-октадецена кислота (18,6%). Сумарний вміст насичених кислот становив 34,4%. Основною кислотою серед насичених є гексадеканова кислота — 27,7%, вміст інших кислот не перевищував 1,9%.

Висновки

Вид обраного експлантату визначає тип сформованого калюсу: зрілі зародки і листові експлантати формують компактний гетерогенний калюс, що володіє морфогенним потенціалом; асептичне коріння — дає початок рихлому гомогенному калюсу, не здатному до повноцінної регенерації. У ліпідах калюсної тканини пшениці сорту Рання 93 основними жирними кислотами є гексадеканова, 9,12-октадекадієнова та *cis*-октадецена.

Література

1. *Анапияев Б.Б.* Культура микроспор и гаплоидная биотехнология пшеницы.— Алматы: Гылым, 2001.— 220 с.
2. *Атанасов А.А.* Биотехнология в растениеводстве.— Новосибирск: Наука, 1993.— 242 с.
3. *Бавол А.В., Дубровная О.В., Лялько И.И.* Регенерация растений из различных типов экплантов мягкой пшеницы // Физиология и биохимия культ. растений.— 2008.— Т.40, №2.— С. 150–156.
4. *Бутенко Р.Г.* Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе.— М.: ФБК-ПРЕСС, 1999.— 160 с.
5. *Жеребило О.Е., Вишталюк Н.М.* Жирные кислоты общих липидов некоторых представителей рода других энтеробактерий // Микробиол. журн.— 1987.— 49, №6.— С. 83–85.
6. *Круглова Н.Н., Батыгина Т.Б., Горбунова В.Ю., Титова Г.Е., Сельдмирова О.А.* Эмбриологические основы андроклинии пшеницы.— М.: Наука, 2005.— 99 с.
7. *Круглова Н.Н., Зайнутдинова Э.М.* Андроклинийный каллус пшеницы в динамике развития: цитолого-гистологический анализ // Вестник Башкирского университета.— 2001.— №2 (1).— С. 137–141.
8. *Лутова Л.А.* Биотехнология высших растений.— СПб.: Изд-во Санкт-Петербургск. ун-та, 2003.— 227 с.
9. *Рахимбаев И.Р., Тивари Ш., Бишимбаева Н.К., Кушнарченко С.В.* Биотехнология зерновых культур. Алма-Ата: Гылым, 1992.— 240 с.
10. *Чеченева Т.Н.* Изменчивость злаков в культуре *in vitro* и в процессе регенерации растений // Физиология и биохимия культ. растений.— 2006.— Т.38, №2.— С. 163–175.
11. *Brian B.L., Gardner E.W.* Preparation of bacterial fatty acid methyl esters for rapid characterization by gasliquid chromatography // Appl. Microbiol.— 1967.— 15, №6.— P. 1499–1500.
12. *Murasige T., Scoog F.* A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // Physiol. plant.— 1962.— 15.— P. 473–497.

Резюме

Досліджено процеси індукції калусогенезу ярої пшениці (*Triticum aestivum* L.) сорту Рання 93. Показано, що ефективність процесу та тип калусної тканини обумовлені обраним експлантатом. Встановлено, що морфогенний потенціал проявляють калуси зі зрілих зародків та листових експлантатів. Показано, що в ліпідах калусних тканин основними жирними кислотами є гексадеканова, 9,12-октадеканова, *cis*-октадеценева.

Исследованы процессы индукции каллусогенеза ярой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Ранняя 93. Показано, что эффективность процесса и тип каллусной ткани обусловлены выбранным эксплантатом. Установлено, что морфогенетическим потенциалом обладают каллусы из зрелых зародышей и листовых эксплантатов. Показано, что в липидах каллусных тканей главными жирными кислотами были гексадекановая, 9,12-октадекадиеновая, *cis*-октадеценевая.

The processes of callusogenesis induction of spring wheat *Triticum aestivum* L., cultivar Rannja 93 were investigated. It was shown that callusogenesis and the type of callus tissue were caused by the type of explants. It was established that the callus from mature germs and leaf explants had morphogenetic potential. It is shown, that in callus tissue lipids the main fat acids were hexadecanoic, 9,12-octadecadienoic, *cis*-octadecenoic.

КОЧУБЕЙ Т.О., ШВЕНЬ О.О, АНДРІЄНКО В.І., КАРПОВА І.С, ЛУКАШ Л.Л.
*Інститут молекулярної біології та генетики НАН України,
Україна, 03143, Київ, вул. Заболотного, 150, E-mail: lukash@imbg.org.ua*

ІНДУКЦІЯ АПОПТИЧНИХ ЗМІН У КУЛЬТУРАХ КЛІТИН ССАВЦІВ СУМАРНИМ ПРЕПАРАТОМ ФГА ТА ЙОГО ІЗОФОРМАМИ

Відомо, що вуглевод-білкові взаємодії лежать у основі багатьох біологічних процесів і саме тому лектини широко використовуються для вирішення цілого ряду фармакологічних, біотехнологічних, гістологічних та інших питань біології. Широке застосування лектинів на практиці спонукає і розвиток наукових досліджень у цій галузі. Актуальними стають роботи з вивчення впливу цієї групи білків на мутаційний процес та репарацію, проліферацію та апоптоз [1–2].

Показано, що деякі лектини здатні виступати не лише у якості мітогенів, а й мають цитотоксичну активність. Раніше нами було показано здатність лектинів рослинного та тваринного походження дозозалежно впливати на проліферацію клітин ссавців та індукувати апоптичні зміни [3]. І хоча для деяких лектинів описані лектинасоційовані ензиматичні активності [4], завдяки яким вони здатні безпосередньо взаємодіяти з макромолекулами у клітині, більшість з них все ж таки реалізує свою активність опосередковано, через взаємодію з вуглеводними детермінантами на поверхні клітинної мембрани. Тож вуглеводна специфічність лектину, його молекулярна будова

є вирішальними для реалізації мітогенної чи цитотоксичної активності цієї групи білків.

Метою даної роботи було провести порівняльні дослідження впливу лектину квасолі звичайної (*Phaseolus vulgaris*), сумарного препарату та його окремих ізоформ, на частоту апоптичних клітин у культурі клітин ссавців. Виявити залежність їхньої цитотоксичної активності від молекулярної будови сумарного препарату лектину ФГА та його окремих ізоформ.

Матеріали та методи

У своїх дослідженнях як модельні тест-системи використовували культуру клітин раку гортані людини Нер-2 та спонтаннотрансформовану культуру клітин китайського хом'ячка *Bllid-ii-FAF28Cl237-8GlutsIII*. Клітини культивували в стандартному ростовому середовищі Ігла (MEM, Sigma, USA) з 5% ембріональної сироватки великої рогатої худоби (Sigma, USA) та антибіотиками.

Кількісне визначення життєздатності клітин та апоптозного індексу проводилось за допомогою фарбників акридинового помаранчового та етидидуму броміду, котрі готували згідно методики [5]. Клітини обробляли досліджуваним лектином у концентрації 100 мкг/мл протягом 4 годин. При дослідженні апоптозу як позитивний контроль використовували MNNG у концентрації 5 мкг/мл, обробка тривала 1 годину. Препарати аналізували, одразу після обробки білком, під мікроскопом зі збільшенням 90х, з комбінацією фільтрів, що підходять для збудження флуоресценції. Аналізували три типи клітин: живі клітини — з нормальним ядром, що мали яскраво-зелений хроматин з організованою структурою, клітини на ранній стадії апоптозу — яскраво-зелений або жовтий хроматин, який сильно конденсований або фрагментований, клітини на пізній стадії апоптозу — яскраво-помаранчевий хроматин (рис. 1). За кількісними даними вираховували апоптозний індекс [5].

Досліджувані агенти — комерційні препарати лектинів квасолі звичайної *Phaseolus vulgaris* — фітогемаглютинін ФГА (“ЛЕКТИНОТЕСТ”, Львів). Ізолектини ФГА-Е еритроцитарна форма та ФГА-Л лейкоцитарна форма за своєю структурою є тетрамерами, що складаються з певних субодиниць. Сумарний препарат ФГА-Р містить суміш різних ізолектинів [6].

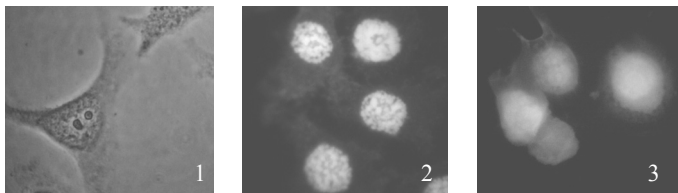


Рис. 1. Індукція апоптозних змін у культурі клітин раку гортані Нер2:

1 — живі клітини (яскраво-зелений хроматин з організованою структурою); 2 — клітини на ранній стадії апоптозу (яскраво-зелений або жовтий хроматин, який сильно конденсований або фрагментований); 3 — клітини на пізній стадії апоптозу (яскраво-помаранчевий хроматин). Клітини обробляли лейкоцитарною ізоформою ФГА у концентрації 100 мкг/мл

Результати та обговорення

При дослідженні впливу лектинів на частоту апоптичних змін у культурі клітин китайського хом'ячка нами було показано, що і сумарний препарат ФГА і його окремі ізоформи індукували підвищення частоти апоптичних змін у культурі клітин на рівні з МННГ (рис. 2.). Однак, нами були показані і певні відмінності дії сумарного препарату ФГА та ізоформ, а саме, після обробки ФГА-Р відсоток клітин на стадії раннього та пізнього апоптозу був приблизно однаковим (49,34% та 47,53% відповідно), тоді як після обробки ізоформами ФГА-Л та ФГА-Е спостерігали переважно клітини на стадії пізнього апоптозу. Причому більш активно у цьому відношенні виявилась ізоформа еритроцитарна — частота клітин на стадії пізнього апоптозу становила 91,61%, тоді як після обробки ізоформою лейкоцитарною — 84,3%. Варто зауважити, що частота клітин на пізній стадії апоптозу після обробки ізоформами ФГА була статистично достовірно вищою, ніж після обробки МННГ. Мабуть, такі відмінності залежать від різних механізмів дії білків та хімічного агенту: відомо, що МННГ — алкілувальний агент і механізм його дії — це індукція аддуктів ДНК, тоді як лектини впливають опосередковано, активуючі ті чи інші сигнально-регуляторні шляхи у клітині.

При дослідженні впливу сумарного препарату ФГА та ізоформ ФГА-Е і ФГА-Л на частоту апоптозних клітин у культурі раку гортані Нер2 нами було показано, що порівняно з попередньою тест-системою, лектини діяли дещо інакше (рис. 3). Так при дії сумарного препарату ФГА у концентрації 100 мкг/мл відсоток живих клітин був майже у втричі вищим, ніж у культурі клітин китайського хом'ячка (14,28% та 3,12% відповідно). Варто зауважити,

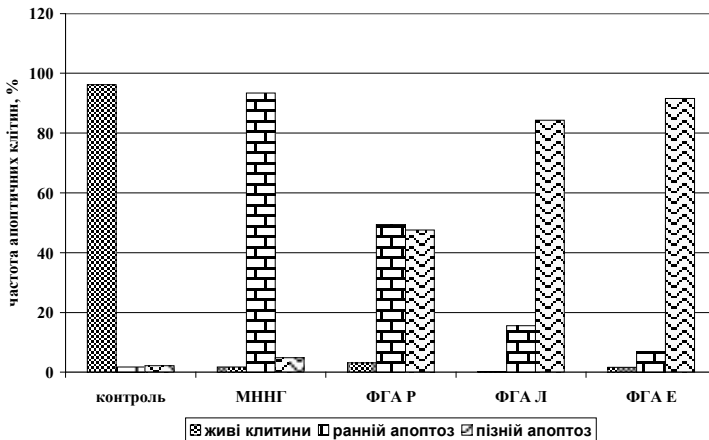


Рис. 2. Частота апоптозних клітин у культурі китайського хом'ячка після обробки сумарним препаратом ФГА та його ізоформами у концентрації 100 мкг/мл: ФГА-Р — сумарний препарат; ФГА-Л — лейкоцитарна ізоформа; ФГА-Е — еритроцитарна ізоформа

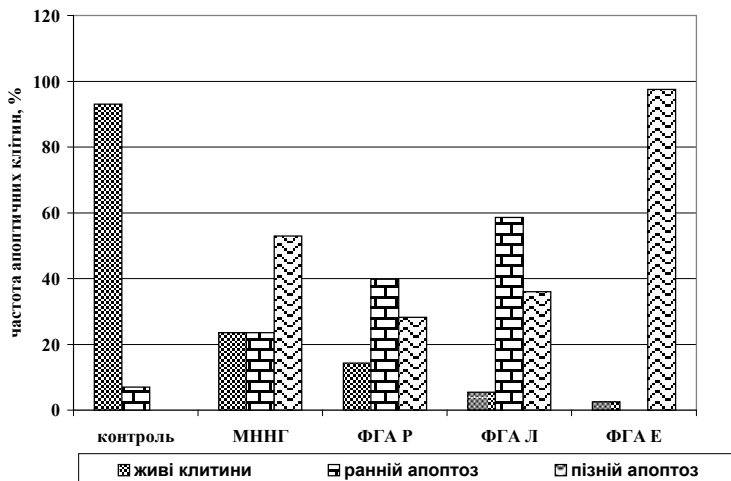


Рис. 3. Частота апоптотичних клітин у культурі Нер2 після обробки сумарним препаратом ФГА та його ізоформами у концентрації 100 мкг/мл: ФГА-Р — сумарний препарат; ФГА-Л — лейкоцитарна ізоформа; ФГА Е — еритроцитарна ізоформа

що культура клітин раку гортані людини виявилась менш чутливою ніж клітини китайського хомячка і до дії МННГ (23,55% і 1,75% відповідно).

Порівнюючи між собою дію сумарного препарату ФГА-Р та його ізолектинів, можна сказати, що усі вони статистично достовірно індукували підвищення частоти апоптотичних клітин на рівні з МННГ. Однак, більш активним у цьому відношенні виявився ізолектин еритроцитарний — спостерігали 97,5% апоптотичних клітин. Найменший відсоток апоптотичних клітин був після обробки сумарним препаратом ФГА-Р — 68,5%.

Також, нами були показані відмінності у співвідношенні клітин на стадії раннього та пізнього апоптозу після дії сумарного препарату та його ізолектинів. Після обробки сумарним препаратом лектину на ранній стадії апоптозу спостерігали майже 40% клітин, тоді як у пізньому апоптозі перебувало 28,2% клітин, порівняно з попередньою тест-системою, де співвідношення клітин на стадії раннього та пізнього апоптозу було приблизно однаковим (рис. 2).

Після обробки клітин лейкоцитарною ізоформою ФГА, також переважали клітини на ранній стадії апоптозу — 58,55%, на відміну від двох попередніх препаратів, після дії ізолектину еритроцитарного усі клітини перебували на пізній стадії апоптозу (97,5%).

Складається таке враження, що здатність досліджених нами препаратів ФГА впливати на частоту апоптозу у культурі клітин залежить не лише від їхньої молекулярної будови, а й від типу клітин, а саме їхнього “глікокоду”.

Висновки

Отже нами було показано, що і сумарний препарат ФГА і його окремі ізоформи у дослідженій нами концентрації статистично достовірно підвищують частоту апоптозних клітин на рівні з МННГ. Показані певні відмінності дії препаратів, а саме окремі субодиниці діють не однаково з сумарним препаратом. Висунуто припущення, що різниця активності сумарного препарату ФГА та його ізолектинів у різних тест-системах залежить як від типу клітин, так і від структури молекули лектину.

Література

1. Лукаш, Л.Л., Карпова И.С., Мирошниченко О.С., Тихонова Т.Н., Лыло В.В., Манько В.Г., Сухорада Е.М., Гольнская Е.Л. Влияние лектина соцветий *Sambucus nigra* на спонтанный и индуцированный алкилирующим агентом мутагенез в соматических клетках млекопитающих // Цитология и генетика.— 1997.— 31, №5.— С. 52–60.
2. Карпова И.С., Корецька Н.В. Дослідження модифікуючого впливу лектинів на токсичність і мутагенність іонів Ni(II) в культурі *Bacillus subtilis* // Біополімери і клітина.— 2003.— 19, №3.— С. 224–230.
3. Коваленко О.О., Лукаш Л.Л. Индукция апоптозу у популяціях клітин ссавців *in vitro* під впливом лектинів // Цитология и генетика.— 2007.— Т.41, №5.— С. 48–53.
4. Willy J. Peumans, Qiang Hao, and Els J. Van Damme. Ribosome-inactivating proteins from plants: more than RNA N-glycosidases? // The FASEB Journal.— 2001.— 15.— P. 1493–1506
5. McGanon A.J., Martin S.J., Bissonnette R.P., Mahboudi A., Mogil R.J., Nishio-ka W.K., Green D.R. The end of the (cell) line: methods for the study of apoptosis *in vitro* // Methods in cell biology, vol.46, "Cell Death". Ed. Schwartz L.M., Osborne B.A. Acad. Pres Inc, 1995, p. 172–173.
6. Miller I.B., Hsu R., Heinrikson R., Yachnin S. Extensive homology between the subunits of the phytohemagglutinin mitogenic protein derived from *Phaseolus vulgaris* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.— 1975.— V.72.— P. 1388–1391.

Резюме

Показано принципово різний вплив на індукцію апоптозу у культурі клітин китайського хом'ячка та раку гортані людини сумарним препаратом ФГА та його ізоформами. У дослідженій нами концентрації усі білки достовірно підвищували частоту апоптозних клітин на рівні з МННГ. Також виявлено певні відмінності активності ізолектинів та ФГА.

Показано принципиально различное влияние на индукцию апоптоза в культуре клеток китайского хомячка и рака гортани человека суммарным препаратом ФГА и его изоформами. В исследованной нами концентрации все белки достоверно повышали частоту апоптоза в клетках на уровне с МННГ. Также выявлены определенные различия активности изолектинов и ФГА Р.

It was shown different effects on the apoptosis induction in the culture of Chinese hamster and human cancer cells by total preparation PHA and its isoforms. In studied concentration all proteins increased the frequency of apoptosis cells comparable with MNNH. Also revealed some differences of isolectins and PHA P activity.

КРИНИЦЫНА А.А., УСПЕНСКАЯ М.С., МУРАШЕВ В.В.

*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Россия,
119991, Москва, Ленинские горы, дом 1, стр. 12, e-mail: vvtur@hotmail.ru*

ТЕХНОЛОГИЯ РАЗМНОЖЕНИЯ *IN VITRO* НЕКОТОРЫХ СОРТОВ *PAEONIA SUFFRUTICOSA* ANDREWS. СЕЛЕКЦИИ БОТСАДА МГУ

В Россию древовидные пионы попали только в 1863 году, в течение 80 лет их выращивали в горшечной культуре в холодных оранжереях ботанического сада БИН РАН (Санкт-Петербург) и только с 1939 года были предприняты попытки их возделывания в открытом грунте. В ботаническом саду Московского университета на проспекте Мира с 1951 года А.А. Сосновец стала заниматься интродукцией и селекцией древовидных пионов, а с 1981 года эта работа была продолжена М.С. Успенской на основной территории сада на Воробьевых горах.

В мире сегодня зарегистрировано около 500 сортов древовидных пионов, из них 30 выведено в Ботаническом саду МГУ. Основным направлением селекционных работ у нас является привлечение при создании новых сортов диких видов, более устойчивых к холоду, засухе и болезням, вызываемыми фитопатогенными грибами (Успенская, 2007).

Массовому внедрению древовидных пионов в озеленение препятствуют медленное прорастание семян (как правило, семена прорастают на второй или третий год) и очень медленный рост сеянцев в первые годы жизни. Древовидные пионы, в отличие от травянистых, значительно сложнее размножаются вегетативным путем. Известны такие способы, как: 1) деление куста (при умелом делении можно получить максимум 3–4 деленки); 2) прививка на корни травянистых пионов. При размножении прививкой требуется большое количество корней травянистых пионов. В связи с этим необходимо иметь коллекцию травянистых пионов. С одного куста можно в первый год получить 9–10 прививок, которые дают хорошую корневую систему только на третий или четвертый год, после чего могут поступать для реализации; 3) метод микроклонального размножения в стерильных условиях, что значительно облегчает процедуру размножения и позволяет на выходе получать достаточное количество генетически однородного материала. В настоящее время разработаны схемы микроклонального размножения древовидного пиона многих сортов европейского и китайского происхождения (Veruto, Cuirig, 2007). Однако оказалось, что для каждого нового сорта этой культуры необходимо уточнять и подбирать свои оптимальные условия размножения в культуре *in vitro*.

В настоящее время не существует единой классификации методов микроклонального размножения растений. Многие исследователи в зависимости от морфогенетических процессов выделяли от трех до шести методов (Катаева, Бутенко, 1983; Носов, 1991). Выбор метода размножения зависит от доступности того или другого вида растительного материала: семян, почек

или частей растений, не имеющих меристематических тканей. Однако если целью работы является сохранение генофонда, то следует избегать методов, при которых размножение растений идет через формирование каллуса, поскольку при этом наблюдается самоклональная изменчивость получаемых растений.

С конца 80-х годов на базе лаборатории биологии развития растений кафедры высших растений биологического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова проводятся исследования по изучению морфогенеза в культуре растительных клеток, тканей и органов *in vitro*, травянистых и древесных представителей различных таксономических групп. Разработанные нами методики микроклонального размножения позволяют получать в короткие сроки оздоровленный посадочный материал редких и ценных генотипов растений для реинтродукции в природные места распространения, а так же для использования в озеленении населенных пунктов.

Целью нашей работы являлось разработка метода размножения в культуре *in vitro* древовидных пионов некоторых сортов селекции ботанического сада МГУ им. М.В. Ломоносова. Для этого были поставлены следующие задачи: изучить регенерационные способности почек в зависимости от их местоположения на побеге и времени взятия материала, подобрать оптимальное сочетание гормональных добавок для нормальной регенерации с последующим укоренением полученных растений.

Для микроклонального размножения пиона древовидного нами был использован самый распространенный метод — активизация деятельности пазушных меристем. При этом процесс размножения *in vitro* различных сортов пионов имеет ту же последовательность операций, что и у остальных культур: введение в стерильную культуру, индукция морфогенеза, размножение, укоренение и адаптация полученных растений к условиям *in vivo*.

В качестве эксплантов использовали апикальные и боковые почки с одревесневших 4–5-летних побегов сортов “Владимир Новиков”, “Коралл”, “Куинджи” и “Николай Вавилов”. Побег с почками отделяли от растений в самом начале периода вегетации, во время активного цветения растений, плодоношения и после полного опадания листьев и во время полного физиологического покоя.

Срезанные с куста побеги с почками предварительно тщательно промывали в проточной воде хозяйственным мылом. Стерилизацию отделенных почек проводили путем погружения в 30% раствор гипохлорита натрия на 15 минут, далее в 10% раствор перекиси водорода в 70% спирте, где инкубировали 20 секунд, а затем промывали трижды по 10 минут стерильной дистиллированной водой. Очищенные от чешуй зачаточные побеги высаживали в ламинаре на агаризированную (6 г/л) стерильную (автоклавированную) среду (pH=6) для индукции морфогенеза WPM (Woody Plant Medium [Owen, Miller, 1992]) с удвоенной концентрацией солей кальция и добавлением 50 мг/л лимонной кислоты, 100 мг/л аскорбиновой кислоты, 1 мг/л 6-бензи-

ламинопурина (БАП) и 0,2 мг/л 3-индолил-уксусной (ИУК) или 4-[3-индолил]-масляной (ИМК) кислот. Пересадка на свежую среду того же состава культивируемых эксплантов производилась каждые 3 недели. При появлении черного экссудата в питательной среде первое пересаживание эксплантов производили через сутки.

Отделение развившихся из аксиллярных почек побегов — первичных регенерантов осуществляли при формировании ими 2–4 полностью развившихся листьев (через 30–40 дней). Размер отделяемых побегов составлял 0,5–1 см. Первичные регенеранты отсаживали по 3 в один стакан и культивировали на среде для индукции морфогенеза с соответствующими гормональными добавками до разворачивания 3–5 листьев — от 2 до 5 недель. Обновление среды проводили каждые 3 недели. На протяжении всего этого срока обеспечивали условия необходимые для нормального роста и развития культиваров: температура 21 ± 2 °С, освещенность 7000 люкс, фотопериод 16 ч день, 8 ч ночь.

Укоренение полученных черенков с 3–4 нормально развитыми листьями, проводили в два этапа. Сначала осуществляли индукцию корнеобразования, после чего в течение довольно длительного времени проходило непосредственно формирование и развитие корней. Для индукции корнеобразования использовали модифицированную питательную среду WPM с уменьшенной в 2 раза концентрацией макросолей с добавлением ИМК в концентрации 1 мг/л, 2 мг/л и 4 мг/л и 4% сахарозой. Стаканы с укореняемыми черенками на 14 дней помещали в темноту при температуре 18 °С. Рост и развитие корней протекал на среде WPM без гормональных добавок и с добавлением 0,3% активированного угля и 3% ахарозы. Во время культивирования поддерживалась пониженная интенсивность освещения (4000–5000 люкс) и температура 18 °С. При этом развитие корней начиналось через 5–12 недель.

Перед переводом растений на почвенную смесь корневую систему предварительно освобождали от агаризованной среды. Нами было предложено в качестве субстрата использовать смесь: 50% торф, 25% кварцевого стерильного песка, 25% стерильного керамзита. В качестве комплексного удобрения использовали раствор макро- и микросолей для среды WPM. Кварцевый песок стерилизовали сухим жаром в течение 2-х часов при 130 °С, керамзит промывали в проточной воде и стерилизовали кипячением в дистиллированной воде в течение 15 минут. Вазоны, с высаженными растениями, помещали в климатическую камеру с влажностью не менее 90%, но не допускать застоя воды в поддоне.

В процессе работы было показано, что оптимальным материалом для размножения древовидных пионов в культуре *in vitro* являются крупные (от 25 мм в длину и более) и средние (10–20 мм в длину) апикальные и боковые почки. Причем для сортов, при получении которых использовали *P. suffruticosa* (“Николай Вавилов” и “Владимир Новиков”) с акросимподиальным нарастанием побегов (Успенская, 1981) лучшая регенерация наблю-

далась у апикальных или ближайших к ним почек. Для сортов “Куинджи” и “Коралл”, при получении которых использовали *P. lutea* с мезосимподиальным типом нарастания побегов (Успенская, 1981), лучшими эксплантами оказались почки указанных размеров, взятых со средней части побега.

Кроме физиологического возраста исходного экспланта, который имеет несомненное значение в проявлении способности к морфогенезу, не менее значимым фактором является время (сезон) его изоляции от материнского растения. По нашим наблюдениям в условиях центральной полосы России почки размножаемых нами сортов оптимально отделять от материнского растения в самом начале периода вегетации — в конце марта, начале апреля. Так ткани и органы, изолированные в момент вегетации, обладают более высокой чувствительностью к составу питательной среды и способностью образовывать адвентивные почки, формировать побеги и укореняться по сравнению с таковыми, изолированными в период глубокого и вынужденного покоя.

Для нормальной регенерации сортов “Владимир Новиков” и “Куинджи” оказалось необходимым и достаточным присутствие в среде ИУК (0,2 мг/л) и БАП (1 мг/л), тогда как для сортов “Николай Вавилов” и “Коралл” требуется среда с добавлением ИМК (0,2 мг/л) и БАП (1 мг/л). Для размножения китайских сортов древовидных пионов так же используют ИУК (Beruto, Curir, 2007), и α -нафтилуксусную кислоту (НУК) (Cerna et al., 2001).

Индукция и последующее развитие корней, а так же их количество у регенеранта зависит от определенных концентраций ауксинов в среде. Для индукции корнеобразования и последующего укоренения регенерантов сортов китайской селекции используют ИМК в концентрации 15 мг/л (Bouza et al., 1994). Уменьшение концентрации ИМК до 2 мг/л при размножении сортов отечественной селекции привело к такому же выходу укорененных растений (около 60%). Использование при индукции корнеобразования меньшей концентрации ауксина не вызывает необходимого эффекта. Увеличение концентрации ИМК в 2 раза не приводит к увеличению выхода укорененных растений ни у одного изученного нами сорта.

Полученные нами результаты и данные, доступные в открытой печати еще раз подтверждают необходимость оптимизации гормональных добавок, применяемых в средах для регенерации и укоренения для каждого нового сорта.

Таким образом, применение методов микрклонального размножения, позволяющих сильно сократить трудовые и временные затраты на получение посадочного материала, в том числе и декоративных древесных культур, невозможно без их оптимизации для каждого сорта, подвида и вида. Сочетание огромной теоретической базы знаний по классической морфологии кафедры высших растений и новых возможностей, предоставляемых современными научными технологиями, позволяют высококвалифицированному коллективу лаборатории разрабатывать экономически рентабельные экс-

пресс методы размножения редких, исчезающих и ценных для озеленения населенных пунктов видов и сортов растений на базе уникальной коллекции Ботанического сада МГУ имени М.В. Ломоносова.

Литература

1. Катаева Н.В., Бутенко Р.Г. Клональное микроразмножение растений.— М.— 1983.— 96 с.

2. Криницина А.А., Мурашев В.В., Ратнопорт А.В., Сперанская А.С., Успенская М.С., Чурикова О.А. Микроклональное размножение декоративных культур. Пион древовидный (*Paeonia suffruticosa*). (Учебно-методическое пособие).— М.— 2008.— 40 с.

3. Носов А.М. Регуляция синтеза вторичных соединений в культуре клеток растений // Биология культивируемых клеток и биотехнология растений.— М.: Наука.— 1991.— С. 5–20.

4. Успенская М.С. Пионы (Род *Paeonia* L.) флоры СССР // Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук.— М.: изд-во Моск. ун-та.— 1981.— 22 с.

5. Успенская М.С. Древовидные пионы: выбор, посадка, уход.— М.: “Фитон+”.— 2007.— 32 с.

6. Beruto M., Curir P. In vitro culture of tree peony through axillary budding / Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits.— Springer.— 2007.— P. 477–497.

7. Bouza L., Jacques M., Sotta B., Miginiac E. Relations between auxin and cytokinin contents and in vitro rooting of tree Peony (*Paeonia suffruticosa* Andr.) / Plant Growth Regulation.— 1994.— 15.— P. 69–73.

8. Owen H.R., Miller A.R. An examination and correction of plant tissue culture basal medium formulations / Plant Cell, Tissue and Organ Culture.— 1992.— 28.— P. 147–150.

9. Cerna K., Dedicova B., Borbelyova D. Micropropagation of *Paeonia arborea* Donn., syn. *P. suffruticosa* Andr. / Acta fytotechnica et zootechnica.— 2001.— 4, Special Number.— P. 51–54.

Резюме

Созданная ботсадом МГУ уникальная коллекция растений и накопленный за много лет теоретический потенциал коллективов ботанического сада и кафедры высших растений, позволяют в настоящее время перейти к разработке конкретных методик интенсивного размножения видов растений, ценных и актуальных для озеленения.

Створена ботанічним садом Московського університету унікальна колекція рослин і накопичений за багато років теоретичний потенціал колективу кафедри вищих рослин, дозволяють у наш час перейти до розробки конкретних методик інтенсивного розмноження видів рослин, цінних і актуальних для озеленення.

The botanical garden of the Moscow State University has created unique a collection of plants. Chairs of the higher plants were saved up for many years by enormous theoretical potential. Now it allows developing concrete techniques of intensive reproduction of kinds of the plants valuable and actual for gardening.

ЛЯХ Е.М.

Центральный сибирский ботанический сад СО РАН,
Россия, 630090, Новосибирск, ул.Золотодолинская, 101,
e-mail: syringa_l@rambler.ru

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ КЛОНАЛЬНОГО МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ СОРТОВ СИРЕНИ ОБЫКНОВЕННОЙ

Озеленение приобретает все большее значение в формировании современного облика городов и индустриального ландшафта. В связи с этим повышаются эстетические требования к подбору ассортимента растений и их размещению на озеленяемых объектах. Важное место здесь принадлежит сирени, одному из самых любимых и распространенных кустарников. Сирень обыкновенная (*Syringa vulgaris* L.) является очень популярным декоративным кустарником, часто используемым в озеленении городов Сибири, многие сорта которой хорошо растут и цветут.

В Центральном сибирском ботаническом саду Сибирского отделения Российской Академии наук, в лаборатории дендрологии с 1986 года автором были начаты работы с зелеными (полуодревесневшими) черенками сортовой сирени для создания коллекции с последующим отбором наиболее перспективных сортов для резко-континентального климата лесостепной зоны Западной Сибири и введения их в озеленение сибирских городов. За весь период работы с сортовыми сиренями автором было испытано 116 сортов зарубежной и отечественной селекции. В настоящее время коллекция сиреней ЦСБС насчитывает 33 сорта, выделенных как наиболее устойчивых к условиям лесостепной зоны Западной Сибири [1]. Сорта сирени традиционно размножали черенкованием. Однако существуют трудности в размножении наиболее интересных сортов *Syringa vulgaris*, не все сорта успешно размножаются вегетативными способами. Для размножения и сохранения таких сортов требуется разработать специальные условия — это размножение в условиях *in vitro*. Массовое размножение ряда сортов *in vitro* является более успешным и менее затратным, чем размножение растений традиционными методами.

Материалы и методы

Работа проводилась в лаборатории культуры тканей Ботанического сада Лонгвуда (Longwood Gardens, Pennsylvania, USA) под руководством доктора Джима Харбаджа (Dr. Jim Harbage, Research and Production Division Leader, Longwood Gardens). Исходный материал для исследований получали из десятилетних растений разных сортов сирени обыкновенной, растущих в экспозиции открытого грунта Лонгвуда. Для выяснения влияния генотипа исходного растения на коэффициент размножения в культуре *in vitro* было исследовано четыре модельных сорта: “Мадам Лемуан” (‘Madam Lemoine’), “Людвиг Шпет” (‘Ludwig Spaeth’), “Монж” (‘Monge’), “Капитан Бальтэ” (‘Captain Baltet’).

В основу методики были положены общепринятые, классические приемы работы с культурами изолированных тканей и органов растений [2]. В экспериментальной работе использовались различные ткани и органы (апексы, боковые почки, верхушечная меристема). По литературным данным оптимальное время размножения сирени — период цветения: с мая по начало июня в зависимости от погодных условий [3]. Из зеленых годичных побегов выделялись небольшие части побега (1–1,5 см) с двумя боковыми почками и апексы. Затем экспланты помещались для стерилизации в 20%-й раствор “Chlorax” на 20 минут и промывались в большом количестве дистиллированной стерильной воды. Стерильные экспланты помещали в пробирки на питательную среду, содержащую минеральные соли по МС [4] с витаминами: никотиновая кислота — 1 мг/л, пиридоксин HCl — 1 мг/л, тиамин HCl — 1 мг/л, сахароза — 30 г, агар — 7 г, с ИУК и БАП в различных концентрациях.

Результаты и обсуждение

Из работ многих авторов известно, что на процессы успешного побегообразования сиреней влияет большое количество условий [5, 6]. Важное значение имеют такие факторы как тип экспланта, оптимальные сроки взятия экспланта, генотип растения, использование различных комбинаций фитогормонов в питательных средах.

Первым шагом работы был выбор типа эксплантов и времени начала микроразмножения. В июне мы подготовили апексы и пазушные почки четырех сортов сирени обыкновенной и поместили на питательную среду. Данные эксперимента анализировались через 5, 7 и 9 дней. Результат первого эксперимента был неудовлетворительный. Несмотря на обработку хлорсодержащим раствором, наблюдалось массовое заражение эксплантов грибами и бактериями. Доля незагрязненных эксплантов через 5 дней эксперимента составляла 27,5% (сорт “Людвиг Шпет”), 10% (“Мадам Лемуан”), 12,5% (“Монж”), 7,5% (“Капитан Бальтэ”). Через 7 дней оставалось 20% только сорта “Людвиг Шпет”, а через 9 дней — 5%.

Через 3 недели мы повторили эксперимент в июле. Но, учитывая результаты предыдущего эксперимента, мы изменили тип экспланта на культуру меристем, что означает асептическое выращивание на питательной среде изолированного из апекса или пазушной почки побега конуса нарастания с одним или двумя листовыми примордиями [2].

В задачу этого эксперимента входило изучение возможности использовать меристему для размножения сортов сирени. Как и в первом эксперименте апексы и пазушные почки также были обработаны в 15% растворе “Chlorax” 15 минут. Используя световой микроскоп, мы подготовили из стерилизованного материала экспланты меристемы размером 0,5–1,0 мм. В результате доля развившихся побегов была — 97–99% и не было отмечено ни одного образца всех четырех сортов зараженного грибами или бактериями. Через 3 недели мы наблюдали в пробирках что регенеранты представляют собой укороченные побеги 3–5 мм с сформировавшимися листьям либо

выраженные побеги 5–7 мм из двух-трех междоузлий. Размеры и количество листьев варьировало в зависимости от сорта. Большее число регенерантов с более сформированным побегом (5–7 мм) и более крупными листьями (13–15 мм и до 33 мм) было у сорта “Людвиг Шпет”. Остальные сорта “Капитан Бальтэ”, “Мадам Лемуан”, “Монж” показывали такие результаты: как только укороченные побеги 2–3 мм, листья 6–12 мм, до 22 мм.

В октябре мы также повторили эксперимент с использованием меристемы на тех же 4-х сортах “Людвиг Шпет”, “Мадам Лемуан”, “Монж”, “Капитан Бальтэ”. Так же как и в июле, доля развившихся регенерантов была очень высокая — 97–99%, и они были также не заражены. Через 3 недели наблюдались хорошо развитые регенеранты с листьями и побегами.

Выводы

Проведенные исследования показали возможность успешного размножения четырех сортов сирени обыкновенной *in vitro*. Высокие результаты были получены при размножении с использованием меристемы в качестве первичного экспланта. Выбор в качестве первичных эксплантов апексов и пазушных почек показал менее успешные результаты размножения по четырем выбранным сортам. Сортвые особенности оказывают существенное влияние как на регенерационную способность, так и на коэффициент размножения. Наилучшие возможности побегообразования *in vitro* показал сорт “Людвиг Шпет”. Важным преимуществом выбора меристемы в качестве эксплантов было то, что работа проводилась с растениями, которые росли в условиях открытого грунта, а не как в большинстве работ, где работа велась с растениями из теплиц. Такие возможности увеличивают календарные сроки успешного размножения на весь вегенационный период, что является очень важным условием клонального микроразмножения сортов сирени обыкновенной для получения посадочного материала.

Литература

1. Бакулин В.Т., Банаев Е.В., Встовская Т.Н., Киселева Т.Н., Коропачинский И.Ю., Лаптева Н.П., Лоскутов Р.И., Лях Е.М., Потемкин О.Н., Чиндяева Л.Н. Древесные растения для озеленения Новосибирска. — Новосибирск. — 2008. — С. 263–267.
2. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе: Учеб. Пособие. — М. — 1999. — 160 с.
3. Tomson S., Galeniece A., Akere A., Priede G., Zira L. *In vitro* propagation of *Syringa vulgaris* L. cultivars. — Biologija. — 2007. — Vol. 53. — N2. — P. 28–31.
4. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plantarum*. — 1962. — 15: 473–497.
5. Hildebrandt V., Harney P. *In vitro* propagation *Syringa vulgaris* “Vesper”. *HortScience*. — 1983. — 18(4): 432–434.
6. Einset J., Alexander III J. Multiplication of *Syringa* species and cultivars in tissue culture. *Proc. Inter. Plant Prop. Soc.* — 1984. — 34: 628–636.

Резюме

Приводятся данные об особенностях размножения сортов сирени в условиях *in vitro*. Выбор верхушечной меристемы в качестве экспланта дает хорошие резуль-

таты, увеличивает регенерационную способность и коэффициент размножения и позволяет получить чистый материал. При этом увеличивается время микроразмножения в течение всего вегетационного периода.

In article there are the data about features of reproduction of lilac cultivars in conditions *in vitro*. The choice of meristem gives good results for increases factor of reproduction and allows to receive a pure material. Time of micropropagation increases during all vegetative period thus.

МАТВЕЕВА Н.А., КВАСКО Е.Ю.

Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины, Украина, 03680, Киев, ул. Заболотного 148, e-mail: joyna56@gmail.com

ВЛИЯНИЕ СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ НА СОДЕРЖАНИЕ ИНУЛИНА В КОРНЯХ ЦИКОРИЯ *CICHORIUM INTYBUS L.*

Инулин ($C_6H_{10}O_5$)_n представляет собой запасной полисахарид, молекула которого состоит из 22–60 молекул фруктозы, соединенных между собой β-1,2-глюкозидными связями, и терминальной молекулы глюкозы [1]. Инулин найден во многих растениях, в том числе, цикории [2], экстракты которого обладают противораковыми свойствами [3], являются гепатопротекторным, противодиабетическим, притивозвненным, противовоспалительным средством [4–6]. Инулин может выполнять функцию сорбента, связывая и выводя из организма токсичные вещества [7], а также является пребиотиком, т.е. способствует росту полезной кишечной микрофлоры, в частности, лакто- и бифидобактерий [8]. Инулин может быть использован для получения фруктозы, спирта, а также как технологический ингредиент в пищевой промышленности.

Инулин накапливается в корнях цикория, причем количество его может составлять 15–20% и более сырого веса [9]. Показано, что в культуре *in vitro* также происходит синтез инулина. Так, для сорта цикория Lucknow Local определено, что при выращивании *in vitro* концентрация инулина в корнях может вдвое превышать концентрацию при росте *in vivo* [10]. Поскольку известно, что *in vitro* рост корневой системы цикория регулируется составом питательной среды и наличием/концентрацией регуляторов роста [11], представляет интерес изучение влияния состава среды на синтез запасного полисахарида инулина в растениях цикория.

Материалы и методы

В качестве исходного материала использовали семена цикория *C. intybus* сорта Пала росса, которые последовательно стерилизовали в течение 1 мин в 70%-ном этаноле, 10 мин в 25%-ном растворе коммерческого препарата “Белизна”, трижды по 10 мин промывали дистиллированной водой и прорастивали на агаризованной безгормональной среде Мурасиге и Скуга (MS) [12] в темноте при температуре 26 °C.

Для укоренения побегов использовали 12-дневные проростки. После отделения корней побеги культивировали на агаризованных средах MS, MS с вдвое уменьшенной концентрацией макроэлементов (1/2MS) и на тех же средах с добавлением 0,5 мг/л индолилмасляной кислоты (MS-ИМК и 1/2MS-ИМК). Массу корней определяли в трех повторностях путем взвешивания.

Содержание инулина определяли по методике, основанной на способности кетосахаров окрашиваться резорцином в кислой среде [13]. Корни 45-дневных растений высушивали при 100 °С в течение 10 мин, досушивали при комнатной температуре. К 100 мг измельченного сухого материала добавляли 5 мл дистиллированной воды. Затем к 5 мл пробы добавляли 5 мл 0,1% спиртового раствора резорцина и 5 мл концентрированной соляной кислоты, нагревали на водяной бане 20 мин. После этого растворы охлаждали и измеряли интенсивность окрашивания на ФЕК (КФК-2) с зеленым светофильтром (540 нм). Концентрацию инулина определяли по калибровочной прямой (калибровка по фруктозе).

Результаты и обсуждение

Состав питательной среды оказывает существенное влияние на рост корневой системы растений в стерильной культуре. Факторами, которые влияют на этот процесс, являются концентрация макро- и микроэлементов, присутствие и концентрация регуляторов роста. Последние, в частности, ауксины, могут в значительной степени ускорять рост корней в культуре *in vitro*, а также увеличивать массу корневой системы [14].

В наших экспериментах изучали влияние минерального состава среды и индолилмасляной кислоты на рост корней цикория и накопление в них инулина.

Показано, что уменьшение концентрации макроэлементов в среде MS (1/2MS) способствует увеличению через 45 сут. массы корневой системы в 2,12 раза. Добавление индолилмасляной кислоты к среде MS увеличивает массу корней в 2,15 раза. Наибольшая масса корневой системы (в 3 раза больше, чем на среде MS) наблюдалась при росте цикория на среде с уменьшенным вдвое количеством макроэлементов и 0,5 мг/л ИМК (рис. 1). Такие результаты соответствуют литературным данным. Так, исследованиями [11] показано, что формированию корней цикория способствует уменьшение концентрации макроэлементов в среде Мурашиги и Скуга.

Ранее исследования определили, что инулин синтезируется не только в растениях, растущих в естественных условиях в почве [15, 16], но также и в условиях стерильной культуры как в каллюсных тканях, так и в корнях [10]. По нашим данным, концентрация инулина *in vitro* в корнях цикория сорта Пала росса коррелировала с массой образовавшихся за 45 суток корней (рис. 2).

Максимальное содержание инулина наблюдалось при росте цикория на среде 1/2MS-0,5 ИМК, минимальное — на среде MS. Однако, такой эффект, по-видимому, обусловлен не только большей массой корней на среде

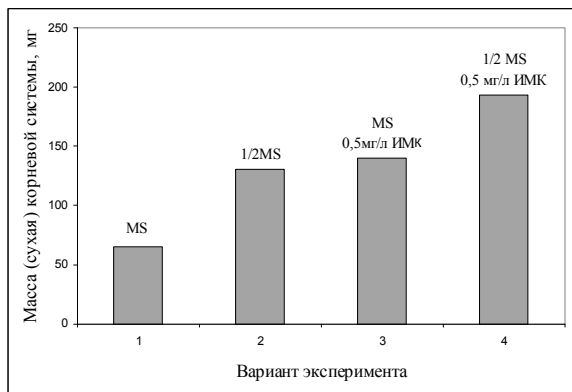


Рис. 1. Зависимость массы корневой системы цикория при культивировании растений на средах MS (1), 1/2MS (2), MS- ИМК (3), 1/2MS-ИМК (4)

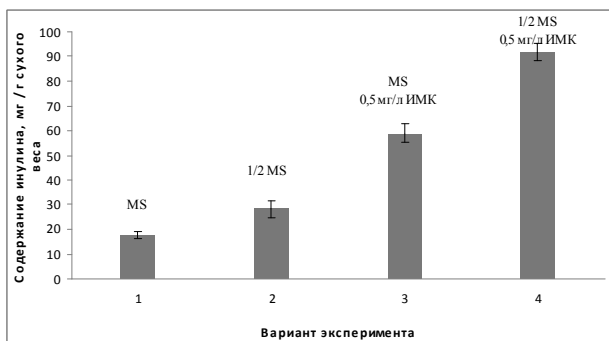


Рис. 2. Увеличение концентрации инулина в корнях при культивировании растений цикория на среде 1/2MS с 0,5 мг/л индолилмасляной кислоты

1/2MS-0,5 ИМК, поскольку наблюдалось увеличение относительного содержания инулина в пересчете на 1 г сухой массы корней. Уменьшение вдвое концентрации макроэлементов и добавление к среде MS 0,5 мг/л ИМК способствовало значительному (более чем в 5 раз) увеличению накопления инулина в корнях цикория, концентрация которого при оптимальном составе среды (1/2MS-0,5 ИМК) составила 92 мг/г сухой массы корней (27,2 мг/г сырой массы).

Выводы

Определены условия культивирования *in vitro* цикория *Cichorium intybus* L., которые способствуют увеличению массы корней и повышению концентрации в них инулина. На рост корневой системы цикория в культуре *in vitro* влияют как концентрация макроэлементов, так и присутствие индо-

лилмасляной кислоты. На среде MS с уменьшенным содержанием макроэлементов и 0,5 мг/л ИМК масса корневой системы в 3 раза превышала массу корней, которые образовывались на среде MS. Кроме того, уменьшение концентрации макроэлементов и добавление ИМК приводило к значительному увеличению удельного содержания инулина в корнях цикория. Этот показатель составлял 92 мг/г сухой массы корней, что почти в 5 раз превышает содержание инулина при культивировании растений на среде MS.

Литература

1. *Van den Ende, Michiels W., De Roover J., Van Laere A.* Fructan biosynthetic and breakdown enzymes in dicots evolved from different invertases. Expression of functional genes throughout chicory development // *Sci. World J.*— 2002.— Vol.11, №2.— P. 1273–1287.
2. *Baert J.R.A., Van Bockstaele E.J.* Cultivation and breeding of root chicory for inulin production // *Industrial Crops and Products.*— 1992.— Vol.1, №2–4.— P. 229–234.
3. *Pool-Zobel B.L.* Inulin-type fructans and reduction in colon cancer risk: review of experimental and human data // *British J. of Nutrition.*— 2005.— Vol.93, №1.— P. 73–90.
4. *Gadgoli C., Mishra S.H.* Antihepatotoxic activity of *Cichorium intybus* // *Ethnopharmacology.*— 1997.— Vol.58, №2.— P. 131–134.
5. *Ahmad K.D., Gilani S.N., Akhtar A.H., Khan L.* Antiulcerogenic evaluation of aqueous extracts of *Cichorium intybus* and *Phyllanthus emblica* in normal and aspirin-treated rats // *Pakistan J. of Sci. and Industrial Res.*— 1998.— Vol.41, №2.— P. 92–96.
6. *Mujahid A.S.* Anti-hepatotoxic effects of root and root callus extracts of *Cichorium intybus* L. // *Ethnopharmacology.*— 1998.— Vol.63, №3.— P. 227–231.
7. *Kelly G.* Inulin-type prebiotics—a review: part 1 // *Altern. Med. Rev.*— 2008.— Vol.13, №4.— P. 315–329.
8. *Özer D., Akin S., Özer B.* Effect of Inulin and Lactulose on Survival of *Lactobacillus Acidophilus* LA-5 and *Bifidobacterium Bifidum* BB-02 in Acidophilus-Bifidus Yoghurt // *Food Sci. and Technol. International.*— 2005.— Vol.11, №1.— P. 19–24.
9. *Figueira G.M., Park K.J., Reis Brod F.P., Honorio S.L.* Evaluation of desorption isotherms, drying rates and inulin concentration of chicory roots (*Cichorium intybus* L.) with and without enzymatic inactivation // *J. Food Engineer.*— 2004.— Vol.63.— P. 273–380.
10. *Ranjitha Kumari B.D., Velayutham P., Anitha S.A* Comparitive Study on Inulin and Esculin Content of In vitro and In vivo Plants of Chicory (*Cichorium intybus* L. Cv. Lucknow Local) // *Advances in Biol. Res.*— 2007.— Vol.1, №1–2.— P. 22–25.
11. *Park E., Lim H.* Establishment of an efficient in vitro plant regeneration system in chicory (*Cichorium intybus* L. var. Sativus) // *International symposium on vegetable quality of fresh and fermented vegetables.*— 2006.— №4.— P. 115.
12. *Murashige T., Skoog F.* A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture // *Physiol Plant.*— 1962.— Vol.15, №3.— P. 473–496.
13. *Ермаков А.И., Арасимович В.В., Ярош Н.П. и др.* Методы биохимического исследования растений. Л.: Агропромиздат, 1987.— С. 143.
14. *Nitsch J. P. Bui Dang Ha, Nitsch C.* Extraction d'un facteur de bourgeonnement de l'endive (*Cichorium intybus* L) // *Bull. Soc. Bot. Fr.*— 1966.— Vol.113, №6.— P. 425–429.
15. *Amaducci S. Pritoni G.E.* Effect of harvest date and cultivar on *Cichorium intybus* yield components in north Italy // *Industrial Crops and Products.*— 1998.— Vol.7, №2.— P. 345–349.

16. Baert J. R. A. The effect of sowing and harvest date and cultivar on inulin yield and composition of chicory (*Cichorium intybus* L.) roots // Industrial Crops and Products.— 1997.— Vol.6, №3–4.— P. 195–199.

Резюме

Изучено влияние состава питательной среды на рост корневой системы и накопление инулина (запасного полисахарида) в корнях цикория *Cichorium intybus* L. Показано, что уменьшение концентрации макроэлементов способствует росту корней цикория. Аналогичный эффект обнаружен при культивировании в присутствии индолилмасляной кислоты (ИМК). Уменьшение концентрации макроэлементов и добавление в среду 0,5 мг/л ИМК приводило к значительному увеличению содержания в корнях инулина, которое составляло более 90 мг/г сухой массы корней.

Вивчено вплив складу живильного середовища на ріст кореневої системи та накопичення інуліну (запасного полісахариду) у коренях цикорію *Cichorium intybus* L. Показано, що зменшення концентрації макроелементів сприяє росту коренів цикорію. Аналогічний ефект виявлений при культивуванні на середовищі з індолілмасляною кислотою (ИМК). Зменшення концентрації макроелементів і додавання до середовища 0,5 мг/л ИМК призводило до значного збільшення вмісту у коренях інуліну, який становив більше 90 мг/г сухої маси коренів.

The influence of a medium content on root growth and inulin accumulation in roots of chicory *Cichorium intybus* L. was investigated. The reduction of macroelements concentration in the MS medium augmented chicory roots weight. The similar effect is found out during cultivation on the medium with 0,5 mg/l IBA. Reduction of concentration of macroelements and IBA addition increased the inulin concentration up to 92 mg/g of roots dry weight.

МЕДВЕДЄВА Т.В., ТРЯПЦІНА Н.В.

Інститут садівництва НААНУ України,

Україна, 03027, Київ, с.Новосілки, вул. Садова, 23,

e-mail: medvedevatv@rambler.ru

ЕЛІМІНАЦІЯ ВІРУСУ КУЩИСТОЇ КАРЛИКОВОСТІ МАЛИНИ МЕТОДОМ ХЕМОТЕРАПІЇ В КУЛЬТУРІ *IN VITRO*

Малина (*Rubus idaeus* L.) є однією з найбільш важливих кущових ягідних культур в Україні — її насадження складають понад 5 тис. га. Значні втрати в кількості та якості врожаю цієї культури спричиняють вірусні інфекції. Одним з найбільш поширених вірусів, що інфікують дикоростучі та культивовані насадження малини є вірус кущистої карликовості малини (ВККМ) (*Raspberry bushy dwarf virus*) — єдиний представник сімейства *Idaeovirus* [1]. Як показують наші обстеження колекційних насаджень малини, в Україні цей вірус є найбільш розповсюдженим серед інших і вражає від 43% до 58% перевірених насаджень. При цьому деякі сорти вражені ним на 100%. Отже для багатьох сортів малини виділення безвірусних

клонів і виробництво безвірусного садивного матеріалу є досить проблематичним, а від того і актуальним.

Вірус є досить спеціалізованим з огляду на невелику кількість природних господарів (малина, ожина та їх міжвидові гібриди). У природних умовах переноситься комахами-запилювачами, а в тепличних — може передаватися механічним шляхом при щепленні, обрізуванні, живцюванні та інших подібних процедурах. Природні вектори-переносники невідомі. До основних симптомів цього вірусу відносять пожовтіння листя, укорочення і зменшення у діаметрі пагонів та неправильне формування плодів із зменшенням кількості сім'янок у плоді та їх обсіпанням, що призводить до втрат врожаю рослини на 40–50%. Симптоматика значним чином підсилюється при комплексному інфікуванні з іншими вірусами. Єдиний ефективний спосіб зниження шкодочинної дії вірусних захворювань — це використання високоякісного оздоровленого садивного матеріалу. Продуктивність промислових насаджень плодових і ягідних культур при цьому підвищується у 6–8 разів [2].

Технології виробництва оздоровленого садивного матеріалу багатьох видів культурних рослин базуються на основі комплексного застосування методів відбору безвірусних рослин, культури апікальних меристем, термо — та хемотерапії [3]. Було показано, що процедури термотерапії в поєднанні з культурою апікальних меристем недостатньо для елімінації ВККМ з інфікованих рослин малини [4]. Хемотерапія є одним з найновіших методів для елімінації вірусів рослин і широко використовується в комбінуванні з мікроклональним розмноженням. Такі антивірусні компоненти як рибавірін, 5-азацитидин і інші були успішно використані для хемотерапії ряду економічно важливих культур [5]. Тому метою наших досліджень була оцінка можливості елімінації вірусу куцистої карликовості малини з інфікованих рослин методом хемотерапії *in vitro* з використанням віроциду “Віразол” — синтетичного аналога гуанозину, що має антивірусну активність.

Матеріали і методи

Робота виконувалась у відділі вірусології, оздоровлення та розмноження плодових і ягідних культур Інституту садівництва НААНУ протягом 2007–2009 рр.

Культивування *in vitro* і хемотерапія. Об'єктами дослідження можливості елімінації вірусу ВККМ *in vitro* слугували сорти малини Осінній зорепад, Феномен та гібридна форма 8-3 з колекційних насаджень Інституту садівництва. Ініціювання культури *in vitro* було виконано з використанням етіюльованих кореневих бруньок. В якості стерилізуючого агента застосовували сулему (0,1% HgCl_2) і 70% етанол. Експозиція стерилізації складала 3–5 хвилин. На етапі введення в культуру та проліферації використовували модифіковане живильне середовище Мурасіге — Скуга (MS) [6] з додаванням вітамінів та фітогормонів, рН = 5,5–5,7. Експланти культивували при 16-годинному світловому дні з освітленням 2000–2500 лк при $t^\circ = 23\text{--}25$ °C і вологості повітря 50–60%. Для досягнення необхідної кількості мікропа-

гонів їх культивували на середовищі з підвищеним вмістом БАП (1 мг/л). Інфіковані лінії розмножених пагонів були використані як вихідний матеріал для хемотерапії *in vitro*.

В якості віроциду було використано препарат “Віразол” ((1-β-рібофурозил-1,2,4-тріазол-3-карбоксамід), комерційна назва рибавірин, C₁₀H₁₈ClN) [7] (Sharma et al., 2007). Механізм дії цього противірусного засобу полягає у конкурентному пригніченні синтезу гуанозинтрифосфату і таким чином синтезу вірусних РНК і білків без пригнічення синтезу РНК рослинної клітини. Для цього препарату також характерним є швидке проникнення у клітину, що прискорює результати його дії.

Для хемотерапії в середовище для культивування малини додавали рибавірин в концентрації 20 мг/л, 50 мг/л і 100 мг/л. В контрольному варіанті використовували середовище без рибавірину. По десять пагонів було використано на кожен варіант. Експеримент було проведено згідно із схемою, представленою на рис. 1.

Ідентифікація вірусу. Імуноферментний аналіз проводили з використанням сертифікованих специфічних поліклональних антитіл виробництва Loewe Phytodiagnostica (Німеччина) методом DAS-ELISA [8]. Для реєстрації результатів використано мікропланшетний імуноферментний спектрофотометр STAT FAX 2100, США.

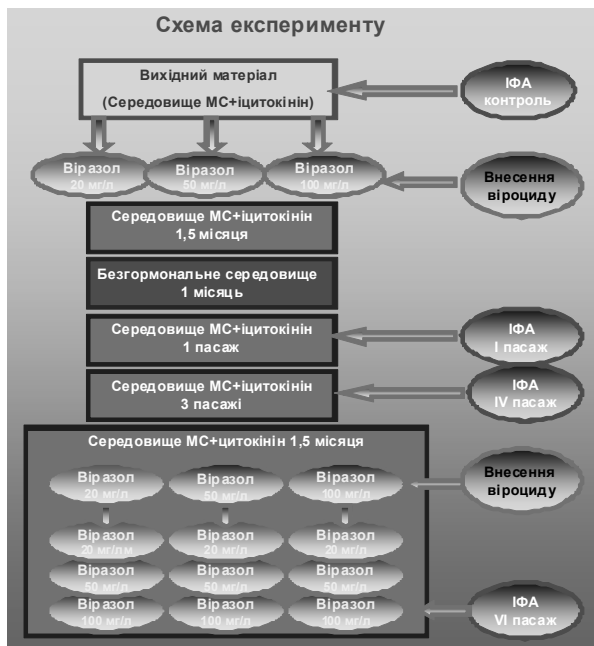


Рис. 1. Схема експерименту

При тестуванні колекційних насаджень відбирали верхівкові листки з візуальними ознаками враження вірусом. При тестуванні матеріалу з культури *in vitro* відбирали частину експланта, не занурену у середовище. Розведення проби в гомогенаті дорівнювало 1:100.

Оцінка зміни концентрації вірусів. Зміни у концентрації вірусів оцінювали як відношення різниці між показниками оптичної густини контрольного вірус інфікованого зразка певного сорту та експериментального зразка цього ж сорту до оптичної густини контрольного вірус-інфікованого зразка.

$$A = \frac{OD_{\text{contri}} - OD_{\text{expi}}}{OD_{\text{contri}}} \% \quad (1)$$

де OD_{contri} — значення оптичної густини контролю і-го сорту, OD_{expi} — значення оптичної густини експериментального зразка.

Контрольні зразки кожного сорту проходили ті ж самі етапи культивування, що і експериментальні зразки без внесення в середовище віроциду. Зміни концентрації вірусів на різних етапах культивування в контрольних вірус-інфікованих зразках оцінювали як відношення різниці між показниками оптичної густини контролю та оптичної густини безвірусного зразка (негативного контролю) до оптичної густини безвірусного зразка:

$$A = \frac{OD_{\text{contri}} - OD_{\text{neg}}}{OD_{\text{neg}}} \% \quad (2)$$

де OD_{neg} — значення оптичної густини безвірусного зразка (негативного контролю), OD_{contri} — значення оптичної густини контрольного вірус інфікованого зразка і-го сорту.

Результати та обговорення

В окремих генотипах малини ВККМ важко або практично неможливо видалити методом культури верхівкових меристем, адже він здатен ефективно проникати в листові примордії та всі меристематичні тканини, за винятком найменш диференційованих клітин апікального куполу [9]. Відомо декілька класів речовин з прямою антивірусною активністю, які пригнічують репродукцію вірусу в рослині (рибавірин, азацитидин та похідні олігоаденилатів). Вплив обробки такими речовинами на інфекційність може бути результатом дії як на вірус, так і на сприйнятливість клітини-господаря. Найбільш відомий метод хемотерапії полягає у внесенні сполук — інгібіторів вірусів у живильне середовище для культивування апікальних меристем. Було показано, що рибавірин дає найвищий результат в елімінації вірусів яблуні, малини та видів *Rubus* в порівнянні з іншими антивірусними препаратами [7, 10], тому цей препарат і використано в наших дослідженнях.

Експеримент було проведено згідно із схемою, представленою на рис. 1.

Для введення в культуру були відібрані зразки як з високим рівнем концентрації вірусу (сорта Феномен та Осінній зорепад), так і з відносно

невисоким (гібридна форма 8-3). Після ініціювання асептичної культури регеновані пагони розмножили на модифікованому середовищі MS з подвійною концентрацією хелату заліза до кількості, необхідної для проведення експерименту. Далі інфіковані мікропагони кожного сорту за винятком контрольних пересадили на середовище з ідентичним гормональним складом, але з додаванням віразолу в різних концентраціях (20 мг/л, 50 мг/л та 100 мг/л). Тривалість пасажу складала 45 днів, після чого верхівки пагонів пересажували на середовище MS без фітогормонів. Через місяць ці рослини пересадили на середовище для розмноження (1 мг/л БАП). Культивування продовжувалося протягом 1,5 місяців, після чого всі зразки були перевірені методом ІФА для кількісної оцінки концентрації вірусу. Аналогічні маніпуляції було проведено також з контрольними, не обробленими віроцидом рослинами.

Аналіз концентрації вірусу в контрольних експлантах досліджуваних сортів виявив терапевтичний вплив культивування на середовищі з цитокініном (БАП, 1 мг/л), що призводило до різної за силою зміни концентрації вірусу у кожного сорту (рис. 2). Найбільш вираженим токсичний вплив цитокініну на відтворення вірусу спостерігався у рослин сорту Феномен. Це підтверджує, зокрема, вплив генетичних особливостей експлантів на сприйняття токсичної дії фітогормонів до вірусних інфекцій, факт неодноразово підтверджений іншими дослідниками [11]. Подібні результати були отримані при тривалому культивуванні експлантів черешні на збагачених цитокініном середовищах. Можливо, що гормональна складова живильного середовища підвищує конкуренцію між клітинами рослин та вірусами за перерозподіл ресурсів [12]. Для ВККМ в декількох випадках безвірусні рослини були отримані після трьох послідовних субкультур на середовищі з цитокініном [13].

Дані імуоферментного аналізу зразків, які були оброблені “Віразолом”, також свідчать про специфічність реакції кожного сорту на обробку віроци-

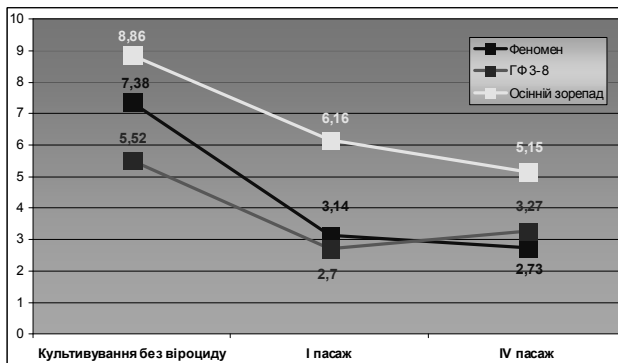


Рис. 2. Зміни концентрації вірусів на різних етапах культивування контрольних вірус-інфікованих експлантів

Таблиця 1

Падіння концентрації ВККМ в експлантах малини на I пасажі після внесення віроциду

Сорти	Зниження концентрації вірусу в експлантах малини (%)		
	20 мг/л	50 мг/л	100 мг/л
Вміст віразолу у живильному середовищі	20 мг/л	50 мг/л	100 мг/л
Феномен	40,1	54,7	-
ГФ 8-3	57,9	60,7	75,8
Осінній зорепад	35,9	65,6	75,0

Таблиця 2

Зниження концентрації ВККМ в експлантах малини в культурі *in vitro* на різних етапах культивування при однократній обробці віроцидом (%)

Сорти	Зниження концентрації вірусу в експлантах малини (%)		
	20 мг/л	50 мг/л	100 мг/л
Вміст віразолу у живильному середовищі	20 мг/л	50 мг/л	100 мг/л
I пасаж	46,4±10,50*	59,7±6,96	75,4±13,20
IV пасаж	65,7±4,55*	67,9±4,95	78,5±6,91

Примітка: * — $p < 0,05$.

дом. Найбільш чутливим до його дії виявилася гібридна форма малини 8-3 — елімінація вірусу карликовості малини в експлантах тут була найрезультативнішою. Зокрема, при концентрації віроциду 20 мг/л у деяких експлантів редукція вірусу складала 75,3%, а при концентрації 50 мг/л — 78,8% (табл. 1).

Кореляційний аналіз між вмістом “Віразолу” у живильному середовищі та зниженням концентрації вірусу в експлантах кожного сорту малини свідчить про відсутність достовірної лінійної залежності між цими показниками, що є підтвердженням сортоспецифічності відповіді на дію “Віразолу”.

При культивуванні на середовищі з “Віразолом” було відмічено його токсичний вплив на розвиток мікропагонів. Зокрема, вже на ранніх етапах культивування на середовищі із вмістом віроциду у 20 мг/л та 50 мг/л втрати експлантів склали до 25% в кожному випадку, а при концентрації 100 мг/л — до 50%, що не дало змогу провести статистичну обробку отриманих даних по кожному сорту окремо. В сумі з урахуванням даних для всіх трьох сортів різниця між реакцією експлантів на різний вміст віроциду в середовищі на цьому етапі є недостовірною (табл. 2). Фітотоксичний ефект “Віразолу” в концентрації 50–100 мг/л спостерігали також на експлантах сливи, груші та малини сорту Норна (9).

Протягом наступних 3-х пасажів рослини, оброблені віроцидом, продовжували культивувати на середовищі з цитокініном, після чого на IV пасажі було проведено повторний контроль концентрації вірусу з метою виявлення

можливої післядії віроциду та оцінки впливу на концентрацію вірусу гормональної складової живильного середовища (БАП, 1 мг/л).

Було виявлено падіння концентрації вірусу в контрольних зразках сорту Феномен та Осінній зорепад, яке можна розцінювати як терапевтичний ефект цитокиніну. А концентрація вірусу в експлантах гібридної форми 8-3 дещо виросла, що вірогідно пов'язано з меншою чутливістю цього сорту до пролонгованої дії БАП. Відповідно і пролонгована реакція на внесення віроциду у цього сорту була меншою у порівнянні із двома іншими сортами. Аналогічний синергічний ефект дії фітогормону та віроциду на зниження рівня концентрації іларвірусів зафіксовано для експлантів черешні [12]. Найвиразніший хемотерапевтичний ефект зафіксовано у сорту Осінній зорепад при концентрації рибавіріну 100 мг/л (92%). Цей сорт таким чином виявився найбільш чутливим до комбінованого ефекту післядії цитокиніну та віроциду. На цьому етапі культивування загальні втрати експлантів становили 42,7%.

Як і на I пасажі після внесення віроциду не виявлено достовірної кореляції між вмістом "Віразолу" у живильному середовищі та зниженням концентрації ВККМ в експлантах кожного сорту, а також достовірної різниці між реакцією експлантів на різний вміст віроциду в середовищі (табл. 2). Але при порівнянні даних I-го та IV-го пасажів виявлена достовірна різниця між зниженням концентрації вірусу на середовищі із вмістом віроциду у 20 мг/л. Це свідчить про те, що майже однаковий хемотерапевтичний ефект у експлантів малини можна досягти у різний спосіб. На нашу думку варіант з використанням нижчих концентрацій рибавіріну, що доповнюється тривалішим культивуванням на середовищі з бензиламінопурином (1 мг/л) є більш виправданим з огляду на менший токсичний вплив віроциду на життєздатність рослини.

На VI пасажі культивування на середовищі з цитокиніном (БАП, 1 мг/л) рослини з кожного варіанту були повторно оброблені віроцидом, зокрема були розсаджені на середовища із різним вмістом віразолу. Таким чином було отримано 9 варіантів (рис. 1). Контролем на цьому етапі слугували рослини з однократною обробкою віроцидом. Після 1,5 місяців культивування на середовищі з БАП та віроцидом експланти відбирали для тестування методом ІФА.

Для сортів Феномен і Осінній зорепад кількість випадів склала 67%, що унеможливило аналіз змін концентрації ВККМ в експлантах цих сортів після повторної обробки віроцидом. Дані, отримані для гібридної форми 8-3, представлено у табл. 3.

Аналіз цих даних свідчить про суттєвий вплив післядії першої обробки віроцидом експлантів цього сорту на результати повторної обробки. Оскільки контрольні зразки цього сорту, які не оброблялися віроцидом, на цей час вже було втрачено, аналіз впливу гормональної складової середовища на концентрацію ВККМ на цьому етапі оцінити було неможливо, але з огляду на збільшення концентрації вірусу в контрольних експлантах цього сорту на IV пасажі (рис. 2), можна припустити, що елімінація вірусу була досить

Таблиця 3

Падіння концентрації ВККМ в експлантах малини гібридної форми 8-3 по відношенню до контролю на середовищах з різним вмістом віразолу на VI пасажі (%)

№ пасажу	Варіант	Вміст віразолу у живильному середовищі		
		20 мг/л	50 мг/л	100 мг/л
VI пасаж	20 мг/л	37,1	42,9	50,0
	50 мг/л	57,1	76,8	78,2
	100 мг/л	На рівні негативного контролю	На рівні негативного контролю	На рівні негативного контролю

ефективною саме завдяки віроциду, адже в експлантах, які були раніше оброблені віроцидом у концентрації 100 мг/л, ВККМ не було виявлено у всіх варіантах. З іншого боку стверджувати про повну елімінацію вірусу за даними саме методу ІФА неможливо, адже його рівень чутливості для цього є недостатнім. Слід також зауважити, що з усіх 3-х сортів вихідна концентрація вірусу перед початком експерименту була найнижчою саме в експлантах цього сорту.

По аналогії з різницею, яку було виявлено на етапі I-го та IV-го пасажів при концентрації віроциду у середовищі 20 мг/л, можна сподіватися, що більш тривале культивування після повторного внесення віроциду сприятиме нарощуванню.

Таким чином, наші спостереження свідчать, що успіх в елімінації вірусу залежить від природи вірусу, методу дослідження та генетичних особливостей сорту.

Висновки

Підсумовуючи отримані дані можна виділити декілька положень, які варто враховувати при проведенні оздоровлення експлантів малини від ВККМ методом хемотерапії з використанням віроциду “Віразол”.

1. Високі концентрації віроциду (100 мг/л) спричиняють фітотоксичний вплив на розвиток експлантів.
2. Не виявлено достовірної лінійної залежності між концентрацією віроциду в середовищі та падінням концентрації вірусу.
3. Виявлено пролонговану післядію віроциду.
4. Синергізм дії цитокініну та віроциду має сортоспецифічний характер.
5. Після двократної обробки віроцидом в експлантах не виявлено методом ІФА вірусу куцистої карликовості малини при всіх досліджуваних концентраціях, що потребує уточнення більш чутливими методами ідентифікації вірусу.

Література

1. *Barbara, D.J.* Occurrence and distribution of Raspberry bushy dwarf virus in commercial Rubus plantations in England and Wales // *Plant Pathology*.— 2001.— Vol.50, №6.— P. 747–754.
2. *Кушнір Г.П., Сарнацька В.В.* Мікроклональне розмноження рослин // 2005. К.— Наукова думка.

3. Spiegel S., Frison E.A., Converse R.H. Recent development in therapy and virus-detection procedures for international movement of clonal plant germ plasm // Plant Disease.— 1993.— №77(12).— P. 1176–1180.

4. Wang Q.-C., Cuellar W.J., Rajamöki M.-L. Combined thermotherapy and cryotherapy for efficient virus eradication: relation on virus distribution, subcellular changes, cell survival and viral RNA degradation in shoot tips // Molecular Plant Pathology.— 2008.— №9(2).— P. 237–250.

5. Pnpola N., Lepse L., Kle A. Occurrence of RBDV in Latvia and virus elimination *in vitro* by chemotherapy // Scientific work of the Lithuanian Institute of Horticulture and Lithuanian University of Agriculture. Sodininkystė ir Daržininkystė.— 2009.— 28(3).— P. 165–172.

6. Murashige T., Skoog F.A. revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiologia Plantarum.— 1962.— 15.— P. 473–497.

7. Sharma S Singh B., Zaidi A.A. Production of Indian citrus ringspot virus free plants of kinnow employing chemotherapy coupled with shoot tip grafting // Journal Central European Agriculture.— 2007.— 8(1).— P. 1–8.

8. Clark M.F., Adams A.N. Characteristics of the microplate method of the enzyme — linked immunosorbent assay for the detection of plant virus // J. Gen. Virol.— 1977.— Vol.34, №3.— P. 475–483.

9. Wang Q.-C., Valkonen J.P.T. Cryotherapy of shoot tips: novel pathogen eradication method // Trends in Plant Science.— 2009.— 14(3).— P. 119–122.

10. Cieslinska M. Application of thermo- and chemotherapy *in vitro* for elimination some viruses infecting *Prunus* sp. trees // Journal of Fruit and Ornamental Plant Research.— 2007.— 15.— P. 117–124.

11. Cassells A.C. Chemical control of virus diseases in plants / A.C. Cassells // Progress in Medical Chemistry.— 1983.— №20.— P. 119–155.

12. Deogratias J.M., Dosba F., Lutz A. Eradication of prune dwarf virus, necrotic ringspot virus and apple chlorotic leaf spot virus in sweet cherries by a combination of chemotherapy, thermotherapy, and *in vitro* culture // Canadian Journal of Plant Pathology.— 1989.— №11.— P. 337–343.

13. Theiler-Hedtrich R., Baumann G. Elimination of apple mosaic virus and raspberry bushy dwarf virus from infected red raspberry (*Rubus idaeus* L.) by tissue culture / Journal of Phytopathology.— 1989.— №127(3).— P. 193–199.

Резюме

Проведено дослідження з елімінації ВККМ методом хемотерапії в культурі *in vitro* з використанням “Віразолу”. Визначено рівень фітотоксичності віроциду та оцінено синергічну дію цитокініну та віроциду на падіння концентрації вірусу. Показано, що успіх хемотерапії залежить від природи вірусу та генетичних особливостей сорту.

Проведено исследование по элиминации ВККМ методом хемотерапии в культуре *in vitro* с использованием “Виразола”. Определен уровень фитотоксичности вироцида и оценен синергический эффект действия цитокинина и вироцида на падение концентрации вируса. Показано, что успех хемотерапии зависит от природы вируса и от генетических особенностей сорта.

The elimination of bushy dwarf virus by chemotherapy *in vitro* was investigated. The phytotoxic effect of Virazole was evaluated. It was demonstrated synergic effect of Virazole and cytokinines on reduction of virus concentration. The success with chemotherapy depends on the virus and on genetic plant material.

ОСТАПОВЕЦЬ Л.І., ТРОЦЬКИЙ П.А.

Інститут розведення і генетики тварин НААН України,

Україна, 08321, Київська обл., Бориспільський р-н., с. Чубинське, вул. Погребняка, 1,

e-mail:ostlara@online.ua

ВИКОРИСТАННЯ ГЕНЕТИКО-БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ МЕТОДІВ ОЦІНКИ ФУНКЦІОНАЛЬНОГО СТАНУ ООЦИТІВ КОРІВ І СВИНЕЙ *IN VITRO*

Інтенсифікація тваринництва привела до підвищеного попиту на більш продуктивні спеціалізовані породи сільськогосподарських тварин, які стали поширюватись за рахунок витіснення місцевих, локальних порід. В той же час створення нових порід, типів і ліній тварин неможливо без успадкованої різноманітності ознак, які залучаються до селекційного процесу. Переважна більшість місцевих порід у ході еволюції придбала і в теперішній час має спадкові ознаки, які потребує сучасне тваринництво. Унікальні гени і комплекси генів популяцій місцевих порід підвищують ефективність селекції при використанні їх в удосконаленні існуючих і виведенні нових порід, типів і ліній. Тому гени, що зникають при селекції, можуть бути втрачені назавжди. Виходом із цього є використання сучасних генетико-біотехнологічних методів відтворення в тваринництві. В результаті успішного впровадження біотехнологічних розробок в практику є можливість прискорення добору бажаних генотипів сільськогосподарських тварин з врахуванням широкого спектру критеріїв їх племінної цінності [1–3].

Успішність проведення біотехнологічних досліджень обумовлена синхронізацією великої кількості ооцитів на певних стадіях мейозу. Метод кріоконсервування і культивування деконсервованих гамет *in vitro* є основним джерелом одержання необхідного біологічного матеріалу для розробки методів зберігання та практичного використання генетичного потенціалу у тваринництві. Переважно більшістю дослідників при одержанні *in vitro* ембріонів, як вихідний біологічний матеріал для дозрівання поза організмом, використовують ооцит-кумулюсні комплекси, вилученні із антральних фолікулів яєчників тварин. Проте, розбіжності в результатах досліджень з культивування ооцит-кумулюсних комплексів свідчать про необхідність подальшого дослідження морфологічних та цитогенетичних особливостей дозрівання ооцитів корів і свиней в умовах *in vitro* та їх компетентність до ембріонального розвитку після партеногенетичної активації або запліднення поза організмом. Ці біотехнологічні дослідження будуть сприяти вивченню кількісних та якісних показників змін стану хромосом на різних стадіях мейозу і раннього ембріогенезу [4–6].

Метою досліджень була цитогенетична оцінка дозрівання *in vitro* деконсервованих ооцитів корів та вивчення закономірності перебігу мейозу у ооцитах свиней при культивуванні.

Матеріал і методи

Об'єктом експериментальних досліджень були ооцит-кумулюсні комплекси корів чорно-рябої породи та свиней великої білої породи. Ооцити корів

отримували шляхом надрізу лезом видимих антральних фолікулів, вимивали середовищем Дюльбекко, вилувлювали пастерівською піпеткою та оцінювали за морфологічними ознаками під мікроскопом. Для заморожування використовували ооцити корів з гомогенною тонкозернистою ооплазмою, неушкодженою прозорою оболонкою, щільним або частково розпушеним кумулюсом [7]. Перед заморожуванням гамет обробляли еквілібраційним розчином (10 хв.) потім переносили у вітрифікаційний розчин (30 с). Виведення кріопротекторів після розморожування гамет корів і свиноматок проводили шляхом перенесення їх на 10 хвилин у розчин 1,0 М сахарози. Збереженість гамет корів після деконсервування оцінювали за морфологічними і цитогенетичними показниками та культивування. Дозрівання ооцит-кумулясних комплексів поза організмом проводили в присутності клітин гранульози, концентрація якої складала $3\text{--}6 \times 10^6$ клітин у 1 мл культурального середовища, в чотириланкових планшетах ("Costar") протягом 27 год. при температурі $38,5\text{ }^\circ\text{C}$ та 5%-ному вмісті CO_2 в повітрі, у краплях середовища 199 з 10%-ною попередньо інактивованою сироваткою корів, 1,0 мкг/мл естрадіолу ("Serva"), 2,5 МОд/мл лютеїнізуючого гормону ("Serva"), 2,0 мМ натрію пірувату ("Sigma"), 2,92 мМ кальцію лактату ("Sigma"), 40 мкг/мл гентаміцину.

З метою оцінки стадії мейотичного дозрівання поза організмом деконсервованих і нативних (контрольна група) ооцит-кумулясних комплексів корів та виявлення хромосомних порушень у гамет протягом дозрівання, частина клітин із загальної кількості, поставлених на культивування, підлягала цитогенетичному аналізу. Для приготування сухоповітряних препаратів за методом А.К. Tarkowski [8], ооцит-кумулясні комплекси спочатку механічно (піпетуванням) звільняли від клітин кумулюса, потім на 10 хв при кімнатній температурі переносили у 0,9%-ний гіпотонічний розчин 3-х заміщеного цитрату натрію і фіксували на попередньо знежиреному сухому склі фіксатором Карнуа (метанол : льодяна оцтова кислота = 3:1). Препарати забарвлювали 2,0%-ним розчином барвника Гімза.

Вилучення ооцит-кумулясних комплексів свиней проводили шляхом розрізання антральних фолікулів у середовищі 199 з 25 мМ Hepes ("Sigma"), яке містило 10% сироватки крові корів. Відібрані за морфологічними ознаками ооцит-кумулясні комплекси культивували в середовищі 199 на розчині Ерла ("Sigma"), яке містило 20% еструсної сироватки крові корів та клітин гранульози в концентрації $3\text{--}5 \times 10^6$ клітин на 1 мл культурального середовища. Дозрівання ооцитів свиней здійснювали при температурі $+38,8\text{ }^\circ\text{C}$ в атмосфері повітря з 4% CO_2 та при максимальній вологості. Для дослідження стану мейотичних хромосом під час дозрівання ооцитів поза організмом готували сухоповітряні препарати за модифікованим нами методом А.К. Tarkowski [8]. Ооцити свиней переносили на 10 хвилин у краплю 0,26%-го гіпотонічного розчину цитрату натрію з подальшою фіксацією сумішшю метанол-оцтової кислоти в співвідношенні 2:1. Фарбування препаратів проводили з використанням 2,0%-го розчину барвника Гімза.

Результати та обговорення

Проведено дослідження з вивчення впливу гліцерину, пропандіолу, етиленгліколю в еквілібраційному розчині на життєздатність і подальший розвиток *in vitro* деконсервованих ооцит-кумулясних комплексів корів.

Заморожували ооцит-кумулясні комплекси корів з використанням трьох різних еквілібраційних розчинів: гліцерин — група А, пропандіол — група Б, етиленгліколь — група В. В контрольній групі гамети не заморожували. Результати наших досліджень показали наявність взаємозв'язку між різними кріопротекторами у еквілібраційному розчині та рівнем мейотичного дозрівання деконсервованих ооцитів корів в умовах *in vitro*. За результатами експериментальних досліджень встановлено, що рівень дозрівання деконсервованих ооцитів, заморожених з використанням гліцерину різниться, порівняно із етиленгліколем у еквілібраційному розчині за такими показниками як кількість дозрілих до метафази II мейозу (51,7% (гр. А) проти 63,4% (гр. В), ($p < 0,05$)) та кількість клітин з хромосомними порушеннями (35,6% проти 23,2%, ($p < 0,05$) відповідно). Позитивні результати отримані нами при кріоконсервуванні ооцит-кумулясних комплексів корів при застосуванні пропандіолу (гр. Б) у еквілібраційному розчині. Рівень дозрівання поза організмом гамет корів становить 57,1% та порушень хромосомного матеріалу 30,4%.

Таким чином, нашими дослідженнями встановлена різна чутливість ооцит-кумулясних комплексів корів до кріопротекторів та різна властивість дозрівання поза організмом деконсервованих ооцитів до метафази II мейозу *in vitro*. Ця нерівномірність корегує з морфологічним та цитогенетичними властивостями і в загальному характерна для всіх досліджених ооцит-кумулясних комплексів корів. Виходячи із одержаних нами даних цитогенетичної оцінки кріоконсервованих ооцит-кумулясних комплексів корів з різними кріопротекторами у еквілібраційному розчині, вважаємо, що застосування етиленгліколю забезпечить при високих кріопротекторних властивостях меншу токсичність еквілібраційного розчину, що в свою чергу, сприяє більш повноцінному дозріванню деконсервованих ооцитів і цим зумовлює перевагу.

Застосування морфологічного та цитогенетичного методу, тобто проведення візуальної оцінки ооцитів за станом кумулюсу та ооплазми і подальшого цитогенетичного аналізу хроматину таких гамет дозволило встановити, що ооцити оточені клітинами кумулюсу без ознак дегенерації та із гомогенною ооплазмою є найбільш придатними для дозрівання *in vitro* [9]. Відомо, що перебування ооцитів на певних стадіях мейотичного дозрівання *in vitro* залежить від часу культивування. Проведені дослідження з вивчення мейотичного стану хромосом ооцитів свиней на 18, 32 та 46 годину дозрівання *in vitro*. За результатами цитогенетичного аналізу ооцитів свиней встановлено, що на 18, 32 та 46 годину культивування незначна кількість гамет не відновила мейотичного дозрівання і перебувала на стадії диплотени (відповідно 2,9; 7,1 та 5,7%). В ооцитах свиней, які культивували 32 години,

спостерігали найбільшу та однакову кількість гамет на стадії метафази I та анафази I, що становило 28,6%. Проте, зі збільшенням часу дозрівання до 46 годин спостерігали поступове зменшення кількості гамет на стадії метафази I, що достовірно менше, порівняно із 18 та 32 годинами (9,4% проти 28,6% ($p < 0,01$) та 44,2% ($p < 0,001$), відповідно). Зниження кількості ооцитів на стадії метафази I відбувалося внаслідок переходу частини клітин на більш просунуті стадії мейозу. Так для стадії метафази II цей показник становив 60,4% клітин, що достовірно більше, порівняно з 18 та 32 годинами культивування (8,8% ($p < 0,01$) та 10,7% ($p < 0,001$), відповідно). Рівень дегенерації хромосом між часовими параметрами суттєво не відрізнявся і знаходився в межах 2,9–15,9%. Таким чином, на 46 годину більше половини гамет завершили мейотичне дозрівання *in vitro*, що узгоджуються з даними інших авторів, про більш тривалий термін культивування ооцит-кумулясних комплексів свиней, порівняно з іншими видами сільськогосподарських тварин [10, 11].

Висновки

1. Проведені дослідження морфологічного і цитогенетичного аналізу гамет корів і свиней спрямовані на комплексну оцінку кількісних та якісних показників стану хромосом та рівня хромосомних аберацій в мейозі при культивуванні.

2. Використання при оцінці якості деконсервованих і прокультивованих *in vitro* ооцитів корів цитогенетичного аналізу дозволяє встановити, що 63,4% з них після розморожування і культивування поза організмом досягали метафази-2 мейозу, а 23,2% мали хромосомні порушення.

3. Проведений порівняльний цитогенетичний аналіз ооцитів свиней за різних термінів культивування виявив, що подовження терміну культивування до 46 годин дозволило одержати більшу кількість ооцитів на стадії метафази II, порівняно з 18 та 32 годинами (60,4% проти 8,8% та 10,7%, відповідно).

Література

1. Руденко С.В. Роль і перспективи сучасних методів біотехнології в умовах інтенсифікації тваринництва / С.В. Руденко, О.Є. Гузеватий // Науково-технічний бюлетень.— Харків, 2008.— №96.— С. 44–49.

2. Яблонський В.А. Біотехнологія відтворення тварин: Підручник.— К.: Арістей, 2005.— 296 с.

3. Bazer F.W. Reproductive biology in the era of genomics biology / F.W. Bazer, T.E. Spencer // Theriogenology.— 2005.— Vol.64, №3.— P. 442–456.

4. Получение клонированных эмбрионов крупного рогатого скота при использовании в качестве цитопластов ооцитов, созревающих *in vitro* / К.В. Кириенко, А.Г. Логвинов, И.Г. Сметанина [и др.] // Актуальные проблемы биологии в животноводстве: четвертая междунар. конф.— Боровск, 2006.— С. 238–239.

5. Keefer C.L. Lessons learned from nuclear transfer (cloning) / C.L. Keefer // Theriogenology.— 2008.— Vol.69, №1.— P. 48–54.

6. Funahashi H. Advances in *in vitro* production of pig embryos / H. Funahashi, B.N. Day // Journal of reproduction and fertility. Supplement.— 1997.— Vol.52.— P. 271–283.

7. Гузеватий О.С. Методики оцінки якості ооцит-кумулясних комплексів корів для кріоконсервування / О.С. Гузеватий, П.А. Троцький, Ю.М. Собко // Методики наукових досліджень із селекції, генетики та біотехнології у тваринництві.— К.: Аграрна наука, 2005.— С. 180–187.

8. Tarkowski A.K. An air-drying method for chromosome preparation from mouse eggs / A.K. Tarkowski // Cytogenetics.— 1966.— Vol.5, №3.— P. 394–400.

9. Остаповець Л.І. Морфологічна та цитогенетична оцінка незрілих ооцитів свиней / Л.І. Остаповець // Вісник проблем біології і медицини.— 2008.— №1.— С. 42–47.

10. Cytogenetic evaluation of in vitro matured bovine oocytes collected from ovaries of individual donors / J. Sosnowski, M. ZwitoDski, D. Lechniak [et al.] // Theriogenology.— 1996.— Vol.45, №4.— P. 865–872.

11. Prather R.S. Practical considerations for the in vitro production of pig embryos / R.S. Prather, B.N. Day // Theriogenology.— 1998.— Vol.49, №1.— P. 23–32.

Резюме

Наведено результати експериментальних досліджень використання сучасних генетико-біотехнологічних методів оцінки якості гамет. Встановлено, що використання цитогенетичного методу оцінки дозволяє встановити ступінь мейотичної зрілості деконсервованих і прокультивованих гамет корів та закономірності перебігу мейозу в ооцитах свиней при дозріванні *in vitro*.

Приведены результаты экспериментальных исследований использования современных генетико-биотехнологических методов оценки качества гамет. Установлено, что использование цитогенетического метода оценки позволяет установить степень мейотического созревания деконсервированных и прокультивированных гамет коров и закономерности прохождения мейоза в ооцитах свиней при созревании *in vitro*.

The results of experimental researches the use of modern genetic-biotechnological methods estimation of quality gamets are resulted. It is set that the use of cytogenetics method estimation allows to set the degree of meiotic maturing of frozen-thawed and maturation gamets cows and mechanism passing of meiosis of porcine oocytes during maturation *in vitro*.

САВЕНКО Е.Г., ГЛАЗЫРИНА В.А., ШУНДРИНА Л.А.

*ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт риса
Россия, г. Краснодар, 350921, п/о Белозерное, E-mail: arrri_kub@mail.ru*

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЯНТАРНОЙ КИСЛОТЫ ДЛЯ КУЛЬТУРЫ ПЫЛЬНИКОВ РИСА *IN VITRO*

При длительном культивировании каллусов (более 50 дней) на искусственных питательных средах в условиях *in vitro* у них теряется способность к регенерации растений [16]. В опытах использовали янтарную кислоту (ЯК) (бутандиовая — двухосновная предельная карбоновая кислота), которая в настоящее время рассматривается как эффективный, дешевый и экологи-

чески чистый стимулятор роста, повышающий урожайность, устойчивость к стрессам. ЯК участвует в процессе клеточного дыхания, так как является промежуточным продуктом цикла Крепса (интермедият). Работает на уровне митохондрий, в природе образуется при экстремальных погодных воздействиях и наиболее эффективна в условиях стресса (холод, голод, *in vitro*).

ЯК усиливает интенсивность дыхания за счет накопления АТФ, увеличивает энергетический заряд, следовательно, усиливает процессы обмена веществ, повышает содержание хлорофилла и продуктивность.

Цель исследования

Определить влияние янтарной кислоты (ЯК) на процессы каллусообразования, регенерации и способность продлевать морфогенетические потенции у длительно культивируемого каллуса.

Изучалось 4 варианта искусственных питательных сред:

1 вариант — 1 мг/л 2,4-Д + 5 мг/л ЯК;

2 вариант — 1 мг/л 2,4-Д + 10 мг/л ЯК;

3 вариант — 1 мг/л 2,4-Д + 15 мг/л ЯК;

4 вариант — 1 мг/л 2,4-Д + 20 мг/л ЯК.

Контролем служила среда Блейдса, содержащая макро- и микросоли и 2 мг/л 2,4-Д.

Материал и методы

Использовали пыльники 11 гибридных комбинаций. В первой части исследований использовали каллусообразующую среду, содержащую ауксин 2,4-Д и обогащенную янтарной кислотой в различных концентрациях. Контролем служила среда Блейдса, содержащая 2 мг/л 2,4-Д. Вторая часть эксперимента включала культивирование андрогенных каллусов на искусственные питательные среды (ИПС), содержащие 1 мг/л α -НУК и 5 мг/л кинетин.

Работы велись по стандартной методике для культуры клеток и тканей *in vitro*, предусматривающей асептические условия культивирования.

Результаты и обсуждение

В ходе работы анализировали качество каллуса. Белые, плотные, компактные каллусы классифицировали как регенерационноспособные, дающие эмбриониды. Мягкие, рыхлые, желтоватые, влажные — нерегенерационноспособные каллусы [3, 7].

На каждый вариант инокулировано по 920 пыльников от гибридных комбинаций F₂. Каллус индуцировали 8 комбинаций (табл. 1).

В контрольном варианте из 8 комбинаций у 6 наблюдался процесс каллусообразования и варьировал от 0 до 15,0%. В среднем он составил 5,91%. В первом варианте из 8 комбинаций 7 продуцировали каллус — от 0% до 22,50%. В среднем — 8,76%. Во втором варианте также 6 комбинаций индуцировали каллус — 0–22,50%. В среднем он составил 7,72%. В третьем варианте 5 комбинаций индуцировали каллус — 0–22,50%. В среднем он составил 5,20%. В четвертом варианте 7 комбинаций индуцировали каллус — 0–16,25%. В среднем он составил 7,89%.

Таблица 1

Каллусообразование из пыльников риса на искусственных питательных средах, содержащих янтарную кислоту

Комбинация	Количество пыльников	Варианты питательных сред				
		контроль	1 вар.	2 вар.	3 вар.	4 вар.
F ₂ Неизв. х Линия (СП 11 х Лиман)	200	0	0	0	0	4,00
КСИ СУ-08 ВНИИР 10185	220	0,45	3,63	0	0	0
ВНИИР 10178 (КПСУ-04-37)	60	0	1,66	5,00	3,33	3,33
F ₂ д.253	60	8,30	1,66	13,33	5,00	13,33
ВНИИР 10178	160	10,63	16,88	13,13	22,50	10,00
F ₂ СП 1326-04 х Новатор	80	6,25	18,75	2,50	2,50	1,25
F ₂ (Рапан х Нарцисс) х СП 875-05	60	6,66	5,00	13,33	8,33	15,00
F ₂ д.126	80	15,00	22,50	22,50	0	16,25
Среднее		5,91	8,76	7,72	5,20	7,89

Таблица 2

Регенерация зеленых почек и регенерантов из пыльцевого каллуса на 60-70-е сутки культивирования

Комбинация	Количество зеленых почек и регенерантов				
	контроль	1 вар.	2 вар.	3 вар.	4 вар.
И.о. из КПСУ-03-324	0	3	0	0	0
F ₂ СП 1326-04 х Новатор	0	15	20	0	16
F ₂ д.253	0	0	30	30	0
F ₂ (Рапан х Нарцисс) х СП 875-05	0	0	15	0	0
Итого	0	18	65	30	16

Анализ результатов показал, что особых различий в каллусогенезе по вариантам нет. Но, нужно отметить, что в первом-четвертом вариантам ауксин 2,4-Д использовали в концентрации в 2 раза ниже, чем в контрольном варианте. При этом эффективность каллусообразования от применения сочетания 1 мг/л 2,4-Д с янтарной кислотой в различных концентрациях практически не отличается от результатов контрольного варианта.

Также нужно отметить тот факт, что каллусы, полученные на ИПС, содержащие ЯК, наиболее долго сохраняли регенерационные способности. Обычно на 40–50 сутки культивирования каллусы темнеют, некротизируются (отмирают). Каллусы же, полученные на средах с янтарной кислотой, даже на 70-е сутки регенерировали проростки (табл. 2).

Вывод

Комплексное применение 1 мг/л 2,4-Д и янтарной кислоты в концентрациях от 5 до 25 мг/л, как дешевого стимулятора деления клеток в культуре растительных тканей, можно рекомендовать для использования в технологиях *in vitro*.

Литература

1. Бутенко Р.Р. Культура изолированных клеток и тканей в селекции растений / Р.Р. Бутенко, Г.И. Тихонович и др. / Основы сельскохозяйственной биотехнологии, 1990.— С. 162–165.
2. Кучеренко Л.А. Каллусогенез, выход и характеристика регенерирующих растений риса в культуре тканей в зависимости от гормонального состава индукционной среды // Доклад РАСХН, 1993.— №4.— С. 3–6.
3. Круглова Н.Н. Морфогенетический потенциал спорогенных клеток пыльника злаков / Н.Н. Круглова, Т.Б. Батыгина, О.А. Сельдиминова / 2008.— С. 21.
4. Либберт Э. Физиология растений // М.: Мир, 1976.— С. 353–370.
5. Шевелуха В.С. Морфогенез в каллусных тканях // Сельскохозяйственная биотехнология, 1996.— С. 29–35.
6. Murashige I. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture / I. Murashige, F. Skoog // Plant Physiol.— 1962.— V.15.— P. 473–479.
7. Чупахина Г.Н. Янтарная кислота как результат ростовых процессов и биосинтеза аскорбиновой кислоты в растениях ячменя / Г.Н. Чупахина, А.Ю. Романчук / Тез. докл. конф. “Регуляторы роста и развития растений в биотехнологиях”, МСХА, 2001.— С. 73.

Резюме

Изучалось влияние комплексного использования 2,4-Д и янтарной кислоты на процессы каллусообразования и регенерации проростков из пыльников риса. Экспериментально установлено его положительное действие на процессы каллусогенеза и долгое сохранение регенерационных способностей у каллусов.

Influence of complex using of 2,4-D and succinic acid on processes of callus formation and regeneration of seedlings from rice anther was studied. Its positive effect on processes of callusogenesis and long storage of regenerative abilities of calluses was experimentally identified.

САМСОНОВА А.Е.¹, МАШКИНА О.С.^{1,2}, ТАБАЦКАЯ Т.М.¹, ИСАКОВ Ю.Н.¹

¹ФГУП НИИ лесной генетики и селекции

Россия, 394087, Воронеж, ул. Ломоносова, 105, e-mail: ilgis@lesgen.vrn.ru

²Воронежский государственный университет,

Россия, 394006, Университетская площадь, д.1, e-mail:

olga_mashkina@yahoo.com

ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ *IN VITRO* ЦЕННЫХ ГЕНОТИПОВ БЕРЕЗЫ

Взаимодействие всех частей растительного организма на внутриклеточном и организменном уровнях осуществляется с участием метаболической, генной, гормональной, электрофизиологической и трофической систем регу-

ляции. Основной системой управления являются гормоны. Образование и взаимодействие эндогенных регуляторов роста (фитогормонов) — одна из важных составных частей того комплекса физиолого-биохимических изменений, который определяет ход процесса развития растений. Рострегулирующие вещества играют ключевую роль в становлении организованной многоклеточной структуры растений. Они обеспечивают дифференциальное выражение признака в фенотипе. Взаимодействуя (прямо или опосредовано) с геномом клетки, фитогормоны могут исполнять роль медиаторов (посредников) в развитии. Под их контролем находятся физиологические и генетические программы, отвечающие за деление, растяжение клеток, дифференциацию побегов, корней и т.д. [1, 2]. Определенный фитогормон [3] влияет на экспрессию определенной генетической программы, в соответствии с которой, наряду с белками, обеспечивающими функциональную активность клеток активизируются вещества, воспринимающие сигнал (рецепторы), необходимые для активации других фитогормонов [3].

Установлено, что некоторые фитогормоны, влияя на экспрессию генов способны вызывать появление качественно новых белков. Существует мнение, что изучение генетического контроля дифференцировки растений связано с идентификацией и характеристикой генов, обуславливающих фитогормональный статус. Нарушение дифференцировки (в частности, образование опухоли) несут мутации в генах, контролирующих систему эндогенных регуляторов [3, 4]. Важным компонентом системы интеграции у растения является индолилуксусная кислота (ИУК), которая, полярно перемещаясь от верхушки побега к кончику корня, участвует в индукции и регуляции деления, растяжения, дифференциации, поляризации, питания клеток, в формировании базально-апикального рисунка в раннем эмбриогенезе, в формировании корневых волосков, росте гипокотыля, тропизме, индукции и формировании листьев [1, 2, 5]. По мнению многих исследователей [3], в процессе поддержания ауксинового гомеостаза вовлечено множество генов, что указывает на значимость этого гормона в развитии растений.

Немаловажное значение имеют и фенольные соединения. Они принимают участие в окислительном метаболизме растений в качестве доноров и активаторов водорода, в биосинтезе индолилуксусной кислоты и в окисляющих ее системах. Производные фенольных соединений фигурируют в качестве переносчиков в электронно-транспортной цепи. Некоторые из полифенолов и родственных им соединений — ингибиторы прорастания семян и роста растений [1, 6].

Целью наших исследований явилось изучение физиолого-биохимических аспектов культивирования *in vitro* ценных генотипов различных форм березы. В задачу исследований входило определение эндогенных рострегулирующих веществ индольной (ауксины) и фенольной (ингибиторы роста) природы.

Материалы и методы

Объектом исследования являлись: 1. Исходные деревья березы повислой (форма далекарлийская) и их микроразмноженные клоны, контрастные по

стабильности проявления признака разрезнолистности при культивировании в условиях *in vitro*: а) сохраняющие в процессе микроразмножения признак “разрезнолистности” и б) ревертирующие к нормальному фенотипу; 2. Исходные деревья карельской березы (узорчатая форма) и их микроразмноженные клоны, контрастные по способности к укоренению в условиях *in vitro*: а) трудноразмножаемые, формирующие вместо корней на протяжении нескольких лет (12 лет) культивирования *in vitro* каллусоподобное образование; б) легкоукореняемые, формирующие *in vitro* хорошо развитые корни и побеги с нормальным ростом и развитием.

Определение свободной (физиологически активной) фракции эндогенных регуляторов роста проводили биологическим методом (по росту отрезков coleoptилей пшеницы в длину) с предварительной хроматографической разгонкой эфирных экстрактов [7]. При разгонке хроматограмм использовали щелочную смесь *n*-бутиловый спирт : аммиак : вода в соотношении 100:3:18. В качестве биотеста служили coleoptили пшеницы “Мионовская 808”. Определение ауксинов и ингибиторов проводили в материале (побеги, почки, листья, корни, каллус), фиксированном в парах кипящей смеси этанол : вода (1:1). Пробы для анализа у исходных для микрклонального размножения деревьев отбирали в период вынужденного покоя и в момент введения их эксплантов (узловых сегментов с одной пазушной почкой) в культуру. У регенерантов использовали для анализа 30, 40 и 50-дневные растения.

Результаты и обсуждение

В результате проведенных исследований выявлены различия в содержании и балансе рострегулирующих веществ индольной и фенольной природы у двух размноженных *in vitro* клонов березы повислой разрезнолистной формы, контрастных по стабильности проявления признака “разрезнолистности”. Отмечена большая лабильность баланса фенольно-индольного комплекса у клона, ревертирующего в процессе микрклонального размножения к норме, в отличие от клона со стабильным проявлением признака разрезнолистности. Это свидетельствует о более глубоких и динамичных изменениях регуляторных функций рострегулирующих веществ и связанных с ними ростовых и формообразовательных процессов у клона, ревертирующего к норме. Установлено, что стабильность проявления признака “разрезнолистности” березы повислой в культуре *in vitro* во многом зависит от особенностей динамики содержания и баланса рострегулирующих веществ фенольной и, особенно, индольной (ауксины) природы исходных деревьев. По мере подготовки растений к культивированию более резко возрастают содержание и удельный вес ауксинов (в 7,8 раз — содержание, в 5–8 раз — удельный вес) у “ревертанта”, чем у дерева, стабильно сохраняющего признак “разрезнолистности” (в 1,65 и в 2,02 соответственно).

В процессе развития растений важным остается вопрос о детерминации дифференцировки. Как правило, основное разделение на органы и ткани происходит практически сразу и сохраняется при нормальном развитии растений вплоть до его естественной гибели, что говорит в пользу существования

детерминации. Однако, как показали наши исследования, имеются и исключения из этого правила. Под влиянием стресса, например, введения экспланта в культуру *in vitro* и микроклонального размножения (особенно через каллусные культуры), клетки способны возвращаться в недифференцированное состояние и повторно проводить дифференцировку в направлении, кардинально отличающемся от первичного. При всем разнообразии регуляторных систем, ответственных за развитие, важную роль в дифференцировке растений играют фитогормоны, в частности, ауксины и ингибиторы роста фенольной природы. Особенно наглядно это демонстрируют эксперименты в культуре изолированных органов и тканей.

Определение эндогенных регуляторов роста у микроразмноженных клонов карельской березы с нормальным побегообразованием и ризогенезом и у соматоклонального варианта, образующего вместо корней каллусоподобную структуру (“каллус”) позволило выявить существенные различия в динамике и балансе рострегулирующих веществ. Отмечено резкое повышение содержания ингибиторов фенольной природы и исчезновение ауксинов в побегах регенерантов мутантного клона по мере увеличения времени культивирования и сдвиг баланса регуляторов роста в “каллусе в сторону большего образования ауксинов.

Для корней регенерантов “нормального” клона характерен более широкий диапазон (4–6 зон против 2) ингибирования на хроматограммах, а для “каллуса” регенерантов мутантного клона более широкий диапазон (8 зон против 6) стимулирования. В побегах регенерантов мутантного клона содержание ауксинов, очевидно, не достигает той пороговой концентрации, которая необходима для появления корней, а наличие большого количества ингибиторов в почках, в свою очередь, тормозит ризогенез. Кроме того, больший удельный вес ауксинов в “каллусе” регенерантов мутантного клона одновременно с относительно более низким в нем уровнем ингибиторов, стимулируя интенсивный рост каллусной ткани, в целом, препятствует образованию корневых зачатков, т.к. для их закладки и роста тканей вообще и корней, в частности, необходимы различные концентрации и удельный вес ауксинов в общем балансе рострегулирующих веществ.

У исходных для микроклонального размножения деревьев карельской березы, контрастных по способности к укоренению в условиях *in vitro* (хорошо укореняющиеся, плохо или совсем не укореняющиеся) выявлены существенные различия между ними по индольно-фенольному комплексу веществ. Направленность баланса эндогенных регуляторов роста в сторону большего (в 2–3 раза) образования ауксинов и меньшего (в 4–5 раз) — ингибиторов четко прослеживается у большей части исследованных трудноразмножаемых *in vitro* деревьев. Однако, выявленная низкая способность к образованию корней у микропобегов различных деревьев, как показали наши исследования, может быть обусловлена и связана как с высоким (избыток), так и с низким (недостаток) содержанием ауксинов. Для инициации корнеобразования необходимы, по всей видимости, определенная концентрация

и, особенно, определенное соотношение эндогенных регуляторов роста индольной и фенольной природы, носящих индивидуальный характер, присущий тому или иному индивидууму, его органу или его части.

В культуре *in vitro* предшествующая онтогенетическая вариация клеточных популяций у исходных деревьев карельской березы, добавление экзогенных регуляторов роста в питательные среды, стресс (отсутствие регулирующего влияния со стороны целостного организма в результате изоляции экспланта) приводит к снижению органогенного потенциала клеток, нарушению гормонального равновесия в тканях эксплантов, нарушению контроля процесса ризогенеза и формированию аномальных структур (каллусоподобного образования вместо корней) у рамет клона.

Выявленная специфика образования и распределения рострегулирующих веществ у исходных деревьев, обуславливает в определенной степени специфику синтеза и распределения фитогормонов у микроразмноженных клонов, у которых отмечена тенденция к сохранению гормональной ситуации, наблюдаемой у исходных деревьев. Это может, наряду с другими факторами, определять способность клонов к корнеобразованию или определять характер образования корней (например, через апикальную меристему или “каллус”) при культивировании *in vitro*.

Выявлена ярусная изменчивость содержания ауксинов и ингибиторов фенольной природы в побегах трудноразмножаемых в условиях *in vitro* генотипов карельской березы. Направленность баланса фитогормонов в сторону уменьшения содержания ауксинов и увеличения ингибиторов (что коррелирует с гормональной ситуацией легкоукореняемых деревьев) четко прослеживается в побегах верхнего яруса кроны по сравнению со средним и, особенно, нижним ярусами. Показатели соотношения стимуляторы/ингибиторы равны: 0,29 — верхний, 2,36 — средний, 3,20 — нижний ярусы, что, в основном, и обуславливает наблюдаемый в условиях *in vitro* более высокий потенциал их к морфогенезу. В этой связи, при отборе “трудных” для культивирования *in vitro* деревьев ценных генотипов карельской березы необходимо учитывать, с целью повышения эффективности их клонального микроразмножения, ярусную изменчивость в содержании и балансе эндогенных регуляторов роста индольной и фенольной природы, обуславливающих, в конечном итоге, жизненный потенциал регенерантов и играющих, как отмечено выше, существенную роль в регенерации и морфогенезе растений в целом.

Выводы

Изучение эндогенных регуляторов роста у ценных генотипов березы повислой (форма разрезнолистная далекарлийская) и карельской (узорчатая форма), контрастных по стабильности проявления признака “разрезнолистности” и способности к корнеобразованию при культивировании *in vitro* позволило выявить различия в динамике содержания и балансе рострегулирующих веществ индольной (ауксины) и фенольной (ингибиторы роста) природы. На примере древесных показана и подтверждена их роль в

морфогенезе и регенерации растений с нормальным ростом и развитием в условиях *in vitro*.

Литература

1. Лихолат Т.В. Регуляторы роста древесных растений.— М.: Лесная промышленность, 1983.— 240 с.
2. Демкив О.П. Общие аспекты морфогенеза и его специфика у растений различной сложности / Рост растений и дифференцировка.— М.: Наука, 1981.— С. 206–225.
3. Лутова Л.А., Проворов Н.А., Тиходеев О.Н. и др. Генетика развития растений.— СПб.: Наука, 2000.— 539 с.
4. Лутова Л.А., Бузовкина И.С., Осипова М.А. и др. Коллекция инбредных линий редиса (*Raphanus sativus* var. *Radicula* Pers.) — модель для изучения генетики морфогенеза высших растений / Материалы съезда генетиков и селекционеров, посвященного 200-летию со дня рождения Ч. Дарвина, V съезд ВОГиС, ч. I.— М., 2009.— С. 149.
5. Полевой В.В. Роль ауксина в системах регуляции у растений.— Л.: Наука, 1986.— 80 с.
6. Сарану Л.П., Кефели В.И. Фенольные соединения и рост растений / Фенольные соединения и их биологическая функция.— М., 1969.— С. 129–135.
7. Кефели В.И., Турецкая Р.Х., Коф Э.М., Власов П.В. Определение биологической активности свободных ауксинов и ингибиторов роста в растительном материале / Методы определения фитогормонов, ингибиторов роста, дефолиантов и гербицидов.— М.: Наука, 1973.— С. 20–44.

Резюме

Проведено изучение эндогенных регуляторов роста у ценных генотипов березы повислой (форма разрезнолистная далекарлийская) и карельской (узорчатая форма), контрастных по стабильности проявления признака “разрезнолистности” и способности к корнеобразованию при культивировании *in vitro*. Выявлены различия в динамике содержания и балансе рострегулирующих веществ индольной и фенольной природы. Показана и подтверждена их роль в морфогенезе и регенерации растений с нормальным ростом и развитием в условиях *in vitro*.

Проведено вивчення ендогенних регуляторів росту цінних генотипів берези повислої (форма розрізнолиста далекарлійська) і карельської (узорчата форма), контрастних за стабільністю прояву ознаки “розрізнолистності” та здатності до укорінення при культивуванні *in vitro*. Виявлена різниця в динаміці вмісту і балансі ріст регулюючих речовин індольної та фенольної природи. Показана і підтверджена їх роль в морфогенезі та регенерації рослин з нормальним ростом і розвитком в умовах *in vitro*.

The study of endogenous growth regulators in valuable genotypes of *Betula pendula* ‘dalekarlika’ and Karelian birch (patterned form) was carried out. The birches are contrast as to stability in development of the character of “dissected leaves” and ability for root formation during *in vitro* cultivation. There were revealed some differences in the content dynamics and balance of substances regulating growth of both indole and phenol nature. Their role in morphogenesis and plant regeneration with normal growth and development *in vitro* conditions was shown and verified.

СЕРГЕЕВА Л.Е.¹, МИХАЛЬСКАЯ С.И.,¹ БРОННИКОВА Л.И.,¹
ГАМАЛЕЙ В.И.²

¹Институт физиологии растений и генетики НАН Украины
Украина, 03022, Киев, ул. Васильковская, 31/17; e-mail: Zlenko_lora@ukr.net

²Институт земледелия НААНУ України

Украина, Киевская обл., 08162, пгт Чабаны, ул. Машиностроительная, 2Б

ДЕЙСТВИЕ ОКСИАНИОНОВ ВОЛЬФРАМА И ВАНАДИЯ НА СОДЕРЖАНИЕ НИТРАТОВ И РОСТ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР СОИ

Ассимиляция нитратов — это фундаментальный процесс, присущий любому растительному организму, включая тех, которые способны усваивать атмосферный азот используя симбиоз с почвенными микроорганизмами. В усвоении нитратов задействованы как системы их поглощения/переноса, так и редукции. Абсорбция NO_3^- осуществляется посредством высокоаффинной транспортной системы (НАТС). Она характеризуется субстратной индуцибельностью, а также является мишенью отрицательного обратного ингибирования внутриклеточными соединениями [11, 12]. Абсорбированные клеткой нитраты метаболизируются ферментами цепи усвоения азота. Так непосредственно NO_3^- является субстратом нитратредуктазы (НР; К.Ф. 1.6.6.1) катализирующей реакцию $\text{N}^{5+} \rightarrow \text{N}^{3+}$. Таким образом, интегральные показатели: рост, продуктивность, качественные параметры зависят от стабильности всего процесса азотного метаболизма.

С другой стороны, установлены факторы, влияющие на отдельные звенья этого процесса. Так хлораты, попадая в клетку вследствие большой химической аналогии с нитратами, становятся субстратом для НР и восстанавливаются в хлорит. Токсичность последнего при достаточно продолжительном воздействии приводит к гибели растения. (Ранее, благодаря такому эффекту, хлораты широко использовались в качестве гербицидов [9]). Анион ClO_3^- переносится с помощью того же транспортера, что и NO_3^- и выступает лишь слабым неконкурентным ингибитором поглощения нитратов [6, 13]. *In vitro* хлорат постоянно используется для исследования активности НР; с его помощью отобрано большое количество мутантных клеточных линий и растений с низкой активностью НР, дефектных по НР — устойчивых к ClO_3^- [5, 8].

Влияют на нитратредуктазную активность и ионы тяжелых металлов (ИТМ), в частности вольфраматы и ванадаты. Так добавление вольфрамата к культуральной среде снижало активность НР и содержание нитратов в листьях сои [10]. Внесение 150 мкМ ванадата в питательный раствор вызвало быстрое снижение активности НР в листьях табака, которая после 24 часов воздействия составляла всего 5% от контроля. Падение активности фермента сопровождалось убылью содержания белка и увеличением уровня нитратов [7].

В наших экспериментах были получены клеточные линии сои (сорта Киевская — 27; КС — 27 №3; КС — 27 №5), устойчивые к летальным для

клеточных культур дикого типа концентрациям вольфрамат-аниона [3]. Данные клоны отличаются стабильным ростом на селективных средах с ионом WO_4^{2-} более 5 лет. Эти линии демонстрируют также устойчивость к ванадату и хлорату. Поскольку жизнеспособность каллюса обеспечивалась за счёт метаболизма нитратов целесообразно было измерить содержание этого аниона в клетках.

Материалы и методы

Объектом исследования были клеточные линии сои, отобранные на селективной среде, содержащей ионы вольфрамата в летальной для культуры клеток дикого типа концентрации. До начала эксперимента клоны пассировали в таких стрессовых условиях. Для исследования содержания нитратов каллюс переносили на среду, содержащую летальную дозу VO_3^- , а также на среду с хлоратом калия. Жизнеспособность клеток оценивали, измеряя относительный прирост их биомассы (Δm): $\Delta m = (m_k - m_n) / m_n$; где m_n — масса каллюса в начале пассажа; m_k — масса каллюса в конце пассажа. Содержание нитратов определяли потенциометрическим методом с помощью ионселективных электродов в водной вытяжке из сырой каллюсной массы [2]. Соотношение растительный материал/вода 1:5.

Результаты и обсуждение

В таблице приведен относительный прирост биомассы каллюса, растущего на средах, содержащих летальные концентрации токсикантов.

Однако, культуральные среды существенно различались и по азотному составу. Среда с добавками ионов тяжелых металлов содержали только нитратную форму азота, тогда как среда с хлоратом в своем составе имела только аммиачную. Такое сочетание азот/токсикант вызывало гибель контроля (табл.). В тоже время общий летальный исход происходил вследствие противоположных причин. В первом случае, (в присутствии ионов вольфрама и ванадия) причина гибели клеточной культуры дикого типа заключалась в разрыве цепи усвоения азота — реакции на прямое воздействие анионов на НР. Полная инактивация фермента останавливала процесс редукции нитратов, что, в свою очередь, приводило к исчерпанию азотного пула, необходимого для синтеза белков и пролиферации клеток. На это

Таблица

Относительный прирост биомассы (Δm^*) клеточных культур сои при культивировании в различных стрессовых условиях

Среда линия	Δm^*			
	B_5	$B_5 + VO_3^-$	$B_5 + WO_4^{2-}$	$B_5 + ClO_3^-$
КС-27 №3	0,200±0,040	0,850±0,090	0,810±0,060	2,96±0,880
КС-27 №5	0,680±0,130	0,590±0,190	0,990±0,070	1,705±0,001
Контроль	0,480±0,190	-	-	-

* Примечание: B_5 — контрольная среда; $B_5 + VO_3^-$ — среда B_5 с добавлением 1 мМ (V^{5+}); $B_5 + WO_4^{2-}$ — среда B_5 с добавлением 1 мМ (W^{6+}); $B_5 + ClO_3^-$ — среда B_5 с добавлением 1 мМ 20 мМ хлората калия.

указывают и другие авторы [3, 7]. При добавлении хлората гибель клеточной культуры контроля была обусловлена внутриклеточным накоплением хлорита, а не дефицитом азота, поскольку селективная среда содержала только аммиачную форму азота. Нормальное функционирование НР способствовало росту уровня эндогенного хлорита вплоть до летальной концентрации.

Рост устойчивых клеточных линий сои на селективных средах, содержащих нитратную форму азота и анионы вольфрамата либо ванадата, свидетельствует об активной ассимиляции азота. Этот процесс сохраняется в течении всего пассажа, что прослеживается по динамике изменений уровня белка [4]. Данное событие является прямым следствием функционирования НР. Данные гистограммы свидетельствуют о поглощении нитратов.

Видно, что содержание нитратов в клетках устойчивых линий сои при культивировании в стрессовых условиях увеличивается. При этом уровень нитратов в клетках, растущих на средах с добавлением VO_3^- выше, чем в клетках, культивируемых в условиях действия WO_4^{2-} . Повышенное содержание нитратов при стрессе может выступать защитной реакцией [1]. Это также полностью коррелирует с динамикой синтеза белка.

Такое высокое (относительно показателей, измеренных на контрольной среде) значение уровня NO_3^- может указывать на то, что у отобранных клеточных линий сои ионы WO_4^{2-} и VO_3^- стимулируют транспорт нитратов, делая их более доступными для последующей редукции ферментом — “модифицированной” нитратредуктазой.

В пользу гипотезы о появлении такой нитратредуктазы свидетельствуют два аргумента. Во-первых, активное восстановление нитратов в условиях, которые вызывают инактивацию “обычного” фермента и гибель организма дикого типа (культивирование в присутствии вольфрамат- и ванадат-анионов). Во-вторых, рост клеточных линий на среде с хлоратом. Последнее возможно в случае отсутствия (низкой концентрации) хлорита, вследствие

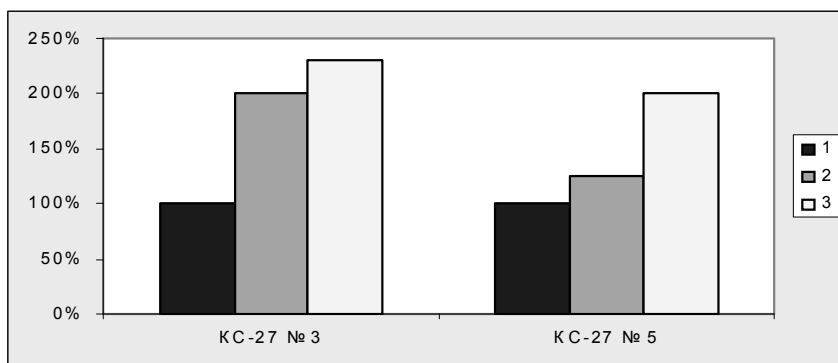


Рис. Содержание нитратов (в % к контролю) в клетках устойчивых линий сои, при культивировании в стрессовых условиях: 1 — контрольная среда; 2 — среда с добавлением WO_4^{2-} ; 3 — среда с добавлением VO_3^-

более высокой субстратной специфичности новой модификации НР. Не исключена также возможность быстрой детоксикации хлорита, вследствие его разложения. Это событие, однако, менее вероятно, поскольку концентрация хлорита все время возрастает.

Возможно, также существование нескольких изоформ фермента, функционирующих в зависимости от культуральной среды. О вероятности реализации такого события указывают и другие авторы [14].

Выводы

1. Клеточные линии сои, устойчивые к ионам VO_3^- WO_4^{2-} , при культивировании на селективных средах с ионами тяжелых металлов накапливают нитраты в количествах в 1,25–2,3 раза больше чем при культивировании в нормальных условиях, что может выступать защитной реакцией на стрессовое воздействие, создаваемое средой.

2. Уровень нитратов в клетках при культивировании на средах с ванадатом выше, чем при культивировании на средах с вольфрамом.

3. Уровень накопления нитратов коррелирует с динамикой синтеза белка клетками, выращиваемыми в условиях стресса, создаваемого ионами тяжелых металлов.

Литература

1. Львов Н.П. Молибден в ассимиляции азота у растений и микроорганизмов.— М. “Наука”, 1989.— 86 с.

2. Плеваков Б.П. Практикум по биохимии растений.— М.: Колос, 1985.— 255 с.

3. Сергеева Л.С., Михальська С.І. Дія оксианіонів вольфраму та ванадію на клітинні лінії тютюну і сої // Приемы повышения урожайности растений: от продуктивности фотосинтеза к современным биотехнологиям. Сб.тр.межд. научно-практ. конференции памяти проф. С.И. Лебедева.— Киев: НАУ, 2003.— С. 167–169.

4. Тищенко Е.Н., Михальская С.И., Сергеева Л.Е. RAPD — анализ клеточной линии сои с перекрестной устойчивостью к оксианионам вольфрама и ванадия // Цитология и генетика. 2009.— Т.43, №4.— С. 39–44.

5. Buchanan R.J., Wray J.L. Isolation of molybdenum cofactor defective cell lines of *Nicotiana tabacum* // MGG.— 1982.— P. 228–2348.

6. Deane — Drummond C.E., Glass A.D.M. Nitrate uptake into barley (*Hordeum vulgare*) plants. A new approach using $^{36}\text{ClO}_3^-$ as an analogue for NO_3^- // Plant Physiology.— 1982.— 70.— P. 50–54.

7. Deng M., Moureaux T., Caboche M. Tungstate a molybdate analog inactivating nitrate reductase, deregulates the expression of the nitrate reductase structural gene // Plant Physiology.— 1989.— P. 304–309.

8. Evola S.V. Chlorate-resistant variants of *Nicotiana tabacum* L. I. Selection *in vitro* and phenotypic characterization of cell lines and regenerated plants // MGG.— 1983.— 189.— P. 447–454.

9. Guy M., Zabala G., Filner P. The kinetics of chlorate uptake by XD tobacco cells // Plant Physiology.— 1988.— 86.— P. 817–821.

10. Harper I.E., Nicholas I.C. Nitrogen metabolism of soybean // Plant Physiology.— 1978.— 62.— P. 662–664.

11. Lee R.B., Rudge K.A. Effects of nitrogen deficiency on the absorption of nitrate and ammonium by barley plants // Ann. Botany.— 1986.— 57.— P. 471–486.

12. *Siddigi M.Y., Glass A.D.M., Ruth T.I., Fernando M.* Studies of the regulation of nitrate in barley. I. Kinetics of $^{13}\text{NO}_3^-$ influx // *Plant Physiology*.— 1989.— 93.— P. 1426–1432.
13. *Siddigi M.Y., King B.I., Glass A.D.M.* Effects of nitrite, chlorate, and chlorite on nitrate uptake and nitrate reductase activity // *Plant Physiology*. 1992.— 100.— P. 644–650.
14. *Wu S., Win Lu, Kris A.L., Harper J.E* Identification of DNA clones corresponding to two inducible nitrate reductase genes in soybean: analysis in wild type and nr 1 mutant // *Plant Mol. Biol.*— 1995.— 29.— P. 491–506.

Резюме

Исследовали клеточные линии сои, отобранные на селективной среде, содержащей ионы WO_4^{2-} в летальной для обычной клеточной культуры концентрации. Клеточные линии росли также в присутствии летальных доз VO_3^- и ClO_3^- . Содержание нитратов в клетках возрастало при культивировании на средах с анионами тяжелых металлов. Максимальный уровень отмечен при культивировании клеточных линий на среде с добавлением VO_3^- . Уровень нитратов коррелировал с содержанием белка.

Досліджували клітинні лінії сої, відібрані на селективному середовищі, яке містило іони WO_4^{2-} у летальній для звичайної клітинної культури концентрації. Клітинні лінії росли також в присутності летальних доз VO_3^- і ClO_3^- . Вміст нітратів у клітинах зростає під час культивування на середовищах з аніонами важких металів. Максимальний рівень відзначено при культивуванні клітинних ліній на середовищі із додаванням VO_3^- . Рівень нітратів корелював із вмістом білка.

The soybean cell lines selected on medium with the lethal to ordinary cell cultivars concentration of the WO_4^{2-} ions, there were investigated. Cell lines grew at presence of lethal doses of VO_3^- and ClO_3^- ions too. The intracellular nitrates contents increased during cultivation under heavy metal-anions pressure. The top level was marked in cell lines during their cultivation on medium with the addition of VO_3^- . The level of nitrates correlates with the protein contents.

АДАМЧУК-ЧАЛАЯ Н.И.¹, ТИТОВА Л.В.², ИУТИНСКАЯ Г.А.²

*¹Институт ботаники им. Н. Г. Холодного НАН Украины,
Украина, 01601, Киев, ул. Терещенковская, 2, e-mail: m_nv@mail.ru*

*²Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины,
Украина, Д03680, Киев, ГСП, ул. Заболотного, 154, e-mail: cenoza@serv.imv.kiev.ua*

ОСОБЕННОСТИ МИКРОБНОГО ПЕЙЗАЖА РИЗОСФЕРЫ СОИ ПРИ ПРИМЕНЕНИИ РАЗЛИЧНЫХ БИОПРЕПАРАТОВ

Одной из наиболее актуальных в почвенной и сельскохозяйственной микробиологии является проблема микробно-растительных взаимоотношений. Важный аспект этой проблемы — колонизация почвенными микроорганизмами поверхности корня и почвы прикорневой зоны. Корни в почве окружены плотно прилегающими минеральными частицами и почвенными коллоидами. В таком субстрате микрофлора организована пространственно-градиентно (Buckley et al., 2003; Hinsinger et al., 2005; Watt et al., 2006). Непосредственно на корнях обитают микроорганизмы, которые существуют в градиенте корневых выделений. Концентрированный максимум такого градиента приходится на поверхность корней и резко падает по мере удаления от корня. Падение градиента вызвано диффузией корневых выделений в рыхло-непрерывный субстрат, которым и является почва, а также непрерывным поглощением доступных органических веществ всей почвенной микробиотой. Следствием такой пространственной организации растения в субстрате является организация субстратной микрофлоры (Buckley et al., 2003; Whalley et al., 2005). Выделяют такие зоны распределения: непосредственно на корнях — ризоплана, в первых миллиметрах от корней — прикорневая, несколько далее — ризосфера. В свою очередь, на корнях микроорганизмы тоже располагаются по градиенту концентраций питательных веществ и фитонцидов. Принципиально такая же организация системы растения-субстрат имеет место и в других ареалах обитания (иле водоёмов, прибрежном песке и т.д.) (Young et al., 1998; Greaver et al., 2007). Проблема возникает при изучении самой биологии сосуществования микроорганизмов с растением. Термин «ризосфера» несёт совершенно чётко определённую смысловую нагрузку, неразрывно связанную с экологией растений (Hinsinger et al., 2005; Whalley et al., 2005). Ассоциированные с растением микробные сообщества являются живыми системами, которые подвергаются влиянию внешних факторов, что ведёт как к качественным, так и количественным изменениям в сообществе микроорганизмов. В природных условиях такие самоорганизующиеся микробные ценозы функционируют успешно (хотя познанию их и попыткам управления ими уделяют очень большое внимание) (El-Shatnawi et al., 2001; Gregory, 2006). Мониторинг микроорганизмов в их естественной среде обитания необходим для лучшего понимания микробных экосистем и стратегий их выживания, что важно, в том числе, и для оценки

риска введения ГМ микроорганизмов в естественные сообщества (Roszak & Colwell, 1987; Akkermans et al., 1994), а также эффективности интродукции хозяйственно-полезных микроорганизмов — биоагентов микробных препаратов. С практической и теоретической точек зрения представляет интерес изучение влияния на колонизацию микроорганизмами ризосферы различных агрономических мероприятий, в частности, инокуляции. Для эффективного управления микробными популяциями необходимо также знать особенности развития и взаимодействия микроорганизмов разных групп в ризосфере.

Однако, возможности мониторинга микроорганизмов имеют ряд принципиальных ограничений, поскольку микроорганизмы, которые могут быть изолированы из микробного сообщества на отдельных питательных средах, составляют лишь малую часть микробного сообщества почв (Kaeberlein T., et al., 2002; Totte J.R., et al., 2003). Микробные ценозы очень гетерогенны и состоят из клеток с самыми разнообразными метаболическими способностями. И на сегодняшний день не существует подходов к работе с микробными сообществами в их естественной ненарушенной уникальной структуре.

Целью настоящей работы было изучение процессов колонизации ризосферы сои микроорганизмами и состояния микрофлоры корня под влиянием инокуляции с использованием прямых микроскопических методов в сочетании с новыми методологическими подходами. Мы попытались, исходя из современных возможностей, создать необходимую технологию, совмещающую работу с микробным ценозом в его естественной архитектуре с использованием современных техник с разными уровнями разрешения. Анализ микробного пейзажа ризосферы сои проводили с использованием шадящей методики (Кордюм и др., 2008, 2009), позволяющей работать с ценозом в его нативной архитектуре.

Материалы и методы

В работе изучали серую лесную почву ризосферы сои сорта Алиса. Опыты проводили в полевых условиях (Киевская обл., Украина). Исследовали образцы ризосферной почвы вариантов с традиционной моноинокуляцией семян гомологичными ризобиями *Bradyrhizobium japonicum*, с бинарной инокуляцией семян ризобиями совместно с фосфатмобилизующими бациллами *Bacillus megaterium*, а также контрольного варианта без инокуляции.

Для изучения пространственной структуры ризосферного микробного ценоза сои в фазе развития 2–3 настоящих листьев в течение 3 суток проводили экспозицию лавсановых пленок в корневой зоне растений. Затем лавсановые пластинки вынимали из почвы, при этом сохранялась целостность сформированной на поверхности обрастания микробной ассоциации. Каждую отдельную пластинку фиксировали в парах 37% формалина в течение 1 часа, высушивали в эксикаторе с притёртой крышкой, содержащем 80 шариков силикагеля (3–4 мм в диаметре каждый) в течение 48 часов. После этого пластинку наклеивали на металлический столик силикатным клеем с алюминиевой стружкой и осуществляли напыление золота, толщина напы-

лённого слоя составляла 15–20 А. Работы проводили на сканирующих электронных микроскопах Jeol JSM 35С и Jeol JSM 6060LA. Поля зрения фотографировали последовательно, с перекрыванием. В дальнейшем фотографии совмещали в пейзажную панораму (Adobe Photoshop CS, version 8.0) и подвергали статистической обработке по программе STAT.

Результаты и обсуждение

Проведение исследований с применением электронной сканирующей микроскопии позволило составить пейзажную панораму микробного ценоза ризосферы сои (рис. 1).

На панорамном пейзаже акцептировались клетки ризобий, располагающиеся на биопленке как дисперсно, так и в виде контактных групп из 2–5-ти бактерий. Были зафиксированы межклеточные контакты участников ценоза и количественно-морфологические характеристики доминирующих популяций бактерий пленок обрастания в ризосфере сои разных вариантов.

Исследовали по 10 полей зрения на 5-ти участках биопленки на расстоянии 1 мм друг от друга для каждого варианта (таблица).

По результатам микроскопических наблюдений наибольшее количество клеток на 100 мкм² наблюдалось в варианте с двойной инокуляцией, в остальных вариантах эта величина была в 1,3–1,4 раза меньше.

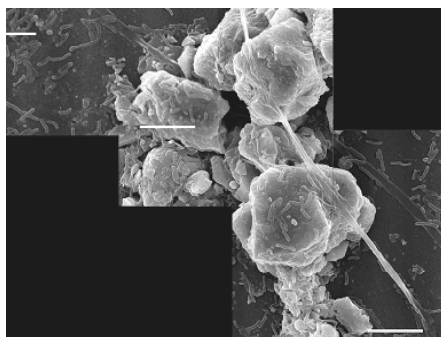


Рис. 1. Микробный пейзаж ризосферы сои, инокулированной ризобиями, шкала 10 мкм

Таблица

Численность и морфологические характеристики бактерий пленок обрастания в ризосфере сои

Вариант	Количество клеток на 100 мкм ²	Средние размеры клеток доминирующей популяции, мкм	
		длина	ширина
Контроль	17,83±1,22	1,52±0,11	0,42±0,01
Инокуляция ризобиями	19,71±2,03	2,24±0,13	0,52±0,02
Двойная инокуляция	25,54±2,26	1,98±0,11	0,62±0,03

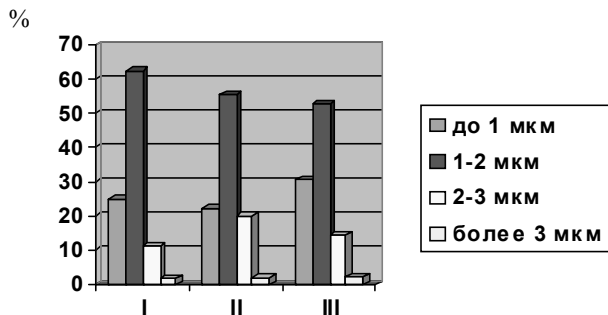


Рис. 2. Морфологическая структура доминирующих популяций бактерий в ризосфере сои при применении биопрепаратов:

I — двойная инокуляция, II — инокуляция ризобиями, III — контроль (без инокуляции)

В контрольном варианте доминировали мелкие клетки со средней длиной и шириной палочки в пределах нормы вариации аборигенной микрофлоры. В варианте с моноинокуляцией ризобиями средняя длина доминирующей бактерий возрастала в 1,5 раза, ширина увеличивалась на 0,1 мкм. В варианте с двойной инокуляцией доминирующая популяция бактерий была представлена палочками со средней длиной и шириной большей, чем в контроле. При этом, в сравнении с моноинокуляцией длина палочек несколько уменьшалась, а ширина — увеличивалась.

Обобщение этих результатов позволило установить распределение популяций бактерий по их длине (рис. 2).

Показано, что размеры клеток ризосферных микробных комплексов сои колебались в пределах нормы, характерной как для чистых культур, использованных нами для инокуляции, так и для аборигенных ассоциаций. Анализ пленок обрастания в ризосфере сои проведен в щадящем режиме, без разрушения контактных групп, с использованием пейзажных панорам, что позволяет исследовать все морфологическое разнообразие компонентов микроассоциаций.

Выводы

Разработан новый подход, позволяющий определить морфологическое разнообразие бактериальных клеток в ненарушенных бобово-ризобияльных сообществах, базирующийся на использовании сканирующей электронной микроскопии. Структурный анализ составленных пейзажных панорамных снимков микробных ценозов ризосферы сои в их нативной архитектуре показал увеличение количества и морфологических параметров доминирующих популяций бактерий при применении исследованных биопрепаратов.

Литература

1. Akkermans A.D.L., Mirza M.S., Hermie, Harmsen H.J.M., Blok H.J., Herron P.R., Sessitsch A., Akkermans W.M. Molecular ecology of microbes: A review of promises, pitfalls and true progress / FEMS Microbiology Reviews.— 1994.— 15.— P. 185–194.

2. *Buckley D.H.&Schmidt T.M.* Diversity and dynamics of microbial communities in soils from agro-ecosystems // *Environmental Microbiology*.— 2003.— 5, N6.— P. 441–452.
3. *El-Shatnawi M.K.J.&Makhadmeh. I.M.* Ecology of the plant-rhizosphere system. Review J. *Agronomy&Crop. Science*.— 2001.— 187.— P. 1–9.
4. *Greaver T.L.&Sternberg L.S.L.* Fluctuating deposition of ocean water drives plant function on coastal sand dunes // *Global Change Biology*.— 2007.— 13.— P. 216–223.
5. *Gregory P.J.* Roots, rhizosphere and soil: the route to a better understanding of soil science? // *European Journal of Soil Science*.— 2006.— 57.— P. 2–12.
6. *Hinsinger P., Gobran G.R., Gregory P.J., Wenzel W.W.* Rhizosphere geometry and heterogeneity arising from rootmediated physical and chemical processes // *New Phytologist*.— 2005.— 168.— P. 293–303.
7. *Kaerberlein T., Lewis K., Epstein S.S.* Isolating “uncultivable” microorganisms in pure culture in a simulated natural environment // *Science*.— 202.— 296.— P. 1127–1129.
8. *Roszak D.B., Colwell R.R.* Survival Strategies of Bacteria in the Natural Environment. *Microbiological Reviews*.— 1987.— 51.— P. 365–379.
9. *Torre J.R., Brett M., Goebel E., Friedmann I., Pace N.R.* Microbial diversity of cryptoendolithic communities from the McMurdo Dry Valleys, Antarctica // *Applied and Environmental Microbiology*.— 2003.— 69.— P. 3858–3867.
10. *Whalley W.R., Riseley B., Leeds-Harrison P.B, Bird N.R.A., Leech P.K., Ad-derley W.P.* Structural differences between bulk and rhizosphere soil // *European Journal of Soil Science*.— 2005.— 56.— P. 353–360.
11. *Watt M., Hugenholtz P., White R., Vinal K.* Numbers and locations of native bacteria on field-grown wheat roots quantified by fluorescence *in situ* hybridization (FISH) // *Environmental Microbiology*.— 2006.— 8, N5.— P. 871–884.
12. *Кордюм В.А., Мошинец Е.В., Цапенко М.В., Адамчук-Чалая Н.И., Иродов Д.М., Андриенко В.И.* Микроорганизмы ризосферы — полный мониторинг // *Грунтознавство*.— 2008.— Т.9, №1–2.— С. 53–63.
13. *Кордюм В.А., Шпилевая С.П., Мошинец Е.В., Адамчук-Чалая Н.И., Иродов Д.И., Андриенко В.И.* Биополимеры и клетки в измерении архитектуры микроценозов. 1. Феноменология // *Биополимери і клітина*.— 2009.— Т.25, №2.— С.150–166.

Резюме

В настоящей работе применен принципиально новый подход к изучению субстратных микробных ценозов бобово-ризобияльного симбиоза в нативной архитектуре. Структурный анализ пейзажных панорамных снимков биопленок обрастания показал увеличение количества и морфологических параметров доминирующих популяций бактерий при применении биопрепаратов.

У представлений роботі застосовано принципово новий підхід до вивчення субстратних мікробних ценозів бобово-ризобіального симбіозу в нативній архітектурі. Структурний аналіз пейзажних панорамних знімків біоплівок обрастання показав збільшення кількості та морфологічних параметрів домінуючих популяцій бактерій при застосуванні біопрепаратів.

In this work the principal new method of substrat microcenesosis in soybean-rhizobial symbiosis in their native structure was provided. Structural analysis of view panoramic biofilms presents the increase of number and morphological parameters of dominated bacterial populations under biopreparation using.

**АХТЕМОВА Г.А., ШТАРК О.Ю., ПЕРШИНА Е.В., ПИНАЕВ А.Г.,
АНДРОНОВ Е.Е., БОРИСОВ А.Ю., ТИХОНОВИЧ И.А.**

*ГНУ ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии Россельхозакадемии,
Россия, 196608, Санкт-Петербург, ш. Подбельского, д.3,
e-mail: ahgulya@yandex.ru*

СОЗДАНИЕ НОВЫХ МНОГОКОМПОНЕНТНЫХ МИКРОБНЫХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ АДАПТИВНОГО СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОГО ПРОИЗВОДСТВА

Известно, что полезные почвенные микроорганизмы улучшают минеральное питание и водный статус растений, синтезируют физиологически активные вещества — стимуляторы роста, предотвращают развитие патогенной микрофлоры в ризосфере, а также обеспечивают ряд важных признаков плодородия почвы [1–3]. Кроме того, показано, что различные полезные почвенные микроорганизмы могут проявлять синергизм, как в отношении друг друга, так и при воздействии на растение [4, 5].

Бобовые растения, являющиеся ключевым компонентом технологий адаптивного растениеводства (<http://www.grainlegumes.com/aep/>), формируют, по крайней мере, два типа мутуалистических эндосимбиозов: азотфиксирующий симбиоз с клубеньковыми бактериями и арбускулярную микоризу с грибами отдела *Glomeromycota*. Оба симбиоза характеризуются высокой степенью интеграции генетических систем партнеров и в значительной степени контролируются растением [6, 7]. Кроме того, бобовые образуют эктосимбиозы, или так называемые ассоциативные симбиозы, с различными полезными ризосферными бактериями, которые объединены под термином PGPR (*Plant Growth-Promoting Rhizobacteria* — ризобактерии, стимулирующие рост растений) [1, 4, 5, 8, 9, 10]. Изучение генетического контроля формирования различных симбиозов бобовых привело к заключению, что бобовые обладают единой генетической системой, контролирующей развитие многокомпонентной растительно-микробной системы [7, 9–11].

Таким образом, становится очевидной возможность практического использования в сельском хозяйстве взаимовыгодных многокомпонентных растительно-микробных систем. Введение в сельскохозяйственную практику потенциала растительно-микробных взаимодействий означает, прежде всего, удаление и уменьшение роли синтетического компонента, и замену его натуральными компонентами, в том числе, биологическими микробными препаратами [5, 8, 10, 12].

Успешным примером многокомпонентного микробного препарата является “БисолбиМикс”, разработанный авторами в сотрудничестве с инновационной компанией “Бисолби-Интер”, содержащего высокоэффективные штаммы клубеньковых бактерий, полезных ризосферных бактерий и изоляты грибов арбускулярной микоризы из коллекций ГНУ ВНИИСХМ и “Бисолби-Интер” [13]. В полевых условиях была показана высокая эффективность этого препарата при использовании, как под бобовые [14], так и небобовые

культуры. В качестве субстрата-носителя в препарате используется фильтрационно-мочный осадок (ФМО) — отход производства сахара из сахарной свеклы, представляющий собой смесь фильтрационного осадка (ФО), или дефеката, и почвы. Первоначально использовали ФМО с сахарного завода пос. Сотницыно Рязанской области. Однако в связи с тем, что транспортировка субстрата требует значительных финансовых расходов, возникает необходимость перехода на региональное производство “БисолбиМикс” на основе ФМО местных сахарных заводов.

Вместе с тем, в последнее время все большее количество сельскохозяйственных угодий выводится из оборота в связи с загрязнением или складированием на них производственных отходов. В частности, свежие ФО составляют 8–12% от веса перерабатываемой свеклы, содержат до 60% влаги и около 30% извести; они локализованы вокруг промышленных предприятий по переработке сахарной свеклы и представляют собой значительные ареалы загрязнения почвенного покрова. На типовом сахарном заводе таких отходов накапливается до 90–120 тыс. тонн ежегодно [15, 16]. После высушивания ФО становятся рыхлой, легко рассыпчатой массой, с влажностью до 20–30% и технологически пригодными для внесения в почву. В таком виде дефекат целесообразно применять в качестве эффективного и дешевого мелиоранта на кислых и слабокислых почвах для коррекции pH и обеспечения более высоких урожаев сельскохозяйственных культур [15, 17]. ФМО являются более богатым субстратом для развития различных групп микроорганизмов, включая микробные консорциумы аборигенных почв районов произрастания сахарной свеклы и, следовательно, являются более интересным и перспективным объектом для использования в качестве субстрата-носителя при приготовлении микробиологических удобрений [10].

Цель данной работы состояла в исследовании ФМО с различных сахарных заводов РФ как потенциального компонента (субстрата-носителя) многокомпонентного микробного препарата.

Материалы и методы

В данной работе исследовали отвалы, образованные при складировании фильтрационно-мочного осадка с полей фильтрации ряда сахарных заводов из различных регионов России (Рязанская обл., Орловская обл., республика Башкирия). Для анализа, как правило, отбирали образцы свежих отвалов 1–3-х лет складирования, которые характеризовались редкой и скудной растительностью, образцы овалов среднего возраста 5–10-ти лет складирования и более поздних отвалов — 20–30-ти летнего складирования, покрытые разнообразной травяной растительностью.

Общую численность и таксономическое разнообразие культивируемых микроорганизмов учитывали традиционными методами на твердых агаризованных средах (глюкозопептонный агар, крахмалоаммиачный агар). Идентификацию штаммов бактерий, выделенных из образцов ФМО, определяли путем амплификации гена 16SpPHK методом ПЦР с последующим клонированием и секвенированием нуклеотидных последовательностей с исполь-

зованием автоматического капиллярного секвенатора CEQ8000 и реагентов фирмы Beckman Coulter (США). Таксономическое положение исследуемых штаммов определяли на основании сравнения полученных последовательностей с базой данных GeneBank, с использованием программы BLAST [18]. Для определения в образцах ФМО наличия азотфиксирующих бактерий и грибов арбускулярной микоризы были поставлены вегетационные опыты с растениями из семейства злаковых (гибрид сорго и суданской травы, *Sorghum sp.*) и бобовых (горох посевной, *Pisum sativum* L.).

Результаты и обсуждение

Был проведен агрохимический анализ образцов ФМО и анализ содержания тяжелых металлов. В ходе исследований было установлено, что отвалы во всех регионах характеризуются средними значениями агрохимических показателей, содержание тяжелых металлов ниже предельно-допустимых норм.

Было показано, что для свежих отвалов характерна низкая биологическая активность, щелочная реакция (рН от 8 до 9) и довольно высокое содержание бактерий (10^7 – 10^8 КОЕ в 1 г субстрата). Причем бактериальное сообщество характеризовалось низким уровнем разнообразия с преимуществом в доминировании грамположительных неспорообразующих бактерий (актинобактерий) из родов — *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Rhodococcus*. Как известно, эти бактерии являются пионерами заселения экстремальных зон с труднодоступными питательными веществами [19, 20].

В свежих залежах ФМО, образованных на сахароперерабатывающих заводах республики Башкирия, не было установлено наличия аборигенных симбиотических микроорганизмов, таких как грибы арбускулярной микоризы и клубеньковые бактерии. В свежих отвалах Орловской и Рязанской областей практически не происходило микоризации растений, а на корнях гороха (*P. sativum*) было сформировано небольшое число клубеньков, что в итоге объяснило невысокий урожай.

Отвалы более позднего срока, которые складировались 10–30 лет, отличались слабощелочными и нейтральными значениями рН, с высокой биологической активностью по разложению целлюлозы, средними значениями общего количества гетеротрофных бактерий (10^6 КОЕ в 1 г субстрата), с довольно широким уровнем разнообразия. В бактериальном сообществе таких отвалов доминировали как грамположительные, так и грамотрицательные ризосферные микроорганизмы из рода *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes* и *Bacillus*. Эти бактерии из группы PGPR колонизируют поверхность корня и активно участвуют во многих ключевых процессах, таких как биологический контроль фитопатогенов, циклы питания растения и выживаемость проростков. В частности, выделенный из ФМО штамм бактерий *Bacillus megaterium*, по всем проведенным тестам характеризовался как стимулирующий рост и развитие растений.

Кроме того, было отмечено, что в 10–30-летних отвалах бактерий актиномицетной линии в количественном значении больше, чем в свежих отвалах

и в почвах данного региона. Известно, что эти бактерии взаимосвязаны со структурами грибов арбускулярной микоризы, которые постоянно присутствуют в ризосфере растений и являются спутниками и активными участниками растительно-микробных симбиозов [21–23].

Залежи ФМО более поздних сроков хранения (старше 10 лет) характеризовались почти 100% микоризацией выращиваемых растений, более высокой степенью клубенькообразования и получением высоких урожаев.

Таким образом, ФМО позднего срока складирования характеризуются значениями рН, близкими к нейтральным, высокой биологической активностью, широким уровнем разнообразия ризосферных микроорганизмов, наличием аборигенных клубеньковых бактерий и грибов арбускулярной микоризы и, как следствие, определяют хороший рост и развитие растений, в том числе и ценных сельскохозяйственных культур. ФМО сахарных заводов со сроком складирования более 10 лет можно рекомендовать как компонент (субстрат-носитель) промышленных микробных препаратов для экологически ориентированного сельского хозяйства.

Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки (Государственные контракты №02.512.11.2280, 02.740.11.0276), грантов: президент РФ (НШ-3440.2010.4), РФФИ (09-04-13895, 09-04-91054, 09-04-91293, 10-04-00961, 10-04-01146), NWO-047.117.2005.006 (Нидерланды).

Литература

1. *Bloemberg C.V., Lugtenberg B.J.J.* // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2001. 4: 343–350.
2. *Тихонович И.А., Борисов А.Ю., Цыганов В.Е., Овцына А.О., Долгих Е.А., Проворов Н.А.* // *Успехи современной биологии.* 2005. Т. 125. №3.— С. 227–238.
3. *Tsavkelova E.A., Klimova S.Yu., Cherdyntseva T.A. and Netrusov A.I.* // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2006. 42: 117–126.
4. *Barea, J.M., Pozo, M.J., Azcon R., Azcon-Aguilar C.* // *J. Exp. Botany* 2005. 56: 1761–1778.
5. *Лабутова Н.М.* // *Микология и фитопатология*, 2009, Т. 43.— С. 3–19.
6. *Проворов Н.А., Борисов А.Ю., Тихонович И.А.* // *Журн. общ. биол.* 2002. Т.63, №6.— С. 451–472.
7. *Parniske M.* // *Nature Rev Microbiol*, 2008. 6: 763–775.
8. *Barea J.M.* // *Biological resource management: connecting science and policy (OECD).* INRA. 2000.— P. 110–125.
9. *Sanchez L., Weidmann S., Arnould C., Bernard A.R., Gianinazzi S., Gianinazzi-Pearson V.* *Plant Physiol.* 2005. 139: 1065–1077.
10. *Борисов А.Ю., Штарк О.Ю., Жуков В.А., Пинаев А.Г., Ахтемова Г.А., и др.* // *Материалы Всероссийской школы молодых селекционеров им. С.А. Кунакбаева.* 11–15 марта 2008. Уфа.— С. 105–120.
11. *Тихонович И.А., Проворов Н.А.* *Симбиозы растений и микроорганизмов: молекулярная генетика агросистем будущего.* СПб.: Изд-во С.-Петерб. ун-та, 2009.— 210 с.
12. *Vance C.P.* // *Plant Physiol.* 2001. 127: 390–397.
13. *Чеботарь В.К., Казаков А.Е., Ерофеев С.В. и др.* “Способ получения комплексного микробиологического удобрения”. Патент №2318784, зарегистрирован 10.03.2008.

14. Штарк О.Ю., Данилова Т.Н., Наумкина Т.С. и др. // Экол. генет., 2006. Т.4, №2.— С. 22–28.
15. Василюк Г.В., Клебанович Н.В., Пехота А.П. Почвенные исследования и применение удобрений / Беларусь. Минск. 1995. Вып.23.— С. 92–100.
16. Джувеликян Х.А. Экология и человек. Воронеж. ВГУ, 1999.— 264 с.
17. Василюк Г.В., Богдевич И.М., Клебанович Н.В., Германович Т.М. Метод. реком. Института почвоведения и агрохимии НАН Беларуси. Минск. 2004.— 20 с.
18. Altschul S. F., Gish W., Miller W. [et al.] // J. mol. biol. 1990. 215: 403–410.
19. Карасев С.Г. Актинобактерии из многолетнемерзлых отложений Сибири. Автореферат диссертации на соискание ученой степени к.б.н. Пушино. 2007.
20. Никашина А.А., и др. // Известия СНЦ РАН. 2009. Т.11, №1(6).— С. 1355–1358.
21. Filippi C., Bagnoli G., Citernes A.S., Giovannetti M. // Symbiosis. 1998. 24: 1–12.
22. Tokala R.K., Strap J.L., Jung C.M. et al. // Appl. Environ. Microbiol. 2002. 68: 2161–2171.
23. Markmann K., Giczey G., Parniske M. // PLoS Biology, 2008. 6(3): 68.

Резюме

Показана возможность создания многокомпонентных микробных препаратов на основе отходов сахарного производства (фильтрационно-моющих осадков, ФМО) для адаптивного сельского хозяйства. Установлено, что отвалы ФМО с различных сахарных заводов в 10-ти годам складирования также имеют высокие показатели по содержанию собственной полезной почвенной микрофлоры.

Possibility of production of multi-component microbial bio-preparations for sustainable agriculture on the base of filtration washing pellet (FWP) of sugar industry was demonstrated. The 10-years dumps of FWP from different sugar factories have also been shown to contain high amounts of diverse own beneficial soil microbes.

БЛИНСЬКА О.В.¹, ТИМЧУК С.М.¹, ДУЛЬНЄВ П.Г.², ДЕРЕБІЗОВА О.Ю.¹

¹Інститут рослинництва ім. В. Я. Юр'єва Української академії аграрних наук
Україна, 61060, Харків, проспект Московський, 142, e-mail: bilinska@ukr.net

²Науково-інженерний центр “АКСО” Інституту біоорганічної хімії і нафтохімії
Національної академії наук України 02160, Київ, Харківське шосе, 50,
e-mail: selit@ua.fm

ОЦІНКА МОРФОГЕНЕТИЧНОГО ЕФЕКТУ ПРИРОДНИХ І ХІМІЧНО МОДИФІКОВАНИХ КРОХМАЛІВ У СКЛАДІ СЕРЕДОВИЩ ДЛЯ ОТРИМАННЯ ГАПЛОЇДІВ ЯРОГО ЯЧМЕНЮ МЕТОДОМ КУЛЬТУРИ ПИЛЯКІВ *IN VITRO*

Удосконалення складу штучних живильних середовищ для культивування *in vitro* рослинних клітин, тканин та органів насамперед полягає у встановленні дослідним шляхом оптимальних концентрацій стимуляторів росту і інших фізіологічно активних речовин як компонентів з найбільшим

морфогенетичним ефектом. Рідше об'єктом спеціальних досліджень є композиція солей макро- і мікроелементів, вуглеводів з трофічною функцією, гелеутворювачів тощо.

Разом з тим, відомо, що від хімічної природи та структурно-механічних властивостей гелевої основи твердого середовища може значною мірою залежати повнота реалізації програми морфогенезу *in vitro* і життєздатність отриманих рослин-регенерантів [1]. З огляду на це було запропоновано заміну агар-агару — найбільш розповсюдженого гелеутворювача — на ряд речовин різної хімічної будови, серед яких чільне місце посіли природні та хімічно модифіковані крохмалі [2, 3].

Зокрема, встановлено позитивний ефект на регенерацію рослин у культурі пиляків *in vitro* ярого ячменю хімічно модифікованих крохмалів ДККмод і Д-2 [4, 5].

У зв'язку із значним генетичним різноманіттям кукурудзи за генами структури ендосперму, які детермінують співвідношення у крохмалі його сополімерів амілози і амілопектину [6], певні перспективи має використання крохмалів різних типів як гелеутворювачів штучних живильних середовищ.

Мета досліджень полягала у вивчення можливості заміни агар-агару у штучному живильному середовищі для культивування *in vitro* пиляків ярого ячменю на нові препарати хімічно модифікованих крохмалів і природні крохмалі з зерна ліній кукурудзи, які різняться за алейним станом генів структури ендосперму.

Матеріали та методи

Дослідження проведено за використання в якості модельних генотипів сортів ярого ячменю (*Hordeum vulgare* L.) Екзотик, Фенікс та лінії андрогеноного походження ДГ00-126, які характеризувалися контрастною здатністю до андрогенезу *in vitro*.

Вирощування рослин-донорів пиляків, добір колосся, попередню обробку і отримання асептичної культури пиляків здійснювали за власними методичними розробками [7, 8]. Склад базового індукційного середовища, яке слугувало контролем, і середовищ для отримання рослин-регенерантів опубліковано раніше [8]. Ці середовища містили 0,76% агар-агару "Difco" (США).

У дослідних варіантах індукційного середовища агар-агар було замінено на природні кукурудзяні крохмалі, виділені з зерна ліній Ae 392, Ac-11, ВК-69, які є відповідно носіями мутантних генів структури ендосперму ae , su_2 і wx , та хімічно модифіковані крохмалі Д-2, Д-5а, Д-5в і Д-4г, отримані у Науково-інженерному центрі "АКСО" Інституту біоорганічної хімії та нафтохімії НАНУ. Ефективність експериментального андрогенезу *in vitro* оцінювали за кількістю морфогенних пиляків і зелених рослин-регенерантів у відсотках від загального числа культивованих пиляків.

Результати і обговорення

Дослідження гелеутворюючих властивостей крохмалів, отриманих із зерна ліній кукурудзи, які є носіями мутантних генів структури ендосперму ae , su_2 і wx , та крохмалю нормального типу, показали, що придатними для

використання в якості замітника агар-агару у складі штучних живильних середовищ є високоамілозні крохмалі ае та su_2 , які значно перевищили крохмаль wx-типу з підвищеним вмістом амілопектину і крохмаль звичайної кукурудзи за якістю гелю. Препарати хімічно модифікованих крохмалів Д-5а, Д-5в і Д-4г утворили гелі, які за своїми структурно-механічними властивостями були тотожними раніше дослідженим препаратам ДККмод і Д-2 [4, 5]. Оптимальною концентрацією для природних крохмалів є 6,0–6,5%, для хімічно модифікованих — 12,0%.

У експерименті з вивчення впливу крохмалів на ефективність перебігу процесів індукції андрогенних структур і регенерації рослин було встановлено переваги високоамілозних крохмалів і нових препаратів хімічно модифікованих крохмалів у порівнянні з агар-агаром. Як видно з рис. 1, на середовищах, які містили замість агар-агару крохмалі типу ае і su_2 , у всіх генотипів кількість морфогенних пиляків і зелених рослин-регенерантів була істотно вищою порівняно з контролем (агар-агар) і середовищем з хімічно модифікованим крохмалем Д-2

При цьому кукурудзяні крохмалі, виділені з зерна ліній-носіїв мутантних генів структури ендосперму, на відміну від хімічно модифікованого крохмалю не чинили негативного впливу на утворення калюсу та ембріоїдів і динаміку їх росту. Серед андрогенних структур переважали ембріоїди, які формувалися шляхом прямого ембріодогенезу або на поверхні ембріогенного калюсу. Слід зазначити, що мала місце однакова динаміка формування андрогенних структур і рослин-регенерантів на середовищі з агар-агаром і кукурудзяними крохмалями, у тому числі проростання ембріоїдів на індукційному середовищі.

На особливу увагу заслуговують показники гаплопродукції, отримані на середовищах з крохмалем у сорту Фенікс, якому притаманна низька здатність до андрогенезу *in vitro*. Так, на середовищі з крохмалем ае кількість ембріогенних пиляків зросла у цього генотипу до 21,64%, а на середовищі

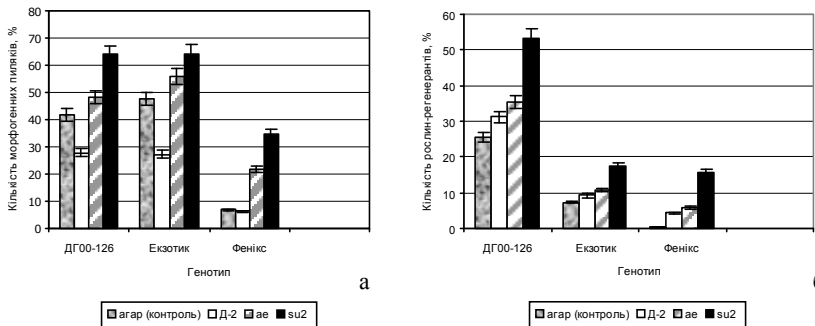


Рис. 1. Індукція морфогенних структур (а) і регенерація зелених рослин (б) у культурі пиляків *in vitro* ярого ячменю в залежності від гелетуворюючого компонента штучного живильного середовища

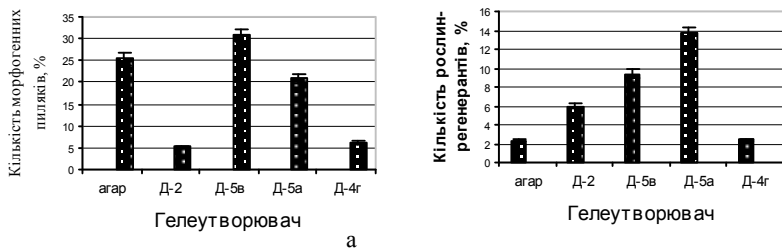


Рис. 2. Індукція морфогенних структур (а) і регенерація зелених рослин (б) у культурі піляків *in vitro* лінії ярого ячменю ДГ00-126 в залежності від гелеутворюючого компонента штучного живильного середовища

з крохмалем іншої мутантної форми — до 34,95%, в той час як у контролі (середовище з агар-агаром) цей показник був на рівні 7,00%. Істотне зростання відмічене і щодо частоти регенерації зелених рослин. Зокрема, за рахунок заміни агар-агару на крохмаль типу su_2 було досягнуто збільшення частоти зелених рослин з 0,56 до 15,80%.

Кращі за результатами тестування гелеутворюючих властивостей крохмалі Д-5а, Д-5в і Д-4г було залучено до експерименту з оцінки їхнього морфогенетичного ефекту у культурі піляків *in vitro* ярого ячменю. Як контроль було використано середовище NMS мод. 1, яке містило 9,0% сахарози і 0,76% агар-агару. Порівняння ефективності нових гелеутворювачів проводилося також з дослідженим раніше модифікованим крохмалем Д-2.

Як свідчать дані, наведені на рис. 2, досліджувані препарати по-різному впливали на процеси індукції морфогенних структур і регенерації рослин. Зокрема, підтвердився встановлений раніше ефект зниження інтенсивності утворення морфогенних структур на середовищі, яке містить модифікований крохмаль Д-2. Але переважання серед новоутворень ембріодів, дозволило на цьому середовищі отримати істотно вищий, ніж у контролі вихід зелених рослин-регенерантів.

На відміну від Д-2, крохмалі Д-5а і Д-5в не чинили негативного впливу на початкові етапи морфогенезу *in vitro*. Більш того, на останньому середовищі було одержано значно вищий вихід піляків з морфогенними структурами, ніж на агаровому середовищі. Застосування заміників агар-агару Д-5а і Д-5в сприяло зростанню регенерації зелених рослин.

Невисокий вихід андрогенних структур і зелених рослин-регенерантів у контрольному варіанті та досліді в цілому, безумовно, пов'язаний з тим, що в якості трофічного фактора замість мальтози, яка має досить високу вартість, було використано сахарозу. Разом з тим, зважаючи на відносно високий рівень індукції андрогенних структур і регенерації в окремих варіантах крохмалевмісних середовищ, можна зробити висновок щодо зменшення негативного впливу сахарози на перебіг процесів морфогенезу у культурі піляків *in vitro* ярого ячменю за її введення до складу живильного середовища з крохмалями-гелеутворювачами, імовірно, за рахунок додаткових

трофічних факторів, джерелом яких є гідроліз крохмалів і поліпшення осмотичних властивостей середовища.

Висновки

Вперше встановлено позитивний ефект хімічно модифікованих крохмалів Д-5а та Д-5в на процеси індукції андрогенних структур і регенерації рослин у культурі пиляків *in vitro* ярого ячменю. За використання високоамілозних крохмалів типу ае і su_2 досягнуто істотного зростання показників гаплопродукції у генотипів з контрастною андрогенною здатністю, що дозволяє рекомендувати використання цих препаратів для отримання гаплоїдів у культурі пиляків *in vitro*.

Література

1. Kohlenbach H.W., Wernike W. Investigation on the inhibitory effect of agar and the function of active carbon in anther culture // Ztsch. Pflanzenphysiol.— 1978.— V.86, N5.— P. 463–472.

2. Sorvari S. The effect of starch gelatinized nutrient media in barley anther culture // Annals Agr. Finnie.— 1986a.— V.25.— P. 127–133.

3. Деклараційний патент на винахід 52031 Україна, МПК 7, C08B31/02, A01N57/00, A01N59/00, A01C1/06. Спосіб отримання полімерних матеріалів / П.Г. Дульнев, С.І. Кондратенко, Т.В. Чернишенко, В.П. Мірошниченко, Т.В. Івченко, С.А. Гончарова; заявник і патентовласник Інститут біорганічної хімії і нафтохімії НАНУ.— $u2002010237$; заявл. 09.0.2002.— Опубл.17.01.2005.12.02, Бюл. №12.

4. Белинская Е.В., Дульнев П.Г. Модифицированный крахмал как компонент питательной среды для получения гаплоидов ячменя в культуре пыльников *in vitro* // Физиология и биохимия культурных растений.— 2007.— Т.39, №2.— С. 136–143.

5. Білинська О.В., Дульнев П.Г. Використання модифікованого крохмалю як гелеутворюючого компоненту штучних живильних середовищ для індукції новоутворень і регенерації рослин у культурі пиляків *in vitro* ярого ячменю // Вісник Харківського національного аграрного університету .Серія Біологія.— 2008.— Вип.2(14).— С. 83–89.

6. Coe E., Polacco M. Maize gene list and working maps // Maize Genet. Newslett.— 1994.— V.68.— P. 156–191.

7. Білинська О.В. Генотипові особливості індукції гаплоїдів ячменю (*H. vulgare* L.) методом культури пиляків *in vitro*: Автореферат дис. ... канд. біол. наук.— Харків: 1997.— 19 с.

8. Білинська О.В., Весна С.В., Манзюк В.Т. Застосування культури пиляків *in vitro* для створення вихідного матеріалу в селекції голозерного ячменю // Селекція і насінництво.— 2002.— Вип.86.— С. 164–172.

Резюме

Досліджено гелеутворюючі властивості та морфогенетичний ефект у культурі *in vitro* пиляків ярого ячменю природних і хімічно модифікованих крохмалів. Встановлено позитивний вплив кукурудзяних крохмалів з підвищеним вмістом амілози, отриманих з зерна ліній-носіїв мутантних генів структури ендосперму ае і su_2 , на процеси індукції калусу, ембріоїдів і регенерації рослин. Дібрано перспективні для подальших досліджень препарати хімічно модифікованих крохмалів Д-5а і Д-5в.

Изучены гелеобразующие свойства и морфогенетический эффект в культуре *in vitro* пыльников ярового ячменя природных и химически модифицированных

крахмалов. Установлено положительное влияние кукурузных крахмалов с повышенным содержанием амилозы, выделенных из зерна линий-носителей мутантных генов структуры эндосперма *ae 1 su₂*, на процессы индукции каллуса, эмбриоидов и регенерации растений. Отобраны перспективные для дальнейших исследований препараты химически модифицированных крахмалов Д-5а і Д-5в.

Gelling capacity and morphogenetic effect in spring barley anther culture *in vitro* of natural and chemically modified starches was investigated. Positive influence of corn starches with high amilose content, obtained from seeds of corn lines, which were the carriers of natural mutations of endosperm structure genes *ae* and *su₂*, on the embryogenesis and green plant regeneration was revealed. Perspective for further investigations preparations of chemically modified starches D-5a and D-5b were selected.

ВАГИНА И.Н., АНОПРИЕНКО О.В., ЗАХАРУК Е.А., СТРОКОВСКАЯ Л.И.

*Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины
Украина; 03143 Киев, ул. Заболотного, 150; e-mail: ira_vag@ukr.net*

ПЕРЕНОС ГЕНА β -ИНТЕРФЕРОНА В КЛЕТКИ МЛЕКОПИТАЮЩИХ РЕКОМБИНАНТНЫМ БАКУЛОВИРУСНЫМ ВЕКТОРОМ

Интерферон β (IFN- β) является одним из членов семейства полипотентных цитокинов — интерферонов, играющих важную роль в системе врожденного иммунитета. Интерфероны подавляют репликацию и распространение вирусных, бактериальных и паразитарных патогенов, модулируют иммунный ответ и оказывают антипролиферативное воздействие на некоторые типы клеток. В клинике интерфероны используют для лечения ряда вирусных инфекций, аутоиммунных заболеваний — рассеянного склероза и ревматоидного артрита, а также в противоопухолевой терапии. IFN- β усиливает апоптоз опухолевых клеток, осуществляет торможение ангиогенеза в опухолевых тканях, снижает частоту метастазирования [1]. При этом более чувствительными к IFN- β (по сравнению с IFN- α) являются клетки простаты, меланомы и некоторых других типов опухолей [2]. Однако, результаты многочисленных испытаний IFN- β в клинической практике показали, что он проявляет незначительную активность против опухолей человека, вероятно, вследствие невозможности достижения высокой концентрации интерферона в сыворотке крови пациентов из-за его токсичности, а также достаточно короткого периода “жизни” в организме [3].

Обеспечить высокую локальную продукцию цитокина можно с помощью стратегии, сочетающей клеточную и генную терапию — системы “клеточных векторов”. Предполагается, что такая система должна состоять из трех компонентов — модифицируемых *ex vivo* клеток, характеризующихся определенным тропизмом к месту терапии, рекомбинантного вектора и собственно гена, кодирующего терапевтический агент [3].

В качестве векторных клеток для задач противоопухолевой терапии используют как мезенхимальные стволовые клетки (МСК), так и зрелые фибробласты. Такие клетки должны осуществлять доставку терапевтического агента к опухоли и обеспечивать высокий уровень его экспрессии “на месте”. В настоящее время возрастает интерес к использованию фетальных фибробластов в процессах регенерации поврежденных тканей. Показано, что культивированные фетальные фибробласты влияют на заживление раневых поверхностей в результате их способности вырабатывать элементы межклеточного матрикса, секретировать факторы роста и другие митогены для паракриной регуляции [4].

Фетальные фибробласты обладают более широкими потенциями по сравнению с фибробластами взрослого организма, быстрее размножаются в культуре *in vitro* и возможно могут представлять альтернативный мезенхимальным стволовым клеткам (МСК), более доступный источник для получения “клеточных векторов”. В связи с этим необходимо было проверить возможность использования фетальных фибробластов мыши, трансдуцированных рекомбинантными бакуловирусами, содержащими ген мышинового β -*Ifn* в качестве “клеточных векторов”.

Бакуловирусы (вирусы насекомых) в качестве векторов для генной терапии имеют ряд преимуществ, включающих неспособность вирусов реплицироваться в клетках млекопитающих, широкий спектр трансдуцируемых типов клеток и тканей при отсутствии выраженной цитотоксичности, способность, благодаря структуре генома, включать большие (до 30 тыс. н.п.) фрагменты гетерологичной ДНК [5, 6, 7]. Целью нашей работы было проведение оценки эффективности трансдукции различных клеточных линий млекопитающих бакуловирусным вектором, несущим ген мышинового β интерферона.

Материалы и методы

Клеточные культуры. Монослойную культуру клеток насекомых Sf21 выращивали в среде TC-100 (Sigma) с добавлением 10% FBS при 28 °С. Инфицирование клеток бакуловирусами проводили согласно стандартным процедурам [8].

В работе использовали три линии клеток млекопитающих: НЕК293 (линия клеток эмбриональной почки человека), ММ4 (клеточная линия из меланомы В-16), а также первичные фибробласты мышей линии C57BL/6j, которые получали из мягких тканей 14-дневных эмбрионов методом ферментативной дезагрегации ткани (C57Fb). Все линии клеток культивировали в среде DMEM (Sigma) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки FBS (Sigma), 100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина при 37 °С в CO₂-инкубаторе.

Рекомбинантные бакуловирусы и трансдукция клеток млекопитающих. Рекомбинантные бакуловирусы получали на основе вируса ядерного полиедроа *Autographa californica* (AcMNPV) в экспрессионной системе Bac-to-Bac (Invitrogen). Был сконструирован рекомбинантный бакуловирус Ac-IFN-

GFP, содержащий два гена — репортерный *Gfp* под регуляцией промотора CMV и ген мышиноного β -*Ifn* под регуляцией кассеты СAG. Бакуловирус Ас-CMV-GFP с геном *Gfp* под промотором CMV использовали в качестве контрольного. Вирусы концентрировали центрифугированием при 100 000 г. Титр вирусных препаратов после амплификации и концентрирования составлял $2\text{--}4 \times 10^8$ БОЕ (бляшкообразующих единиц)/мл. Трансдукцию проводили в оптимизированных нами предварительно условиях [9]. Рекомбинантный бакуловирус добавляли в концентрации 200 moi (multiplicity of infection = количество БОЕ на клетку).

Проточная цитофлуориметрия. Эффективность трансдукции определяли по количеству клеток, экспрессирующих светящийся белок, с использованием цитофлуориметра Coulter Epics XL, предварительно анализируя препараты на флуоресцентном микроскопе (Микмед-2ЕС). Подготовку клеток осуществляли как описано ранее [9]. Статистическую обработку результатов трансдукции проводили в соответствии со стандартными методами [10] с презентацией данных в программе Microsoft Excel.

Результаты и обсуждение

Рекомбинантный бакуловирус Ас-IFN-GFP, содержащий два гена — репортерный *Gfp* под регуляцией промотора CMV и ген мышиноного β -*Ifn* под регуляцией кассеты СAG, был сконструирован для изучения эффективности переноса гена β -интерферона в клетки млекопитающих, в том числе, и в клетки предполагаемых “клеточных векторов” — фетальных фибробластов мыши (С57Fb). Ранее проверялась эффективность работы обоих промоторов в составе бакуловирuсов Ас-М-GFP (репортерный ген под регуляцией кассеты СAG) и Ас-CMV-GFP с геном *Gfp* под контролем CMV промотора. Было показано, что рекомбинантный бакуловирус Ас-М-GFP осуществляет более интенсивную и продолжительную экспрессию репортерного GFP [Аноприенко и др. в печати]. В связи с этим, в рекомбинантном бакуловирусе целевой ген мышиноного β -*Ifn* был встроен под регуляцию более сильного промотора. Вектор Ас-CMV-GFP в данном исследовании использовали в качестве контрольного. По литературным данным различные клеточные линии мышей характеризовались очень низкими эффективностью трансдукции и уровнем экспрессии репортерного гена под регуляцией CMV-промотора [11]. Решением этой проблемы мог быть подбор более сильной регуляторной кассеты, модификация поверхностных белков вируса и изменение условий трансдукции. Мы пошли по пути подбора более сильной регуляторной кассеты СAG и оптимизации условий трансдукции. Доза вируса 200 moi обеспечивала удовлетворительную эффективность трансдукции клеток С57Fb на уровне $69,6 \pm 3,8\%$ для вируса Ас-М-GFP и $52,9 \pm 4,2\%$ для Ас-CMV-GFP [Аноприенко и др. в печати]. Однако более высокая концентрация любого вируса (500 moi) хуже переносилась клетками мыши. Таким образом, трансдукцию БВ-вектором с геном β интерферона проводили дозой вируса 200 moi.

Эффективность трансдукции контрольным бакуловирусом Ас-CMV-GFP клеток НЕК293, С57Fb и ММ4 составляла соответственно $95,8 \pm 2,5\%$,

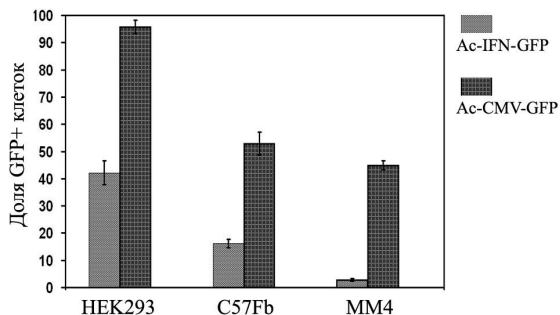


Рис. 1. Эффективность трансдукции клеточных линий HEK293, C57Fb и MM4 рекомбинантными бакуловирусными векторами Ac-CMV-GFP и Ac-IFN-GFP
Примечание: по оси ординат — доля флуоресцирующих (GFP+) клеток (%), по оси абсцисс — типы клеточных линий

52,9±4,2% и 44,9±1,6%. В то время как бакуловир Ac-IFN-GFP в той же дозе трансдуцировал клетки с эффективностью 42,2±4,4%, 16,2±1,6% и 2,8±0,5% соответственно (рис. 1.). Это свидетельствует о том, что эффективность трансдукции БВ-вектором с геном мышинного β -*Irfn* человеческих клеток (HEK293) уменьшилась в 2,3 раза, нормальных клеток мыши (C57Fb) в 3,2 раза и опухолевых клеток мыши (MM4) в 16 раз относительно контрольного вектора.

В качестве причины уменьшения эффективности трансдукции можно предположить активность самого интерферона. Возможно, даже небольшая начальная секреция цитокина приводит к блокированию либо проникновения вируса в клетку, либо экспрессии белков, в том числе и маркерного GFP. Эффективность трансдукции определялась по доле клеток, экспрессирующих репортерный GFP — косвенному показателю проникнувших в клетку активных вирусных частиц. Необходимо отметить, что максимальное количество клеток экспрессирующих Ac-IFN-GFP наблюдалось через 24 и 48 часов после трансдукции, значительное количество светящихся клеток сохранялось через 9 суток, однако экспрессия репортерного гена постепенно уменьшалась, сохраняясь в единичных трансдуцированных клетках на протяжении 20 суток.

Как один из основных противовирусных агентов IFN- β осуществляет подавление биосинтеза белка, по крайней мере, двумя независимыми путями — посредством 2'5'-олиго-аденил синтетазы (OAS) и протеиновой киназы PKR. Оба пути зависят от двуцепочечной РНК, за чувствительность к которой отвечают TLR-3 рецепторы. К удивлению исследователей недавно было установлено, что именно TLR-3, а по другим данным и TLR-9 рецепторы активируются в ответ на инкубацию клеток млекопитающих с бакуловиром [7]. β -интерферон характеризуется значительным плейотропизмом. По данным исследований с использованием микрочипов показано, что более

1000 генов могут изменять свою экспрессию в ответ на действие β -интерферона [12]. Сама процедура трансдукции диким бакуловирусом приводит к увеличению экспрессии некоторых цитокинов, таких как IL-1 β , IFN- α , IL-6 и, по некоторым данным, IFN- β , хотя уровень их секреции незначительный [7]. Воздействие бакуловирусных векторов на клетки млекопитающих, дополненное синтезом мультифункционального β -интерферона, может приводить к изменению профиля экспрессии генов в векторных клетках, что безусловно требует дополнительного изучения. Необходимо также дальнейшее проведение оптимизации конструкции бакуловирусных векторов для целей генной терапии. Так, для выключения экспрессии некоторых “ранних” бакуловирусных генов в клетках млекопитающих было предложено комплексное решение, заключающееся в инактивации универсального для многих вирусных генов транскриптора IE1 [5]. Таким образом, комплексная система “клеточных векторов” нуждается в тщательной оптимизации всех своих компонентов, усиливающих, либо ингибирующих свойства друг друга, от удачного сочетания которых будет зависеть успех их дальнейшего использования.

Литература

1. Zhang F, Lu W, Dong Zh. Tumor-infiltrating macrophages are involved in suppressing growth and metastasis of human prostate cancer cells by IFN- β gene therapy in nude mice // *Clinical Cancer Research*.— 2002.— V.8.— P. 2942–2951.
2. Chawla-Sarkar M., Leaman D.W., Borden E.C. Preferential induction of apoptosis by Interferon (IFN)- β compared with IFN- α : correlation with TRIL/Apo2L induction in melanoma cell lines // *Clinical Cancer Research*— 2001.— V.7.— P. 1821–1831.
3. Studeny M., Marini F.C., Dembinski J.L., Zompetta C., Cabreira-Hansen M., Beke B.N., Champlin R.E., Andreeff M. Mesenchymal stem cells: potential precursors for tumor stroma and targeted-delivery vehicles for anticancer agents // *J Natl Cancer Inst*.— 2004.— V.96.— P. 1593–603.
4. Попандопуло А.Г., Корчак О.М., Трунова О.А., Зубов Д.А., Разенкова И.А. К вопросу об обосновании применения культивированных фетальных фибробластов человека в комплексном лечении хронических мезенхимальных дефектов // *Архив клинической и экспериментальной медицины*.— 2004.— Т.13, №1.— С. 55–61.
5. Kenoutis C., Efroze R.C., Swevers L., Lavdas A.A., Gaitanou M., Matsas R., Iatrou K. Baculovirus-mediated gene delivery into Mammalian cells does not alter their transcriptional and differentiating potential but is accompanied by early viral gene expression // *J. Virol*.— 2006.— 80, N8.— P. 4135–4146.
6. Chuang CK, Wong TH, Hwang SM, et al. Baculovirus transduction of mesenchymal stem cells: *in vitro* responses and *in vivo* immune responses after cell transplantation // *Mol Ther*.— 2009.— V.17.— P. 889–896.
7. Chen GY, Shiah HC, Su HJ, et al. Baculovirus transduction of mesenchymal stem cells triggers the toll-like receptor 3 pathway // *J. Virol*.— 2009.— V.83.— P. 10548–10556.
8. King L.A., Possee R.D. The baculovirus expression system. A laboratory guide / London: Chapman and Hall, 1992.— P. 220.
9. Вагина И.Н., Аноприенко О.В., Захарук Е. А., Строковская Л.И., Соломко А.П. Эффективность доставки генов бакуловирусами в клетки млекопитающих *in vitro* // *Biopolymers and cell*.— 2008.— Т.24, №6.— С. 508–512.

10. *Лакін Г.Ф.* Биометрия.— М.: Высш. шк., 1990.— 352 с.

11. *Hsu C.S., Ho Y.C., Wang K.C., Hu Y.C.* Investigation of optimal transduction conditions for baculovirus-mediated gene delivery into mammalian cells // *Biotechnol. Bioeng.*— 2004.— 88, N1.— P. 42–51.

12. *Hesse D, Sellebjerg F, Sorensen PS.* Absence of MxA induction by interferon beta in patients with MS reflects complete loss of bioactivity // *Neurology.*— 2009.— V.73.— P. 372–377.

Резюме

Сконструйован рекомбінантний бакуловірусний вектор Ac-IFN-GFP, що містить репортерний GFP під регуляцією промотора CMV і ген мишиного β -*Irfn* під регуляцією касети CAG. Показано значительное уменьшение эффективности трансдукции Ac-IFN-GFP по сравнению с контрольным вектором в клеточных линиях HEK293, MM4 и C57Fb.

Сконструйований рекомбінантний бакуловірусний вектор Ac-IFN-GFP, що містить репортерний GFP під регуляцією промотору CMV і ген мишачого β -*Irfn* під регуляцією касети CAG. Показано значне зменшення ефективності трансдукції Ac-IFN-GFP у порівнянні з контрольним вектором в клітинних лініях HEK293, MM4 и C57Fb.

Recombinant baculovirus vector Ac-IFN-GFP with GFP reporter gene under the CMV promoter and mouse β -*Irfn* gene controlled by CAG promoter cassette has been constructed. Significant decrease in transduction efficiency of Ac-IFN-GFP compared to control Ac-CMV-GFP in three cell lines HEK293, MM4 and C57Fb was demonstrated.

ВАСИЛЕНКО М.Ю., КУЧУК М.М., ОВЧАРЕНКО О.О., КУЧУК М.В.

*Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України,
Україна, 03680, Київ, вул. Заболотного, 148, e-mail: mxvasylenko@gmail.com*

ОТРИМАННЯ ТРАНСПЛАСТОМНИХ РОСЛИН *NICOTIANA BENTHAMIANA* ІЗ ГЕНАМИ МІКОБАКТЕРІЇ *(MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS)*

Рослини як об'єкт сучасних генно-інженерних досліджень все частіше привертають до себе увагу дослідників і стають дедалі більш поширеними в біотехнологічних розробках, конкуруючи з класичними об'єктами біотехнологій — бактеріями, дріжджами, культурами клітин тварин та людини. Спочатку за участю рослин розроблялись сучасні методи для вирішення традиційних селекційно-генетичних проблем підвищення продуктивності сільськогосподарських рослин та їх захисту від різноманітних біотичних та абіотичних стресових факторів. Проте зараз набуває популярності другий напрямок, названий “молекулярним виробництвом” (molecular farming), що спеціалізується на отриманні та використанні трансгенних рослин як біореакторів, що продукують цінні для промисловості та медицини органічні сполуки. За останні двадцять років велику кількість цінних білків було

продуковано в рослинах. Це білки людської сироватки, регулятори росту, антитіла, вакцини, промислові ферменти, біополімери та реагенти для молекулярної біології [1–5]. Рослинні системи мають перспективи успішного використання для виробництва рекомбінантних білків в промислових масштабах, вони є економічно привабливими в умовах масштабного виробництва. Недорогі умови вирощування культури-продуцента позитивно впливатимуть на вартість кінцевого продукту в порівнянні з таким, що вироблено в культурах тваринних клітин та людини. Окрім цього еукаріотичні рослинні клітини є кращою альтернативою до бактерій-продуцентів, оскільки в багатьох випадках цільові білки є саме еукаріотичного походження (переважна їх більшість людського походження), і вони потребують додаткових посттрансляційних модифікацій.

Одним з шляхів досягнення ефективної продукції рекомбінантних білків в рослинах-продуцентах є створення трансгенних рослин із генетично модифікованим пластомом — транспластомних рослин. Такі рослини мають ряд переваг в порівнянні із рослинами з трансформованим ядерним геномом. По-перше, за даними з літературних джерел [6, 7] рівень експресії трансгенів в транспластомних рослинах може сягати значно вищих показників в порівнянні з ядерно-трансформованими рослинами, що зумовлено, як вважають, високою копієчністю пластоми, а відтак і вбудованого трансгену. По-друге, трансформуючи пластом, можна створювати більш складні генетичні конструкції, що несуть кілька генів, оскільки для геному пластид властивий поліцистронний тип експресії. По-третє, транспластомні рослини є більш біологічно безпечними через материнський тип успадкування пластоми, властивий для переважної більшості вищих рослин. До того ж можна додати, що у транспластомних рослин ще досі не було показано явищ метилування трансгенів, які призводили б до припинення їх експресії, як це відбувається в ядерному геномі.

Отже, зважаючи на наведені переваги транспластомних рослин як продуцентів цінних білків, ми вирішили створити транспластомні рослини *Nicotiana benthamiana* із генами *esxA* та *fbpB*, що мають походження від збудника туберкульозу (*Mycobacterium tuberculosis*) і кодують секреторні білки мікобактерії: ESAT6 та Ag85B. Дані білки є об'єктом досліджень при розробці нової протитуберкульозної вакцини, тому можливість накопичення даних білків є важливою. Окрім цього рослини-продуценти таких антигенів можуть бути застосовані не тільки для накопичення очищеного білкового препарату, а й використовуватись як “їстівна вакцина”. Підчас споживання такої рослини імунна відповідь виникатиме при контакті синтезованого в тканинах рослини антигену із слизовими оболонками шлунково-кишкового тракту піддослідної тварини [8–10].

Вибір *N.benthamiana* для проведення пластомної трансформації був обумовлений спорідненістю даного виду з класичним модельним об'єктом — *N.tabacum*, який є дуже ефективним і традиційно використовується в експериментах з генетичної трансформації. Також *N.benthamiana* є дуже ефектив-

ним продуцентом рекомбінантного білку у разі використання системи тимчасової експресії, що базується на використанні вірусомісних векторів [11, 12]. Створення транспластомних рослин *N.benthamiana* дасть можливість порівняти ефективність різних експресійних систем в межах одного виду.

Матеріали і методи

Для створення пластом-трансформуючих векторів використовували генетичні конструкції, які були люб'язно надані проф. Н.-У. Коор (Інститут Ботаніки, Мюнхенський Університет, ФРН) та проф. Дороховим Ю.Л. (Інститут фізико-хімічної біології ім. А.Н. Білозерського, МГУ ім. М.В. Ломоносова, Росія). Вихідний вектор для пластомної трансформації містив селективний ген *aadA* (аміноглікозид-3'-аденілінтрансферази) та ген *gusA* (β -глюкуронідази), які розташовані в межах гомологічних тютюновому пластоми ділянок *psbA* та *trnH-rpl2* генів. Замість маркерного гену *gusA* клонували відповідні гени мікобактерії *esxA*, *fbpB* та об'єднану послідовність *esxA::fbpB*. Клонування та інші супутні процедури проводили за протоколами, описаними в Sambrook et al. [13]. Для інтегрування генів мікобактерії в базову векторну конструкцію використовували спейсерні послідовності *rps19/rpl22*, *psaA/B* та сайт зв'язування з рибосомами (RBS) тютюнового пластоми (рис. 1А). Створені таким чином векторні конструкції перевіряли за допомогою секвенування відповідних ділянок.

Пластомну трансформацію *N.benthamiana* проводили за методом білістичної трансформації за допомогою створених векторних конструкцій. Препарат плазмідної ДНК готували, використовуючи колонки QIAGEN Plasmid Maxi Kit. ДНК векторів абсорбували на вольфрамівих часточках

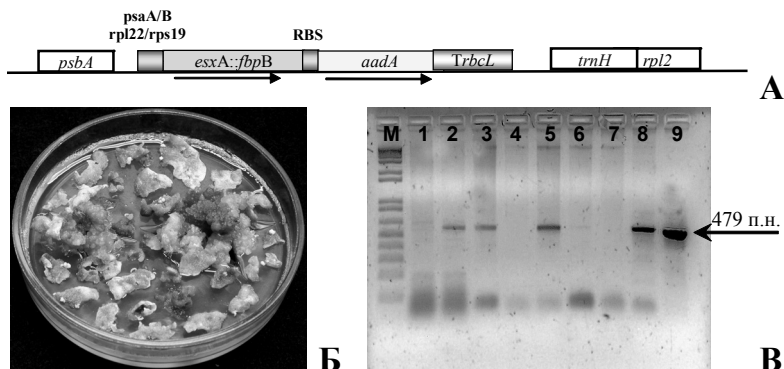


Рис. 1. (А) Схема розташування генів в векторі для трансформації пластоми, де *psbA* та *trnH-rpl2* — ділянки гомології з пластомом, *esxA::fbpB* — варіант рекомбінантного цільового гену, *aadA* — селективний ген, *TrbcL* — термінатор гену великої субодиниці рибулозо-1,5-бісфосфат-карбоксилази *rbcL*; (Б) Регенерація стійких до селективного антибіотику клітинних ліній; (В) ПЛР-аналіз спектиноміцин-стійких рослин з використанням праймерів, специфічних до гену *aadA*, де 1 — негативний контроль, 2-8 — відібрані для аналізу лінії, 9 — позитивний контроль, М — ДНК маркер

(M-5 Microcarriers, 0,4 μm , BioRad) шляхом послідовного додавання до 50 мкл суспензії часточок (0,06 мг/мл в 50% гліцеролі) 10 мкл плазмідної ДНК (1 мкг/мкл) та 10 мкл розчину PEG/MgCl₂ (50% PEG 2000, 5 М MgCl₂). Після інкубації протягом 20 хв. при кімнатній температурі часточки збирали центрифугуванням та ре-суспендували в 60 мкл абсолютного етилового спирту. Листки асептичних рослин викладали нижнім боком догори на чашки Петрі із живильним середовищем (MS з 1 мг/л БАП та 0,1 мг/л НОК), які встановлювали на відстані 14 см від решітки з нанесеними вольфрамовими часточками з адсорбованою плазмідною ДНК для обстрілу. Перед пострілом тиск в камері гармати зменшували до 0,05 атмосфери. Для трансформації кожним типом вектору брали щонайменше 10 чашок Петрі з рослинним матеріалом. Через три дні листки нарізали на експланти, які культивували на живильному середовищі (MS з 1 мг/л БАП та 0,1 мг/л НОК) з додаванням спектиноміцину (200–400 мг/л). Кожні 3–4 тижні проводили пасажі на свіжі живильні середовища з селективним антибіотиком. Стійкі до селекції пагони, що утворювались на експлантах чи калюсах, пересаджували на середовище для вкорінення, що також містило селективний антибіотик.

Для проведення молекулярно-біологічного аналізу з відібраними лініями стійких рослин готували препарати загальної рослинної ДНК за Chaung et al. [14]. ПЛР здійснювали за умовами стандартної програми: 94 °C — 2 хв., (94 °C — 30 сек., 58–65 °C — 30 сек., 72 °C — 30–60 сек.), 72 °C — 2 хв., де температура гібридизації праймеру та час синтезу фрагменту варіювали в залежності типу праймерів та розміру фрагменту, що аналізувався.

Результати та обговорення

Клонуючи послідовності генів секреторних білків ESAT6 та Ag85B, ми використовували лінкernі послідовності міжгенних спейсерів *rps19/rpl22*, *psaA/B* та RBS, які створювали шляхом ре-асоціації відповідних олігонуклеотидів. Спроектвані на кінцях олігонуклеотидів сайти, що пізнаються певними ендонуклеазами рестрикції, дозволили проводити лігування трьох фрагментів одночасно в запланованій орієнтації: спейсер I — ген — спейсер II. Створені таким чином варіанти вихідного вектору забезпечили гомологічну рекомбінацію з пластомом та поліцистронну експресію трансгенів *esxA*, *fbpB*, *esxA::fbpB*, *aadA*, що знаходяться під контролем гену *psbA*.

Власне трансформацію здійснювали методом бомбардування листових експлантів *N.benthamiana* мікрочастинками вольфраму з нанесеною на них ДНК вектору. Селекцію трансформованих клітин проводили на регенераційних середовищах за допомогою спектиноміцину (рис. 1Б), після чого сформовані пагони вкорінювали на середовищі для коренеутворення також з додаванням спектиноміцину. Із зразками ДНК рослин, які було регенеровано на селективному середовищі, було проведено молекулярно-біологічний аналіз за допомогою ПЛР із використанням праймерів, специфічних до селективного *aadA* гену та цільових генів *esxA* та *fbpB*. Один з результатів ПЛР-аналізу наведено на рис. 1В, при ампліфікації зразків ДНК деяких відібраних ліній (доріжки 2, 3, 5, 8) утворюється фрагмент ДНК очікуваної довжини — 479 п.н.

Цікавим залишається факт відсутності ПЛР-фрагменту для частини стійких ліній *N.benthamiana*, який ми схильні пояснювати тривалою сегрегацією трансформованих і нетрансформованих пластомів в межах однієї лінії, що як наслідок може мати повернення деяких ліній до дикого генотипу. Трансгенні рослини *N.benthamiana*, що мають інтегровані в пластом гени мікобактерії разом із селективним геном, будуть в подальшому досліджені відносно рівнів накопичення цільового продукту та його біологічної активності в імунологічних тестах.

Висновки

За результатами даної роботи можна зазначити, що конструкції, створені на основі вектору для пластомної трансформації тютюну, також ефективно можуть інтегруватись в пластом споріднених видів, зокрема *N.benthamiana*. Отже, має місце певна універсальність гомологічних послідовностей, використаних під час створення векторів.

Використовуючи створені векторні конструкції, отримано спектиноміцин-стійкі транспластомні рослини *N.benthamiana* з послідовностями генів *M.tuberculosis* (*esxA* та *fbpB*), які проаналізовано за допомогою ПЛР.

Література

1. Barta A., Sommergruber K., Thompson D. et al. The expression of a nopaline synthase human growth hormone chimaeric gene in transformed tobacco and sunflower callus tissue // Plant Mol. Biol.— 1986.— Vol.6.— P. 347–357.
2. Chong, D.K.X., Roberts W., Arakawa T. et al. Expression of the human milk protein b-casein in transgenic potato plants // Transgenic Res.— 1997.— Vol.6.— P. 289–296.
3. Hood E.E., Witcher D.R., Maddock S. et al. Commercial production of avidin from transgenic maize: characterization of transformant, production, processing, extraction and purification // Mol. Breeding.— 1997.— Vol.3.— P. 291–306.
4. Merle C., Perret S., Lacour T. et al. Hydroxylated human homotrimeric collagen I in *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transient expression and in transgenic tobacco plant // FEBS Lett.— 2002.— Vol.515.— P. 114–118.
5. Scheller J., Henggeler D., Viviani A., Conrad U. Purification of spider silk-elastin from transgenic plants and application for human chondrocyte proliferation // Transgenic Res.— 2004.— Vol.13.— P. 51–57.
6. Staub J.M. Garcia B., Graves J. et al. High-yield production of a human therapeutic protein in tobacco chloroplasts // Nat. Biotechnol.— 2000.— Vol.18.— P. 333–338.
7. Tuboly T., Yu W., Bailey S. et al. Immunogenicity of porcine transmissible gastroenteritis virus spike protein expressed in plants // Vaccine.— 2000.— Vol.18.— P. 2023–2028.
8. Mason H.S., T.A. Haq, J.D. Clements and C.J. Arntzen. Edible Vaccine Protects Mice Against *E. coli* Heat-labile Enterotoxin (LT): Potatoes Expressing a Synthetic LT-B Gene // Vaccine.— 1998.— Vol.16.— P. 1336–1343.
9. Tacket C.O., Mason H.S., Losonsky G., Estes M.K., Levine M.M. and Arntzen C.J. Human immune responses to a novel Norwalk virus vaccine delivered in transgenic potatoes // J. Infect. Dis.— 2000.— Vol.182.— P. 302–305.
10. Richter L.J., Y. Thanavala, C.J. Arntzen and H.S. Mason. Production of hepatitis B surface antigen in transgenic plants for oral immunization // Nat. Biotechnol.— 2000.— Vol.18.— P. 1167–1171.

11. Gleba Y, Klimyuk V, Marillonet S. Magnification — a new platform for expression vaccines in plants // *Vaccine*.— 2005.— Vol.23.— P. 2042–2048.
12. Dorokhov Y.L., Sheveleva A.A., Frolova O.Y. et al. Superexpression of tuberculosis antigens in plant leaves // *Tuberculosis*.— 2007.— Vol.87.— P. 218–224.
13. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular cloning. A laboratory manual.— Gold Spring Harbor Laboratory Press.— 1989.— 2-nd ed.
14. Chaung W.Y., Hubert N., Landry B.S. A simple and rapid DNA microextraction method for plant, animal and insect suitable for RAPD and other PCR analysis // *PCR Meths. Applics.*— 1993.— Vol.3.— P. 69–70.

Резюме

Розроблено серію векторів для трансформації пластоми рослин роду *Nicotiana*. Дані конструкції містять гени *esxA* та *fbpB* з мікобактерії *Mycobacterium tuberculosis*, що поєднані з селективним геном *aadA* та експресуються поліцистронно під контролем *psbA* гену. В результаті проведення трансформації пластоми *N.benthiana* отримано понад 30 стійких до антибіотику ліній, частина з яких підтверджена як трансгенні за допомогою ПЛР детекції.

Создана серия векторов для трансформации пластома растений рода *Nicotiana*. Данные конструкции содержат гены *esxA* и *fbpB* из микобактерии *Mycobacterium tuberculosis*, которые объединены с селективным геном *aadA* и экспрессируются полицистронно под контролем *psbA* гена. В результате проведения трансформации пластома *N.benthiana* получено более 30 устойчивых к антибиотику линий, часть из которых подтверждена как трансгенные при помощи ПЦР детекции.

Set of vectors has been created for plastome transformation of plants of *Nicotiana* genera. These constructs possess *esxA* and *fbpB* genes combined with selective *aadA* gene which are expressed polycistronically under control of *psbA* gene. Over 30 antibiotic resistant lines have been selected in the course of *N. benthiana* plastome transformation and a part of them have been detected as transgenic by PCR.

ВАСИЛЕНКО М.Ю., НИТОВСЬКА І.О., КУЧУК М.М., КУЧУК М.В.

*Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України,
Україна, 03680, Київ, вул. Заболотного, 148, e-mail: mxvasylenko@gmail.com,
maxim@iicb.kiev.ua*

ЕКСПРЕСІЯ ХИМЕРНИХ ГЕНІВ *fbpB::gfp* ТА *fbpB(ΔTMD)::gfp* В РОСЛИНАХ *NICOTIANA TABACUM* ТА *NICOTIANA BENTHAMIANA*

Сучасні методи біотехнології дають змогу використовувати вищі рослини як біореактори для напрацювання гетерологічних білків (антитіл, антигенів, гормонів) з цінними фармацевтичними властивостями. Одним з напрямків щодо створення вакцин нового покоління лежить можливість генетично змінених рослин продукувати імуногенні білки збудників інфекційних хвороб. Так, вперше імуногенність антигену, який синтезували в рослинах, була показана в 1992 році на прикладі трансгенних рослин тютюну, що експресували білок туберкуліну.

пресували поверхневий антиген вірусу гепатиту В (HBsAg) [1]. На сьогодні вже показано експресію понад 50 антигенів людини та тварин в різноманітних рослинних видах, серед яких: тютюн, *N. benthamiana*, картопля, салат, шпинат, томати, кукурудза, арабідопсис [2–5]. До того ж на основі трансгенних рослин активно розробляється концепція “їстівних вакцин”. Як показано в ряді робіт, рослини, що вживаються в їжу і водночас експресують певний антиген, можуть викликати вироблення мукозного імунітету при контакті з стінками кишечника у людей та тварин [6–8].

В нашій лабораторії проводяться дослідження щодо експресії туберкульозних антигенів ESAT6 та Ag85B, що відповідно кодується генами *esxA* та *fbpB* з *Mycobacterium tuberculosis*. З літератури відомо, що данні білки мають високу імуногенність і є головними кандидатами в експериментах зі створення рекомбінантної вакцини — альтернативи до існуючої вакцини проти туберкульозу (БЦЖ, Bacille de Calmette et de Guerin). Використовуючи різні підходи, в своїх дослідженнях ми намагаємось створити рослини з високими рівнями експресії туберкульозних антигенів. Для цього проводяться експерименти з транзійтної експресії антигенів, трансформації пластома, ядерного геному із використанням послідовностей транзитних пептидів для компартаментації і накопичення кінцевого продукту. Метою даної роботи є отримання об’єднаної послідовності антигену із маркерним геном *gfp* для візуалізації експресії цільового білку.

Матеріали і методи

Створення генетичних конструкцій, що містять рекомбінантні послідовності *fbpB::gfp* та *fbpB(ΔTMD)::gfp*, проводили в три етапи: по-перше, синтезували кодуючу послідовність гену *gfp* за допомогою ПЛР на матриці вже існуючого вектору, але використовували при цьому праймери із модифікованими кінцевими послідовностями, що визначають сайти для гідролізу рестриктазами *EheI* та *XbaI*, проводили гідроліз ПЛР-продукту названими рестриктазами, виділяли та очищали отриманий фрагмент ДНК; по-друге, проводили гідроліз вектору, що містив ген *fbpB* або його вкорочену версію *fbpB(ΔTMD)*, за допомогою рестриктаз *EheI* та *XbaI*, виділяли та очищали отриманий фрагмент вектору; по-третє, проводили лігування вектору та ПЛР-фрагменту, після якого проводили трансформацію бактерій (*E. coli* та *A. tumefaciens*), відбирали штами з коректно зібраним вектором.

Генетичну трансформацію *N. tabacum* та *N. benthamiana* проводили за допомогою агробактерій штаму GV3101 із створеними векторами, що містять химерні послідовності *fbpB::gfp* та *fbpB(ΔTMD)::gfp*. Для отримання стабільних трансгенних ліній проводили трансформацію методом “листових дисків” [10] із подальшою регенерацією на селективних середовищах (10 мг/л фосфінотрицину). Транзійтну експресію проводили в тепличних рослинах *N. benthamiana* методом інфільтрації суспензії агробактерії в листову пластину [11]. Через 5–7 діб після інфільтрації ті сегменти листової пластини, що контактували із суспензією агробактерії, досліджували під мікроскопом а також екстрагували загальний білок.

Стабільно трансформовані лінії *N. tabacum* та *N. benthamiana* перевіряли за допомогою ПЛР при цьому використовували праймери специфічні до селективного гену *nptII*, цільового гену *fbpV* та зшитого з ним гену *gfp*. ПЛР здійснювали за умовами стандартної програми: 94 °C — 2 хв., (94 °C — 30 сек., 58–65 °C — 30 сек., 72 °C — 30–60 сек.), 72 °C — 2 хв., де температура гібридизації праймеру та час синтезу фрагменту варіювали в залежності типу праймерів та розміру фрагменту, що аналізувався.

Екстрагування препаратів загального білка трансформованих рослин проводили в двократному буфері для нанесення зразків (200 мМ Трис-НСІ рН 8.8, 4% ДСН, 400 мМ 2-МЕ, 40% гліцерин, 0,01% бромфеноловий синій) при цьому препарати не прогрівали. Розділення білків екстракту проводили в 12% ПААГ в трис-гліцинової буферній системі.

Цитологічні дослідження проводили за допомогою мікроскопу Ахіорhot-35 із застосуванням фільтрів з каналами детекції 405 нм (DAPI), 488 нм (GFP), 543 нм (хлорофіл). Також використовували УФ-лампу для візуалізації флуоресценції GFP в зонах транз'єнтної експресії в листках рослин та в ПААГ при розділенні загального білку інфільтрованих рослин.

Результати та обговорення

В результаті клонування послідовності гену *gfp* із заданими сайтами рестрикції в вектори pCB065 та pCB068 було отримано дві нові векторні конструкції, в яких ген *gfp* було розташовано в одній рамці читання разом із генами *fbpV* та *fbpV*(Δ TMD), відповідно. Такі векторні конструкції використовували для трансформації *N. tabacum* та *N. benthamiana*. Агробактеріальну трансформацію здійснювали методом ко-культивування листових експлантів з відповідною лінією агробактерії, після чого проводили елімінацію бактерії з подальшою селекцією стійких до фосфінотрицину пагонів, які утворювалися на регенераційних середовищах. Таким чином було відібрано по 20–30 незалежно утворених пагонів для кожного виду, які далі вкорінювали на живильному середовищі також з додаванням селективного агента в концентрації 10 мг/л. Для підтвердження трансгенної природи вкорінених ліній проводили ПЛР-детекцію трансгенів (*bar*, *fbpV*, *gfp*) в ДНК зразках. Серед аналізованих ліній понад 80% було таких, що мали позитивний сигнал по трьох ділянках Т-ДНК. Проте аналіз трансгенних ліній за допомогою ультрафіолетового опромінення не виявив характерної для GFP флуоресценції, що може бути викликано наднизьким рівнем експресії химерного білка Ag85B-GFP, можливо внаслідок процесу сайленсінгу, або в наслідок неправильного формування флуорофору в молекулі GFP за умов з'єднання його з туберкульозним антигеном Ag85B чи Ag85B(Δ TMD).

Також нами було проведено серію експериментів з тимчасової експресії створених химерних конструкцій в клітинах *N. benthamiana*. Як позитивний контроль в даних дослідах ми використали вектор з геном *gfp*, що знаходиться так само під контролем 35S промотора як і в тестових векторах. Через 5–7 діб після інфільтрації агробактерії, коли експресія GFP в контрольних ділянках листків була максимальною, детекція флуоресценції проводилась

і в експериментальних ділянках листків. За попередніми даними мікроскопічного дослідження флуоресценції GFP було виявлено ознаки концентрації химерного продукту Ag85B(Δ TMD)::GFP в клітинних стінках клітин епідермального шару листка, а також дифузне накопичення в цитоплазмі мезофільних клітин, інколи асоційоване з хлоропластами. Порівнюючи інтенсивність флуоресценції підчас експресії контрольного гену (GFP) та химерного (Ag85B::GFP), можна зазначити, що яскравість для експериментальних зразків була значно (в кілька разів) нижча за контроль. Це, звичайно, може свідчити про нижчий рівень накопичення в клітині саме химерного білка проти вільного GFP, що в свою чергу може бути обумовлено якимось негативним впливом антигену на рослину клітину.

Тимчасову експресію рекомбінантного білка також досліджували за допомогою розділення білкової фракції в поліакриламідному гелі (ПААГ) з подальшою детекцією при УФ опроміненні. Білкові екстракти, зроблені з інфільтрованих ділянок листя, наносили в ПААГ і розділяли в м'яких денатуруючих умовах, після чого в гелі при опроміненні УФ-світлом спостерігали смуги характерної зеленої флуоресценції GFP, які відповідали вільному GFP (30 кДа) та химерному продукту Ag85B(Δ TMD)::GFP (>50кДа). Експериментальні зразки також мали в кілька разів менш яскраву флуоресценцію в порівнянні зі смугами контрольного GFP. Отримані дані вказують, що за умов швидкої транзійтної експресії вдається детектувати більші рівні накопичення рекомбінантного білка. Цей факт можливо обумовлений тим, що процеси сайленсінгу, притаманні рослинній клітині підчас експресії чужорідної генетичної інформації, не встигають досягти рівнів, достатніх для блокування трансгенів.

Висновки

Отже, в процесі виконання даної роботи було створено вектори для трансформації рослин, які містять химерні послідовності генів *fbpB::gfp* та *fbpB(Δ TMD)::gfp*. Поєднання туберкульозного антигену Ag85B та його варіанту Ag85B(Δ TMD) з маркерним білком GFP дало змогу виявити експресію деяких кількостей цільового білку в клітинах *N.benthamiana* за умов транзійтної експресії, частково локалізувати місця його накопичення та порівняти із експресією власне GFP. Також отримано ряд стабільно трансформованих ліній *N.tabacum* та *N.benthamiana*, методом ПЛІР-детекції доведено присутність трансгенів в даних лініях. Проведена робота є частиною великого дослідження щодо експресії та накопичення туберкульозних антигенів в рослинних клітинах, результати цієї роботи мають бути продовжені і розвинуті в наступних дослідженнях для з'ясування можливостей ефективної продукції антигенів в рослинних системах.

Література

1. *Mason H.S., Lam D.M.K., Arntzen C.J.* Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1992. — Vol. 89. — P. 11745–11749.
2. *Yusibov V., Hooper D., Spitsin S. et al.* Expression in plants and immunogenicity of plant virus-based experimental rabies vaccine // Vaccine. — 2002. — Vol. 20. — P. 3155–3164.

3. Chikwamba R.K., Scott M.P., Meja L.B. et al. Localization of a bacterial protein in starch granules of transgenic maize kernels // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.— 2003.— Vol.100.— P. 11127–11132.
4. Rigano M.M., Alvarez M.L., Pinkhasov J. et al. Production of a fusion protein consisting of the enterotoxigenic Escherichia coli heat-labile toxin B subunit and a tuberculosis antigen in Arabidopsis thaliana // Plant Cell Rep. 2004.— Vol.22.— P. 502–508.
5. Pogrebnyak N., Golovkin M., Andrianov V. et al. Severe acute respiratory syndrome (SARS) S protein production in plants: Development of recombinant vaccine // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.— 2005.— Vol.102.— P. 9062–9067.
6. Tacket C.O., Mason H.S., Lososky G. et al. Human immune responses to a novel norwalk virus vaccine delivered in transgenic potatoes // J. Infect. Dis.— 2000.— Vol.182.— P. 302–305.
7. Thanavala Y., Mahoney M., Pal S. et al. Immunogenicity in humans of an edible vaccine for hepatitis B // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.— 2005.— Vol.102.— P. 3378–3382.
8. Warzecha H., Mason H.S., Lane C. et al. Oral immunogenicity of human papillomavirus-like particles expressed in potato // J. Virol.— 2003.— Vol.77.— P. 8702–8711.
9. Rigano M.M., Dreitz S., Kipnis A.-P. et al. Oral immunogenicity of a plant-made, subunit, tuberculosis vaccine // Vaccine.— 2006.— Vol.24.— P. 691–695.
10. Ian S. Curtis, Michael R. Davey, J. Brian Power. Leaf Disk Transformation // Methods in Molecular Biology.— 1995.— Vol.44.— P. 59–70.
11. Gleba Y, Klimyuk V, Marillonet S (2005) Magnification — a new platform for expression vaccines in plants // Vaccine.— 2005.— Vol.23.— P. 2042–2048.

Резюме

Створено дві векторні конструкції для агробактеріальної трансформації рослин, які містять химерні послідовності генів *fbpB* та *fbpB*(Δ TMD) туберкульозної мікобактерії, поєднаних з маркерним геном *gfp*. Проведено генетичну трансформацію *N.tabacum* та *N.benthamiana* за допомогою агробактерії, в наслідок якої отримано ряд стабільних трансгенних ліній. Також детектовано транзйентну експресію химерного білку Ag85B(Δ TMD)::GFP в інфільтрованих листах *N.benthamiana*, яку частково охарактеризовано за допомогою цитологічних та біохімічних методів.

Создано две векторные конструкции для агробактериальной трансформации растений, которые содержат последовательности генов *fbpB* и *fbpB*(Δ TMD) туберкулезной микобактерии, соединенных с маркерным геном *gfp*. Проведена генетическая трансформация *N.tabacum* та *N.benthamiana* при помощи агробактерии, в результате которой получено ряд стабильных трансгенных линий. Также детектирована транзйентная экспрессия химерного белка Ag85B(Δ TMD)::GFP в инфильтрированных листьях *N.benthamiana*, которую частично охарактеризовали при помощи цитологических и биохимических методов.

Two vector constructs have been created for agrobacterial transformation. Vectors are possessed chimerical sequences of *fbpB* and *fbpB*(Δ TMD) genes which fused with marker *gfp* gene. Genetic transformation of *N.tabacum* and *N.benthamiana* has been performed by agrobacterium-mediated method. Stable transgenic lines were selected and transient expression of chimerical Ag85B(Δ TMD)::GFP protein was observed and partially characterized by cytological and biochemical methods.

**ВОЛЧОК Н.М., МИХАЙЛОВА М.Е., БЕЛАЯ Е.В., КАМЫШ Н.А.,
ТИХАНОВИЧ Н.И., МЕДВЕДЕВА Ю.В.**

*Институт генетики и цитологии НАН Беларуси,
Республика Беларусь, 220072, Минск, ул. Академическая, 27,
e-mail: natavolchok@yandex.ru*

(–1689) ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА АЛЬФА-ЛАКТАЛЬБУМИНА (α -LA) И ЕГО ВЗАИМОСВЯЗЬ С ПРИЗНАКАМИ МОЛОЧНОЙ ПРОДУКТИВНОСТИ КРС

Известно, что количество белков в молоке и их структура имеют большое экономическое значение для перерабатывающей промышленности и в значительной степени определяют количество и технологические свойства молока. Одним из таких биологически значимых протеинов является многофункциональный белок — α -лактальбумин (α -LA), входящий в состав молочной сыворотки, наличие которого является важным признаком качества молока, характеризующим его полезные свойства.

α -LA — небольшой глобулярный протеин, состоящий из 123 аминокислот и имеющий молекулярную массу 14 кД, играет важную роль в биосинтезе лактозы. При участии эпителиальных клеток молочной железы, α -LA в комплексе с галактозилтрансферазой участвует в формировании фермента лактозсинтазы, который, в свою очередь, синтезирует лактозу в аппарате Гольджи, а лактоза, затем, в комплексе с α -LA секретируется в молоко. Содержание α -LA и лактозы в коровьем молоке составляет около 1,5 г/л, что соответствует 5%. Лактоза, содержащаяся в секреторных везикулах эпителиальных клеток молочных желез, создает внутри клетки повышенное осмотическое давление, благодаря которому внутрь везикул поступает вода. Таким образом, повышение концентрации α -LA, являющегося ключевым регулятором синтеза лактозы, вызывает пропорциональное увеличение выхода молока [1].

Ген, кодирующий бычий α -лактальбумин (α -LA), локализован у КРС в 5 хромосоме и состоит из 2023 п.н., включая 4 экзона и 3 интрона. α -LA характеризуется наличием нескольких полиморфных вариантов: в позициях +15, +21, +54 [2] и –1689 [3], относительно точки старта транскрипции 5' фланкирующего региона. Вариабельность в этом регионе может приводить к различной способности связывания РНК-полимеразы и факторов транскрипции, участвующих в регуляции экспрессии гена. Теоретически, замены в последовательности генетических регуляторных элементов в данном участке могут изменять степень экспрессии мРНК, кодируемой этим геном [1].

Данные полиморфизмы являются следствием точковых мутаций, в частности в позиции –1689, замена аденина на гуанин приводит к образованию двух аллельных вариантов гена. Аденин в этой позиции был обозначен как А-аллель, а гуанин — как В-аллель [2, 3]. Lundén А. с соавт. была показана взаимосвязь между (–1689) полиморфизмом и концентрацией лактозы

в молоке. Так у коров с АА-генотипом с 1 кг молока выделяется лактозы больше на 0,08%, чем у особей с другими генотипами [4].

Таким образом, учитывая роль α -лактальбумина в биосинтезе лактозы и продукции молока в целом, ген α -LA может быть использован как потенциальный генетический маркер молочной продуктивности КРС, в частности удойности и белковомолочности.

Целью данного исследования было изучить (–1689) полиморфизм 52 фланкирующего региона гена α -лактальбумина, провести анализ генетической структуры популяций КРС некоторых животноводческих комплексов Беларуси по локусу α -LA, а также изучить взаимосвязь данного полиморфизма с признаками молочной продуктивности.

Материалы и методы

Исследования проводились на коровах и быках черно-пестрой породы, принадлежащих животноводческим комплексам Минской области. Для анализа были использованы образцы свежесамороженной спермы и крови. Выделение ДНК проводилось методом солевой экстракции по стандартной методике [5]. Выделенную ДНК ресуспензировали и измеряли ее концентрацию с помощью электрофореза в 0,8% агарозном геле, используя маркер молекулярного веса GeneRuler™1 kb DNA Ladder.

С целью типирования аллельных вариантов гена α -LA использовали метод ПЦР с последующим анализом ПДРФ. На основе данных о сиквенсе участка гена, в котором был обнаружен (–1689) полиморфизм [3], было синтезировано два олигонуклеотидных праймера, которые амплифицируют участок, размером 430 п.н., расположенный в пределах от –1803 до –1373, относительно точки старта транскрипции:

ALF-LAC1: 5'-aag agt tgg atg gaa tca cc-3'

ALF-LAC2: 5'-ttc aaa ttg ctg gca tca agc-3'

ПЦР проводили на программируемом термоциклере “Biometra” (Германия) в объеме 20 мкл, содержащем: 2 мкл 10x ПЦР-буфера, 2 мкл MgCl₂ (25 мМ), 0,5 мкл dNTP (10 мМ), по 1 мкл каждого из праймеров (10 пМ/мкл), 0,3 мкл Taq-полимеразы (5 еа/мкл), 2 мкл ДНК (20 нг/мкл). Вариант программы реакции амплификации состоял из следующих этапов: первичное плавление матрицы — 5 мин — 94 °С; 30 циклов (30 с — 95 °С; 30 с — 63 °С; 30 с — 72 °С); синтез — 10 мин — 72 °С. Полученный таким образом амплификат подвергался гидролизу рестрицирующей эндонуклеазой *Sdu I* в соответствующем буфере [6]. Продукты рестрикции разделяли в 2% агарозном геле в течение часа при напряжении 40 в (в качестве маркера использовали 50 br DNA Lader (Fermentas)), визуализировали в УФ-транслюминаторе при длине волны 310 нм. И регистрировали с помощью цифровой фотокамеры Canon. Аллельные варианты гена α -LA определяли по количественным и качественным признакам ПДРФ. Наличие двух полос размером 328 и 102 пн. соответствовало генотипу АА; четырех полос размером 328, 211, 117 и 102 пн. — генотипу АВ, трех полос размером 211, 117 и 102 пн. — генотипу ВВ.

Результаты и обсуждение

Как отмечено в работах других исследователей наиболее предпочтительным генотипом, ассоциированным с повышенным содержанием лактозы в молоке, а, следовательно, с повышенным удоем, является генотип АА [2, 4]. Проведенный нами анализ генетической структуры популяций КРС по локусу α -LA выявил следующее распределение частот генотипов: АА — 45,9%; АВ — 43,3% и ВВ — 10,8%. Частота встречаемости аллелей А и В в среднем составила 0,68 и 0,32 соответственно (табл. 1), что согласуется с данными, полученными зарубежными коллегами [2, 3]. Наибольшая частота предпочтительного А-аллеля была зарегистрирована в популяции РСУП “Минскплемпредприятие”, где она составила 0,73, а наименьшая в РУСПП “1-я Минская птицефабрика” — 0,54.

Для выяснения ассоциации аллельных вариантов гена α -LA с молочной продуктивностью КРС, а именно, общим удоем за 305 суток, процентным содержанием жира и белка в молоке, нами была проведена теоретическая оценка коров по данным признакам на основании информации, содержащейся в племенных картах. Полученные результаты были проанализированы и сопоставлены, с этой целью для каждого животного рассчитывались средние значения показателей вышеперечисленных признаков. Затем среднее значение каждого из показателей было рассчитано для отдельной группы генотипов (табл. 2).

Таблица 1

Генетическая структура популяций быков и коров белорусской черно-пестрой породы по локусу α -лактальбумина

Принадлежность	Количество особей (n)	Частота встречаемости				
		генотипов, %			аллелей	
		АА	АВ	ВВ	А ± Sp	В ± Sp
РСУП “Минск племпредприятие”	148 ♂	56,1	33,8	10,1	0,73±0,036	0,27±0,036
РУСП “Племенной завод Красная звезда”	50 ♀	40,0	46,0	14,0	0,63±0,068	0,37±0,068
СПК “Агрокомбинат “Снов”	290 ♀	47,6	45,5	6,9	0,70±0,027	0,30±0,027
РУСПП “1-я Минская птицефабрика”	98 ♀	28,6	50,0	21,4	0,54±0,050	0,46±0,050
Всего	586	45,9	43,3	10,8	0,68±0,019	0,32±0,019

Таблица 2

Средние показатели продуктивности коров по аллельным вариантам гена α -LA

	Удой (л) ±Sp	Жир (%)±Sp	Белок (%)±Sp
α -LA ^{AA}	9517,4±106,8	3,78±0,03	3,17±0,01
α -LA ^{AB}	9269,0±101,8	3,79±0,02	3,18±0,01
α -LA ^{BB}	9006,2±179,8	3,88±0,02	3,17±0,01

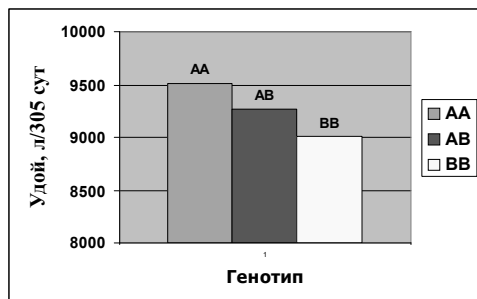


Рис. 1. Средний показатель удоя за 305 сут. лактации у коров разных генотипов

Из представленной диаграммы, очевидно, что наибольший уровень продуктивности по показателям общего удоя характерен для коров с генотипом α -LA^{AA}. Особи с генотипом α -LA^{BB} имеют по удою наименьшие показатели. В частности, рассчитано, что животные с генотипом α -LA^{AA} имеют в среднем, на 5,4% больший показатель по этому признаку по сравнению с особями, обладающими α -LA^{BB} генотипом (рис. 1).

Относительно показателей процентного содержания в молоке белка и жира нами не было выявлено статистически достоверных различий между обладателями α -LA^{AA} и α -LA^{BB} генотипов.

Таким образом, проведение генотипирования крупного рогатого скота по (–1689) полиморфизму гена α -LA, с целью выявления ценных аллельных вариантов, можно использовать в маркер-зависимой селекции, направленной на увеличение удоя.

Выводы

Проведено ДНК-типирование аллельного варианта А гена α -актальбумина в популяциях КРС, определены частоты данного аллеля в различных хозяйствах. Экспериментально доказана ассоциация (–1689) полиморфизма гена α -LA с признаками молочной продуктивности, в частности — положительная корреляция А аллеля с общим удоем. Показана возможность практического использования метода ПЦР-диагностики и генотипирования крупного рогатого скота по гену α -LA в маркер-зависимой селекции, направленной на увеличение продукции молока.

Литература

1. Bleck G.T., Bremel R.D. Correlation of the α -lactalbumin (+15) polymorphism to milk production and milk composition of holsteins // J. Dairy Sci.— 1993.— Vol.76.— P. 2292–2298.
2. Bojaroj-nosowicz B., Kaczmarczyk E., Bongarc E., MaBolepszy J. Natural BLV infection and polymorphism within the 5' flanking region of the α -lactalbumin gene in black-and-white breed cattle // Bull Vet. Inst. Pulawy.— 2005.— Vol.49.— P. 439–442.
3. Voelker G.R., Bleck G.T., Wheeler M.B. Single-base polymorphisms within the 5' flanking region of the bovine α -lactalbumin gene // J. Dairy Sci.— 1997.— Vol.80.— P. 194–197.

4. Lundén A., Lindersson M. α -Lactalbumin polymorphism in relation to milk lactose // "Proc. Vth World Congr. on Gen. Appl. to Livestock Prod., Armidale, NSW, Australia, 11–16 January".— 1998.— Vol.25.— P. 47–50.

5. Зиновьева Н.А., Гладырь Е.А., Эрнст Л.К., Брем Г. Введение в молекулярную генную диагностику сельскохозяйственных животных.— Дубровицы.— 2002.— 112 с.

6. Kamiński S. Identification of Sdu I polymorphism within 5' flanking region of bovine alpha-lactalbumin gene // Anim. Sci. Pap. Rep.— 1999.— Vol.17.— P. 23–27.

Резюме

Изучен (–1689) полиморфизм гена α -LA, проведен анализ генетической структуры популяция КРС по данному локусу α -LA, определены частоты ценного аллельного варианта А в различных хозяйствах РБ. Показана положительная корреляция А аллеля с общим удоем, а также возможность практического использования метода ПЦР-диагностики КРС по гену α -LA в маркер-зависимой селекции, направленной на увеличение удоа.

Polimorphism (–1689) of α -LA gene was studied, analysis of genetic structure of cattle populations for the given α -LA locus was made and frequencies of the valuable allelic variant A were determined in various farms of the Republic of Belarus. A positive correlation of A allele to the total milk yield as well as the scope for practical application of PCR-diagnostics method in cattle for α -LA gene in marker-dependent breeding, aimed at an increase in milk yield, was shown.

ВОРОНКОВ А.С., АНДРЕЕВ И.М., ТИМОФЕЕВА Г.В., КОВАЛЕВА Л.В.

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

ГОРМОНАЛЬНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ *IN VITRO* ПРОРАСТАЮЩЕГО МУЖСКОГО ГАМЕТОФИТА ПЕТУНИИ: МЕДИАТОРНАЯ РОЛЬ SA^{2+} И АФК В ИУК-ИНДУЦИРОВАННОЙ СТИМУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ H^+ -АТФАЗЫ ПЛАЗМАЛЕММЫ

Прорастание пыльцевых зерен *in vitro* сопровождается заметными изменениями в уровне эндогенных фитогормонов и чувствительно к действию экзогенных фитогормонов [1–2]. В частности, показано, что экзогенные ауксин (ИУК), абсцизовая кислота (АБК) и гиббереллин (ГК₃) способны существенно стимулировать прорастание пыльцы и рост пыльцевых трубок, выявлены существенные различия в гормональном статусе системы пыльца-пестик после самосовместимого и самонесовместимого опылений [3]. Перечисленные факты указывают на активную роль фитогормонов в процессах прорастания мужского гаметофита, однако механизмы их действия остаются неисследованными. Практически ничего не известно, в частности, о возможной роли ион-транспортирующих систем плазмалеммы пыльцевого зерна в гормон-индуцируемой стимуляции прорастания и роста мужского гаметофита.

Результаты, полученные в последние годы, указывают на важную роль транспорта основных физиологически активных ионов, таких как H^+ , Ca^{2+} и K^+ , через плазмалемму пыльцевого зерна в регуляции процесса прорастания мужского гаметофита [4]. Недавно проведенные нами исследования показали, что цитоплазматический pH (pH_c) прорастающих пыльцевых зерен петунии заметно возрастал в течение 5–10 минут после обработки их экзогенными фитогормонами, причем этот эффект полностью блокировался в присутствии ортованадата, известного ингибитора АТФ-зависимого протонного насоса на плазмалемме растительных клеток [5]. Эти наблюдения дали нам основание для предположения о том, что фитогормон-индуцированный сдвиг pH_c обусловлен стимуляцией фитогормоном активности H^+ -АТФазы плазмалеммы мужского гаметофита.

Мы проверили справедливость данного предположения, а именно выяснили, способны ли фитогормоны вызывать гиперполяризацию плазмалеммы мужского гаметофита путем стимуляции ими электрогенной активности H^+ -АТФазы. С этой целью мы исследовали действие экзогенной ИУК на величину мембранного потенциала плазмалеммы, следя за его изменением с помощью катионного потенциал-чувствительного красителя сафранина O, часто применяемого для регистрации изменений соответствующей полярности (“минус” на внутренней поверхности мембраны) как в клеточных оргanelлах и везикулах различной природы, так и в целых клетках.

Материалы и методы

В экспериментах использовали пыльцу, свежесобранную с растений петунии (*Petunia hybrida* L.), выращенных в оранжерее Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН. Жизнеспособность пыльцевых зерен оценивали согласно методике Alexander на световом микроскопе Axio Imedger D1 (Carl Zeiss, Германия), и в проведенных экспериментах она достигала 70–80%. Пыльцевые зерна культивировали при 26 °C в течение 1 часа на среде, содержащей 0,4 М сахарозу и 1,6 мМ H_3BO_3 . Процент прорастания пыльцевых зерен составлял 70–75%, длина пыльцевых трубок достигала 20–25 мкм. Микрофотография прорастающего в течение 1 часа пыльцевого зерна петунии, отражающая его морфологическое состояние, представлена на рис. 1.

Изменения мембранного потенциала пыльцевых зерен регистрировали с помощью катионного потенциал-чувствительного красителя сафранина O, следя за разностью его абсорбционных изменений при 554 и 524 нм ($DA_{554-524} = A_{554} - A_{524}$) на двух-волновом спектрофотометре Hitachi-557 (Япония). Суспензия пыльцевых зерен в среде культивирования, содержащая примерно 0,8 мг пыльцы (или ~40 000 пыльцевых зерен), была добавлена к среде измерения, содержащей 0,3 М сахарозу, 25 мМ MES-Трис (pH 6,9) и 10 мкМ сафранина O, и перед началом измерений была инкубирована в ней в течение примерно 20–30 минут для достижения относительно стационарного уровня абсорбционных изменений сафранина O, связанных с его распределением между средой измерения и пыльцевыми зернами. Все эксперименты были выполнены в трехкратной повторности.

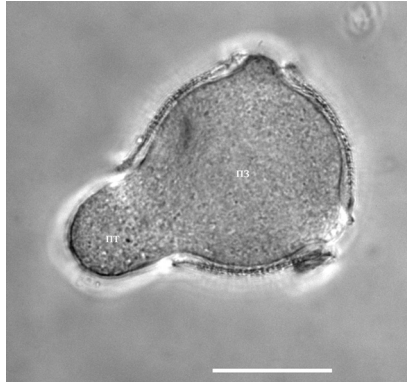


Рис. 1. Мужской гаметофит петунии (культивирование — 1 час):
ПЗ — пыльцевое зерно, ПТ — пыльцевая трубка Бар = 40 мкм

Результаты и обсуждение

Поскольку сафранин О как потенциал-чувствительный индикатор ранее не применялся другими авторами для регистрации поляризации мембран в пыльцевых зернах высших растений, мы предварительно протестировали и убедились в возможности его использования для наблюдений за поляризацией плазмалеммы в прорастающем мужском гаметофите петунии.

ИУК-индуцируемая гиперполяризация мембран в прорастающем мужском гаметофите петунии. Используя липофильный потенциал-чувствительный катионный краситель сафранин О, исследовали действие экзогенного ИУК на величину мембранного потенциала плазмалеммы в клетках прорастающих пыльцевых зерен петунии с целью выяснения вопроса о том, чувствительна ли электрогенная активность H^+ -АТФазы плазмалеммы к действию этого фитогормона. Была прослежена кинетика изменений абсорбционных изменений сафранина О в присутствии экзогенного ауксина, добавленного в концентрации 2,5 мкМ к пыльцевым зернам, предварительно инкубированным в течение 20–30 минут в среде измерения, не содержащей ионов калия, с красителем. Обнаружено, что добавление ИУК к суспензии пыльцевых зерен в среде, не содержащей ионов K^+ , инициировало выраженную гиперполяризацию их плазмалеммы, и этот эффект полностью блокировался ортованадатом, Са-активными соединениями, такими как ЭГТА и верапамил, ДФИ — известным ингибитором НАДФН-оксидазы, функционирующей на плазматической мембране животных и растительных клеток, а также существенно подавлялся сантимоллярными концентрациями ионов K^+ в среде инкубации пыльцевых зерен. Показано, что гиперполяризующее действие ИУК имитировалось перекисью водорода, причем H_2O_2 -индуцированный сдвиг мембранного потенциала подавлялся теми же соединениями, что ингибировали увеличение мембранного потенциала на внешней клеточной мембране пыльцевых зерен, запускаемое ИУК.

Чувствительность ИУК-индуцированной гиперполяризации плазмалеммы к ЭГТА и верапамилу. К настоящему времени установлено, что действие ИУК на растительные клетки может быть опосредовано временным увеличением уровня Ca^{2+} в цитозоле [6]. Поэтому в последующих экспериментах мы решили проверить, зависит ли ИУК-индуцированная гиперполяризация клеточных мембран пыльцевых зерен петунии от поступления ионов Ca^{2+} внутрь клеток из внеклеточной среды. С этой целью было прослежено действие хелатора Ca^{2+} ЭГТА, а также верапамила — известного блокатора Ca^{2+} -каналов клеточных мембран на ИУК-индуцируемый сдвиг мембранного потенциала пыльцевых зерен. В среде измерения, дополненной 0,5 мМ ЭГТА, добавление ИУК к пыльцевым зернам приводило только к очень слабому возрастанию абсорбционного сигнала сафранина О. Полагая, что наблюдаемый эффект ЭГТА связан с сильным снижением уровня Ca^{2+} во внеклеточной среде и тем самым с предотвращением его поступления внутрь клеток через плазмалемму, мы проверили, чувствителен ли эффект ИУК непосредственно к блокаторам трансмембранного транспорта кальция. Было обнаружено, что эффект, подобный ЭГТА, имеет место как в присутствии верапамила, известного блокатора Ca^{2+} -каналов L-типа, так и LaCl_3 , другого известного ингибитора трансмембранного транспорта Ca^{2+} в животных и растительных клетках.

Чувствительность ИУК-индуцированной гиперполяризации мембран к дифенилен иодониуму и имитация действия ИУК перекисью водорода. Принимая во внимание недавно установленные факты, что в трансдукцию гормональных сигналов в растительных клетках способны включаться активные формы кислорода (АФК) [7], мы протестировали возможность участия их в передаче гормонального сигнала, приводящего к гиперполяризации плазмалеммы прорастающего мужского гаметофита петунии. В ходе этих экспериментов было установлено, что, во-первых, гиперполяризующий эффект ИУК чувствителен к дифенилен иодониуму (ДФИ), известному ингибитору НАДФН-оксидазы, функционирующей на плазмалемме растительных клеток и способной к генерации АФК, и полностью подавлялся этим ингибитором. Во-вторых, выяснилось, что наблюдаемый эффект ИУК может быть имитирован просто добавлением к суспензии пыльцевых зерен миллимолярной концентрации перекиси водорода, причем выявленное действие H_2O_2 подавлялось в присутствии ортованадата, а также тех же концентраций ДФИ и Са-активных агентов — ЭГТА и верапамила, что блокировали ИУК-индуцированную гиперполяризацию мембран пыльцевых зерен. Было найдено, кроме того, что подобное ингибирующее действие на запускаемый H_2O_2 сдвиг мембранного потенциала обнаруживал и LaCl_3 .

На основании полученных данных сделано заключение о том, что гиперполяризация плазмалеммы мужского гаметофита петунии под действием ИУК является результатом стимуляции фитогормоном электрогенной активности АТФ-зависимого протонного насоса в этой мембране и что эффект ИУК опосредован транзитным увеличением уровня Ca^{2+} в цитозоле и гене-

рацией в нем АФК. Исследования, проведенные в последние годы, показали, что активность этого фермента вносит существенный вклад в установление внутриклеточного протонного градиента, играющего фундаментальную роль в прорастании и росте мужского гаметофита [8].

Литература

1. 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.— Т.52.— С. 584–590.
2. Kovaleva L.V., Zakharova E.V., Minkina Y.V., Voronkov A.S. Effects of Flavornols and Phytohormones on Germination and Growth of Petunia Male Gametophyte // Allelopathy Journal.— 2009.— V.23.— P. 51–62.
3. Kovaleva L., Zakharova E. Hormonal Status of the Pollen-Pistil System at the Progamic Phase of Fertilization After Compatible and Incompatible Pollination in *Petunia hybrida* L. // Sex. Plant Reprod.— 2003.— V.16.— P.191–196.
4. Holdaway-Clarke T.L., Hepler P.K. Control of Pollen Tube Growth: Role of Ion Gradients and Fluxes // New Phytol.— 2003.— V.159.— P. 539–563.
5. Андреев И.М., Тимофеева Г.В., Минкина Ю.В., Ковалева Л.В. Изменения внутриклеточного pH пыльцевых зерен *Petunia hybrida* L. под действием экзогенных фитогормонов // Физиология растений.— 2007.— Т.54.— С. 707–714.
6. Mahalakshmi A., Singla B., Khurana J.P., Khurana P. Role of Calcium-Calmodulin in Auxin-Induced Somatic Embryogenesis in Leaf Base Cultures of Wheat (*Triticum aestivum* var. HD 2329) // Plant Cell Organ Cult.— 2007.— V.88.— P. 167–174.
7. Joo J.H., Yoo H.J., Hwang I., Lee J.S., Nam K.H., Bae Y.S. Auxin-Induced Reactive Oxygen Species Production Requires the Activation of Phosphatidylinositol 3-Kinase // FEBS Lett.— 2005.— V.579.— P. 1243–1248.
8. Potocky M., Jones M.A., Bezvoda R., Smirnov N., Zarsky V. Reactive Oxygen Species Produced by NADPH Oxidase are Involved in Pollen Tube Growth // New Phytol.— 2007.— V.174.— P. 742–751.

Резюме

Используя липофильный краситель сафранин О, исследовано действие экзогенной ИУК на мембранный потенциал плазмалеммы *in vitro* прорастающего мужского гаметофита петунии и установлено, что ИУК-индуцированная гиперполяризация плазмалеммы является результатом стимуляции активности АТФ-азы, опосредованной транзиторным увеличением уровня Ca^{2+} в цитозоле и генерацией АФК.

Використовуючи ліпофільний барвник сафранін О, досліджено дію екзогенної ІОК на мембранний потенціал плазмалемми *in vitro*, проростаючого чоловічого гаметофіту петунії й встановлено, що ІОК-індукована гіперполяризація плазмалемми є результатом стимуляції активності АТФ-ази, опосередкованої транзиторним збільшенням рівня Ca^{2+} у цитозолі й генерацією АФК.

Using the dye safranin O, effect of exogenous IAA on membrane potential of plasmic membrane of *in vitro* germinating petunia male gametophyte is investigated and established that the IAA-induced hyperpolarization of plasmic membrane is result of the stimulation of ATPase activity mediated by increase of cytosolic Ca^{2+} and ROS generation.

ДМИТРУК К.В.

*Інститут біології клітини НАН України, 79005, Львів, вул. Драгоманова 14/16,
e-mail: dmytruk@cellbiol.lviv.ua*

МЕТАБОЛІЧНА ІНЖЕНЕРІЯ ДРІЖДЖІВ *HANSENULA POLYMORPHA* ТА *PICHLIA STIPITIS* ДЛЯ КОНСТРУЮВАННЯ ШТАМІВ З ПОКРАЩЕНОЮ АЛКОГОЛЬНОЮ ФЕРМЕНТАЦІЄЮ КСИЛОЗИ

Потреби людства в енергії невпинно зростають і якщо в 20 сторіччі викопні джерела цілком забезпечували енергетичні потреби, то у 21 сторіччі ситуація кардинально змінюється. Стрімке вичерпання викопного палива приводить до нестабільності у цінній політиці на енергоносії, особливо на нафту. Спалювання викопних енергоносіїв призводить до погіршення екологічної ситуації внаслідок вивільнення в атмосферу додаткового вуглекислого газу, посилюючи парниковий ефект. Вирішити посталу проблему можна шляхом обмеження спалювання викопних джерел, застосовуючи енергозощаджуючі технології та/або заміною викопних джерел енергії поновлювальними, наприклад рослинною біомасою (лігноцелюлозою). Одним з найбільш розповсюджених типів біопалива отриманих з рослинної біомаси є етанол. На сьогодні етанол отримують з цукру (Бразилія) або крохмалю (США). Вихідна сировина також використовується в їжу людини і в корм тваринам, що обмежує її широке застосування для отримання біоетанолу. До того ж зменшення кількості парникових газів в результаті використання етанолу з цукру чи крохмалю є недостатнім [1]. Встановлено, що етанол із зернових культур суттєво не знижує викиди парникових газів, тоді як використання біомаси замість традиційної сировини для отримання біопалива має суттєві переваги у зниженні викидів парникових газів, адже потребує менше викопного палива для його отримання [2]. Основною причиною збереження енергії та обмеження посилення парникового ефекту при отриманні біопалива з целюлози є наявність побічного продукту переробки біомаси до етанолу — лігніну, що використовується як джерело енергії замість природного газу, що спалюється на більшості спиртзаводах. Іншою підставою для позитивної оцінки отримання етанолу з лігноцелюлози є той факт, що з біомаси можна отримати більше етанолу з одиниці площі. В середньому з одного гектару зернових культур отримують до 4000 літрів спирту. Для підвищення рентабельності, залишкова солома могла би бути перетворена на додаткові 1400 літрів спирту. Використання зернових, що дають більшу біомасу, наприклад просо, також потребують менші затрати викопного палива, підвищуючи сумарний вихід енергії [3]. Лігноцелюлоза доступна у великих кількостях у складі залишків сільського господарства та деревообробної промисловості (солома, тирса, кукурудзяний качан, стебла кукурудзи, лузга соняшникового насіння, кора дерев тощо). Це комплексна сполука з декількох полімерів, що містить окрім глюкози і інші цукри, серед яких п'ятивуглецевий цукор, ксилоза — другий найбільш поширений цукор.

Основною проблемою, на шляху до розробки економічно вигідної технології конверсії цукрів лігноцелюлози до етанолу є відсутність мікроорганізмів, здатних ефективно ферментувати не лише глюкозу, а й ксилозу. Винні дріжджі *Saccharomyces cerevisiae*, які традиційно використовуються для отримання етанолу, нездатні ферментувати пентози. Відомо декілька мікроорганізмів здатних до алкогольної ферментації ксилози, зокрема дріжджі *Hansenula polymorpha* та *Pichia stipitis*. Проте вихід етанолу під час мікробної ферментації ксилози є недостатньо високий, що робить цей процес економічно не вигідним. Використання методів метаболічної інженерії дозволяє покращити параметри алкогольної ферментації.

Метаболічна інженерія це сукупність методів та технологій для створення та вдосконалення організмів із заданими характеристиками. Основний принцип метаболічної інженерії полягає у максимально ефективному перетворенні одних сполук в інші. Ефективність перетворення досягається посиленням ланок бажаного шляху метаболізму та обмеженням відтоку метаболітів у суміжні біохімічні шляхи. Такі маніпуляції здійснюються за допомогою методів генної інженерії, посилюючи експресію одних генів та знижуючи або зупиняючи експресію інших, або шляхом введення чужорідних генів. У дріжджів посилення експресії цільового гену досягається шляхом заміни власного промотора на сильний конститутивний або регульований. Тоді як обмеження експресії досягається пошкодженням (делецією) відповідного гена.

Дріжджі *Hansenula polymorpha*

Метилотрофні термотолерантні дріжджі *Hansenula polymorpha* — унікальний організм, здатний до алкогольної ферментації ксилози та глюкози при високій температурі (45–50 °C). Здатність до ферментації лігноцелюлозних цукрів при високій температурі перетворює *H. polymorpha* у перспективний організм для розробки ефективного процесу одночасної сахарифікації та ферментації, при якому ензиматичний гідроліз лігноцелюлози целюлазами та геміцелюлазами, температурний оптимум яких біля 55 °C, відбувається одночасно з ферментацією вивільнених моносахаридів до етанолу. Це обмежує ретроінгібування ензиматичного гідролізу кінцевими продуктами [4].

Метилотрофні дріжджі *H. polymorpha* є одним з найдокладніше вивчених видів неконвенційних дріжджів. Дріжджі *H. polymorpha* є привабливим об'єктом як з наукової так і з практичної точки зору. Ці дріжджі є об'єктом дослідження механізмів термотолерантності, гомеостазу пероксисом, продукції гетерологічних білків та високотемпературної алкогольної ферментації [5]. Промислове використання *H. polymorpha* обумовлене декількома цікавими особливостями цього виду дріжджів. Дріжджі *H. polymorpha* здатні нагромаджувати значну біомасу у ферментерах, що забезпечує високі виходи цільових продуктів. Як і *S. cerevisiae*, дріжджі *H. polymorpha* ростуть на дешевих та простих поживних середовищах, для них розроблені генетичні методи, є досвід у промисловому використанні та масштабуванні. *H. poly-*

morpha розглядаються як генетично безпечні організми, що не містять патогенів або вірусних інфекцій. До того ж завершено визначення нуклеотидної послідовності геному цих дріжджів, що перетворює *H. polymorpha* у зручний організм для метаболічної інженерії, модифікації та покращення певних біохімічних шляхів. Як зазначалось вище, дріжджі *H. polymorpha* здатні до високотемпературної алкогольної ферментації глюкози, ксилози та целобіози, основних цукрів лігноцелюлозних гідролізатів [6]. Однак ефективність алкогольної ферментації ксилози штамами дикого типу є недостатньо високою. Для покращення виходу етанолу з ксилози, ген бактерійної ксилозоізомерази разом з гомологічним геном ксилулокінази були успішно експресовані в *H. polymorpha* [7; 8]. Експресія модифікованої форми ксилозоредуктази разом з експресією ксилітолдегідрогенази, ксилулокінази та піруватдекарбоксілази призводила до покращення параметрів алкогольної ферментації ксилози при високій температурі (45–48 °C) [9; 10]. Термотолерантність цих дріжджів може бути надалі покращеною шляхом делеції гену, що кодує кислу трегалазу або шляхом посилення експресії генів теплового шоку [11]. Гетерологічні гени, що кодують амілолітичні (α -амілаза та глюкоамілаза) та ксиланолітичні (ендоксилаза та β -ксилозидаза) ферменти були успішно експресовані в *H. polymorpha*, що забезпечило отримання рекомбінантних штамів здатних до високотемпературної алкогольної ферментації крохмалю та ксилану [12]. Покращення параметрів алкогольної ферментації було також досягнуте шляхом застосування методу позитивної селекції із додаванням у середовище токсичних аналогів глюкози та пірувату — 2-дезоксиглюкози та 3-бромпірувату, відповідно. Мутанти, на середовищі з ксилозою з додаванням токсичних концентрацій 2-дезоксиглюкози, можуть виникати внаслідок різних причин, в тому числі внаслідок активації ферментів метаболізму цієї пентози. Тоді як 3-бромпіруват специфічно інгібує ключові ферменти гліколізу-гексокіназу, піруваткіназу та піруватдекарбоксілазу. Такий підхід було застосовано для селекції дріжджових мутантів з підвищеною ефективністю утворення етанолу. Встановлено, що спонтанні мутанти, резистентні до токсичних концентрацій 2-дезоксиглюкози та 3-бромпірувату характеризуються підвищеним рівнем алкогольної ферментації ксилози в півтора-два рази.

В загальному, синтез етанолу з ксилози було підвищено в 10–15 разів. Однак сконструйовані штами у синтезі та продуктивності етанолу з ксилози поступаються дріжджам *P. stipitis* та найкращим з рекомбінантних штамів *S. cerevisiae*. Максимальна кількість етанолу при ферментації ксилози сконструйованими штамами сягала 10 г/л при 45–48 °C, тоді як для рентабельного застосування технології одночасної сахарифікації та ферментації необхідно досягнути концентрації етанолу 30 г/л.

Дріжджі *Pichia stipitis*

Дріжджі *P. stipitis* є найкращими ферментатором ксилози з усіх відомих мікроорганізмів. Дріжджі *P. stipitis* володіють широким спектром целюлолітичних ферментів. Такі особливості цього організму обумовлені його

природною екологічною нішою. Ці дріжджі були виявлені в кишківнику жуків-пасалідів, що використовують у їжу деревину *P. stipitis* розглядається як надзвичайно перспективний організм для ферментації гідролізатів залишків сільського господарства та деревообробної промисловості. Нещодавно було визначено послідовність нуклеотидів геному дріжджів *P. stipitis* та проведена його анотація [13]. Разом з тим з'явилась стаття, де описано загальний рівень експресії генів залучених у катаболізмі гексоз і пентоз [14]. Встановлено, що рівень експресії генів, що кодують перші два ферменти катаболізму ксилози — ксилоредуктаза та ксилітолдегідрогеназа суттєво підвищуються. Беручи до уваги дисбаланс нуклеотидних кофакторів було посилено експресію модифікованої форми ксилоредуктази із зниженою спорідненістю до NADPH, а також ксилітолдегідрогенази. Відповідні гени було поєднано із сильним конститутивним промотором гліколітичного гену, що кодує гліцеральдегідфосфатдегідрогеназу та введено в реципієнтний штам. В результаті було отримано суттєве покращення алкогольної ферментації ксилози, на 39% при посиленні експресії модифікованої форми ксилоредуктази та на 40% при посиленні експресії ксилітолдегідрогенази.

Окрім того проводилось посилення експресії генів, що кодують пірватдекарбоксілазу та алкогольдегідрогеназу. Ці ферменти беруть участь в останніх реакціях синтезу етанолу. А також гени неокислювальної ланки пентозофосфатного шляху — трансальдолазу та транскетолазу, за участі яких метаболізм ксилози сполучається з гліколізом. Одночасне посилення експресії усіх чотирьох генів стимулювало алкогольну ферментацію ксилози на 34%.

Майбутні перспективи

Незважаючи на значні успіхи у конструюванні рекомбінантних мікроорганізмів — продуцентів паливного етанолу, отримати промисловий продуцент етанолу другого покоління поки що не вдається. Ведеться активна пошукова робота у напрямках покращення ефективності транспорту ферментуючого субстрату у клітину, гліколізу, блокування реутилізації утвореного етанолу, зниження чутливості мікроорганізмів до синтезованого етанолу та інших інгібіторів ферментації, обмеження зростання біомаси, регуляція синтезу етанолу, розробка ефективних методів селекції продуцентів етанолу тощо. Враховуючи першочерговість та гостроту світових проблем енергозабезпечення та екологічного балансу, ефективні продуценти етанолу з повноланою сировини будуть створені в близькому майбутньому.

Література

1. Farrell A., Plevin R., Turner B., Jones A.D., O'Hare M., Kammen D. Ethanol can contribute to energy and environmental goals // Science.— 2006.— Vol.311.— P. 506–508.
2. Hill J., Polasky S., Nelson E., Tilman D., Huo H., Ludwig L., Neumann J., Zheng H., Bonta D. Climate change and health costs of air emissions from biofuels and gasoline // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.— 2009.— Vol.106.— P. 2077–2082.

3. Schubert C. Can biofuels finally take center stage? // Nat. Biotechnol.— 2006.— Vol.24.— P. 777–784.
4. Olofsson K., Bertilsson M., Lidén G. A short review on SSF — an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks // Biotechnol. Biofuels.— 2008.— Vol.1(1): 7.
5. Gellissen G. (Ed.) (2002) *Hansenula polymorpha* — Biology and Applications. Wiley-VCH, Weinheim.
6. Ryabova O., Chmil O., Sibirny A. Xylose and cellobiose fermentation to ethanol by the thermotolerant methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* // FEMS Yeast Res.— 2003.— Vol.4.— P. 157–164.
7. Voronovsky A., Ryabova O., Verba O., Ishchuk O., Dmytruk K., Sibirny A. Expression of *xylA* genes encoding xylose isomerases from *Escherichia coli* and *Streptomyces coelicolor* in the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* // FEMS Yeast Res.— 2005.— Vol.5.— P. 1055–1062.
8. Dmytruk O., Voronovsky A., Abbas C., Dmytruk K., Ishchuk O., Sibirny A. Overexpression of bacterial xylose isomerase and yeast host xylulokinase improves xylose alcoholic fermentation in the thermotolerant yeast *Hansenula polymorpha* // FEMS Yeast Res.— 2008.— Vol.8.— P. 165–173.
9. Dmytruk O., Dmytruk K., Abbas C., Voronovsky A., Sibirny A. Engineering of xylose reductase and overexpression of xylitol dehydrogenase and xylulokinase improves xylose alcoholic fermentation in the thermotolerant yeast *Hansenula polymorpha* // Microbial Cell Factories.— 2008.— 7: 21.
10. Ishchuk O., Voronovsky A., Stasyk O., Gayda G., Gonchar M., Abbas C., Sibirny A. Overexpression of pyruvate decarboxylase in the yeast *Hansenula polymorpha* results in increased ethanol yield in high-temperature fermentation of xylose // FEMS Yeast Res.— 2008.— Vol.8.— P. 1164–1174.
11. Ishchuk O., Voronovsky A., Abbas C., Sibirny A. Construction of *Hansenula polymorpha* strains with improved thermotolerance // Biotechnol. Bioeng.— 2009.— Vol.104.— P. 911–919.
12. Voronovsky A., Rohulya O., Abbas C., Sibirny A. Development of strains of the thermotolerant yeast *Hansenula polymorpha* capable of alcoholic fermentation of starch and xylan // Metab. Eng.— 2009.— Vol.11.— P. 234–242.
13. Jeffries T., Grigoriev I., Grimwood J., Laplaza J., Aerts A., Salamov A., Schmutz J., Lindquist E., Dehal P., Shapiro H., Jin Y., Passoth V., Richardson P. Genome sequence of the lignocellulose-bioconverting and xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis* // Nat. Biotechnol.— 2007.— Vol.25.— P. 319–326.
14. Jeffries T., Van Vleet J. *Pichia stipitis* genomics, transcriptomics, and gene clusters // FEMS Yeast Res.— 2009.— Vol.9.— P. 793–807.

Резюме

За допомогою методів метаболічної інженерії було сконструйовано рекомбінантні штами дріжджів *H. polymorpha* та *P. stipitis* з покращеною алкогольною ферментацією ксилози.

С помощью методов метаболической инженерии сконструированы рекомбинантные штаммы дрожжей *H. polymorpha* и *P. stipitis* с улучшенными параметрами алкогольной ферментации ксилозы.

Recombinant yeast strains of *H. polymorpha* and *P. stipitis* with increased alcoholic fermentation of xylose were constructed using metabolic engineering approaches.

**ЖАРИКОВА Н.В., КОРОБОВ В.В., АНИСИМОВА Л.Г., ЯСАКОВ Т.Р.,
ЖУРЕНКО Е.Ю., МАРКУШЕВА Т.В.**

Учреждение РАН Институт биологии УНЦ РАН,

Россия, 450054, Уфа, ул. Проспект Октября, 61, e-mail: tvmark@anrb.ru

ВОЗМОЖНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ КУЛЬТУРЫ *GLUCONOBACTER OXYDANS* 2Т В ОБЛАСТИ РЕМЕДИАЦИИ ПОЧВ ОТ ГЕРБИЦИДА 2,4,5-Т

2,4,5-трихлорфеноксиуксусная кислота (2,4,5-Т) — синтетическое соединение, используемое в качестве гербицида для борьбы с древесной и кустарниковой растительностью, обработки газонов, лесных угодий, пастбищ. Вместе с тем в ряде работ было показано, что 2,4,5-Т способна оказывать значительный мутагенный и канцерогенный эффект на живые системы [1]. Отмечено, что 2,4,5-Т является недоступным или малодоступным источником углерода и энергии для большинства микроорганизмов, что ведет к накоплению и постепенному распространению этого ксенобиотика по пищевым цепям [2]. Анализ работ, касающихся поиска и исследования особенностей деструкторов, показал, что интерес к микроорганизмам-деструкторам 2,4,5-Т связан с возможностью использовать их на практике при создании биологических технологий очистки почвы от экологически опасных соединений.

Объектом исследований служил бактериальный штамм, выделенный из образца почвенных популяций микроорганизмов.

В эксперименте использовали минимальную солевую среду следующего состава в г/л: NH_4Cl — 1; K_2HPO_4 — 5; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,05; $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,005; $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ — 0,001; ZnSO_4 — 0,008; pH — 6,8–7,0. В качестве единственного источника углерода и энергии добавляли 2,4,5-Т до конечной концентрации 100 мг/л.

Определение количества 2,4,5-Т в культуральной жидкости проводили согласно методам определения микроколичеств 2,4,5-Т с небольшими модификациями [3].

Для идентификации продуктов катаболизма 2,4,5-Т метилированные экстракты метаболитов подвергали анализу на хроматомасс-спектрометрической системе хроматограф HP 5890 с масс-селективным детектором HP 5972A.

В опытах с почвой посевной материал культуры вносили из расчета 10^5 – 10^6 КОЕ на 1 г почвы, содержащей 2,4,5-Т в концентрации 100 мг/кг. Обработку проводили в течение 48 суток в лабораторных условиях при естественном суточном колебании температур летнего периода.

Исследуемый штамм был идентифицирован согласно культурально-морфологическим и физиолого-биохимическим признакам как *Gluconobacter oxydans* [4]. Клетки штамма представляют собой подвижные коккоба-

циллы, одиночные и двоянные, на МПА колонии беловатые, блестящие, непрозрачные. Окраска клеток по Граму отрицательная. Аэроб, оптимальный рост наблюдался в диапазоне температур от +22 °С до +41 °С и значениях рН, близких к нейтральным — 6,8–7,2. Депонирование штамма *G. oxydans* было произведено в ВКПМ под номером В-7170.

Исследование динамики роста штамма *G. oxydans* 2Т в условиях использования им 2,4,5-Т в качестве единственного источника углерода и энергии в периодической культуре показало, что существенное изменение значений оптической плотности (OD_{590}) клеточной суспензии *G. oxydans* 2Т наблюдалось уже в течение первых суток культивирования (рис. 1).

Далее значение OD_{590} продолжало возрастать и его снижение наблюдалось только после 5-х суток культивирования. Анализ динамики изменения концентрации 2,4,5-Т в культуральной жидкости штамма *G. oxydans* 2Т позволяет констатировать, что в течение 5 суток происходило заметное уменьшение концентрации 2,4,5-Т примерно до 58,25%. К седьмым суткам она снижалась до 19,04%.

С целью выявления этапов метаболизма 2,4,5-Т *G. oxydans* исследован характер промежуточных продуктов превращения ксенобиотика, обнаруживаемых в среде культивирования штамма в условиях периодической культуры. Среди метаболитов были выявлены продукты неполного дегалогенирования молекул 2,4,5-Т, в частности, 2,4-дихлорфеноксиуксусная и 4-хлорфеноксиуксусная кислоты.

Кроме этого, было отмечено присутствие феноксиуксусной и 3-метил-2,6-диоксо-4-гексеновой кислот. Анализ природы интермедиатов катаболизма 2,4,5-Т *G. oxydans* позволяет заключить, что штамм осуществляет

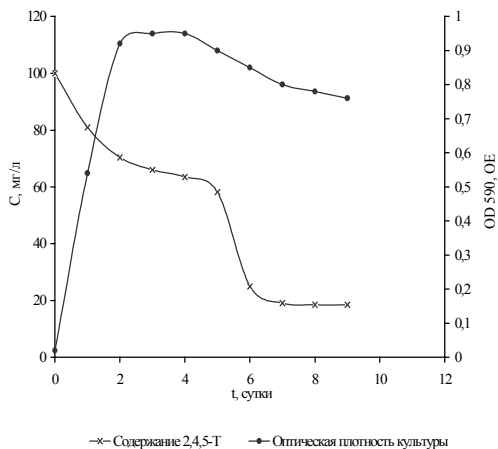


Рис. 1. Зависимость значений оптической плотности клеточной суспензии OD_{590} и концентрации 2,4,5-Т от времени инкубации штамма *Gluconobacter oxydans* IBRB-2Т в периодической культуре

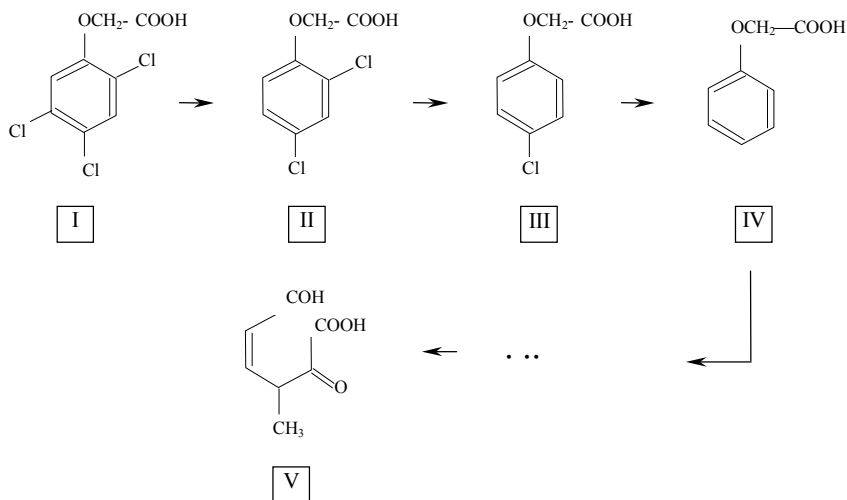


Схема 1. Метаболизма 2,4,5-Т штамма *Gluconobacter oxydans* 2Т. Условные обозначения: I — 2,4,5-Т; II — 2,4-Д; III — 4-хлорфеноксиуксусная кислота; IV — феноксиуксусная кислота; V — 3-метил-2,6-диоксо-4-гексеновая кислота

Таблица 1

Результаты анализа содержания 2,4,5-Т в почве

Характеристика почвы	Время обработки почвы, сут.						
	1	5	10	14	21	30	48
Содержание 2,4,5-Т в почве, мг/г	100	95,0	87,6	85,0	72,6	68,1	33,5
Степень очистки к контролю, %	0	5,0	12,4	15,0	27,4	31,9	66,5

реакции дехлорирования молекул 2,4,5-Т с последующим их расщеплением до 3-метил-2,6-диоксо-4-гексеновой кислоты (схема 1).

Исследована динамика изменения концентрации 2,4,5-Т от времени инкубации штамма *G. oxydans* 2Т в почве, содержащей 2,4,5-Т (табл. 1, рис. 2).

Степень очистки почвы, достигаемая при использовании штамма *G. oxydans* 2Т, составляла соответственно: 27,4% на 21-е сутки культивирования, 31,9% на 30-е сутки и около 66,5% к 48-м суткам. Существенное изменение содержания 2,4,5-Т наблюдалось после 10–14 дней обработки (рис. 2).

Ранее было отмечено, что представители рода *Gluconobacter* встречаются в садовой почве, на цветах, фруктах, медоносных пчелах, в сидре, вине, южноафриканском пиве банту, пальмовом соке. Обнаружено, что *G. oxydans* трансформирует микотоксин пагулин в менее токсичное соединение — аскладиол [5]. В то же время, конверсия производных аромати-

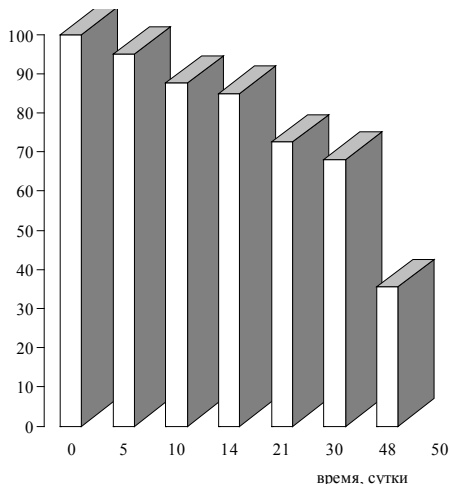


Рис. 2. Содержание 2,4,5-Т в почве в процессе очистки с использованием штамма *Gluconobacter oxydans* 2Т

ческого ряда, содержащих галогены, для представителей рода *Gluconobacter* ранее не была обнаружена.

Таким образом, можно сделать следующие выводы: культура *G. oxydans* способна использовать 2,4,5-Т в качестве единственного источника углерода и энергии, при этом она осуществляет совокупность процессов дегалогенирования молекул 2,4,5-Т с последующим образованием 3-метил-2,6-диоксо-4-гексеновой кислоты. Штамм *G. oxydans* 2Т осуществляет конверсию 2,4,5-Т в водной среде и почве. Приведенные данные показали, что применение штамма *G. oxydans* 2Т является перспективным для очистки почвы от 2,4,5-Т.

Литература

1. Grant W.F. The Genotoxic effects of 2,4,5-T Mutation Research, 1979. V.65. №2.— P. 83-119.
2. Маркушева Т.В., Журенко Е.Ю., Кусова И.В. Бактерии-деструкторы фенола и его хлорированных производных: поиск и применение.— Уфа: Гилем, 2002.— 108 с.
3. Методы определения микроколичеств пестицидов / Под ред. М.А. Клисенко.— М.: Медицина, 1984.— 256 с.
4. Определитель бактерий Берджи / Под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита и др. 9-е изд. В 2-х т.— М: Мир, 1997.— 799 с.
5. Ricelli A., Baruzzi F., Solfrizzo M., Morea M., Fanizzi F.P. Biotransformation of paltulin by *Gluconobacter oxydans* // Appl. Environ. Microbiol. 2007.— V.73.— P. 785–792.

Резюме

Штамм *Gluconobacter oxydans* 2Т был выделен из смешанных почвенных популяций бактерий. Культура способна утилизировать 2,4,5-Т как единственный источник углерода и энергии. В периодической культуре *G. oxydans* утилизировал

81% 2,4,5-Т за 9 дней. Среди метаболитов были выявлены 2,4-дихлорфеноксиуксусная, 4-хлорфеноксиуксусная и 3-метил-2,6-диоксо-4-гексеновые кислоты. Степень очистки почвы, достигаемая при использовании штамма *G. oxydans* 2Т, составила 66,5% к 48-м суткам.

The strain *Gluconobacter oxydans* 2Т has been isolated from a soil mixed bacterial populations. *G. oxydans* 2Т is capable of utilizing 2,4,5-Т as the sole source of carbon and energy. 2,4,5-Т quantity was reduced in a culture medium approximately on 81% by *G. oxydans* 2Т batch culture within 9 days. The strain produced processes of 2,4,5-Т dehalogenation to phenoxyactic acid, which then was transformed to 3-methyl-2,6-dioxo-4-hexenoic acid. The culture *G. oxydans* 2Т utilizes 2,4,5-Т in soil. The 2,4,5-Т concentration was reduced approximately on 67% within 48 day.

ИВАНОВА Н.Н., МИТРОФАНОВА И.В., МИТРОФАНОВА О.В.

Никитский ботанический сад - Национальный научный центр, Украина, 98648, АР Крым, г. Ялта, нгт. Никита, e-mail: in_vitro@ukr.net

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПРИЕМЫ КЛОНАЛЬНОГО МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ ПЕРСПЕКТИВНЫХ СОРТОВ *BEGONIA RIGER ELATIOR*

Род бегония (*Begonia* L.) относится к семейству бегониевых (*Begoniaceae* С.А. Agardh.) и насчитывает около 1000 видов и разновидностей. Растения бегонии обладают большим разнообразием форм окрасок листьев и цветков, а также обильным и продолжительным цветением. Основной способ вегетативного размножения — черенкование. Для этих целей используют побеги, листья и его фрагменты. В цветоводстве в настоящее время получили распространение около 130 видов и около 2000 гибридов [1]. Исходя из биологических особенностей и использования, формы и сорта бегонии делят на две группы: красивоцветущие и декоративно лиственные. Бегония элатиор (*Begonia x elatior*, *B. hiemalis*), относящаяся к красивоцветущим бегониям — гибридная форма, которая получена в результате скрещивания *B. tuberhybrida* и *B. socotrana*. В Германии были созданы крупноцветковые мелколистные сорта, получившие название раса элатиор-Ригера или *Begonia riger elatior*.

О возможности клонального микроразмножения *Begonia x elatior* с использованием различных эксплантов, таких как верхушки побегов, сегменты цветоножки, ткани цветоноса и цветков, сегменты чашелистиков, лепестков, черешков, стеблевых отрезков описано в ряде публикаций [2–7]. Однако отсутствие универсальной питательной среды, обеспечивающей регенерацию разных сортов, создает определенные трудности при разработке способов клонального микроразмножения данной культуры.

Целью настоящего исследования было изучение особенностей регенерации растений пяти сортов *B. riger elatior* в условиях *in vitro* для разработки

биотехнологических приемов клонального микроразмножения и последующего тиражирования и сохранения ценных генотипов.

Материалы и методы

В опытах использовали растения *B. riger elatior* сортов Krefeld, Schwabenland, Nixi red и Nixi rose, Lorrenie. В работе придерживались общепринятых методов культуры изолированных клеток, органов и тканей растений [8–10]. Для стерилизации растительных эксплантов применяли 70%-ный C_2H_5OH (1 мин) и 1%-ный раствор $NaClO$ (10 мин). Сегменты соцветий *B. riger elatior* культивировали на модифицированных питательных средах, содержащих макроэлементы по Кнопу [11], микроэлементы по Буржен-Ничу [12], дополненных 54,35 мкМ аденинсульфата, 3% сахарозы, 0,8% агара. В качестве регуляторов роста использовали ауксины: 0,54–2,69 мкМ НУК, 5,71–11,42 мкМ ИУК и цитокинин БАП в концентрации 4,40–13,30 мкМ. Колбы и пробирки с эксплантами помещали в климатическую камеру с температурой 21–29 °С, 12–20-часовым фотопериодом, интенсивностью освещения 2–3 клк, относительной влажностью воздуха 70%. Индукцию ризогенеза у микророзеток *B. riger elatior* в культуре *in vitro* осуществляли на агаризованной питательной среде МС [13], содержащей 2,95–7,36 мкМ ИМК. Полученные регенеранты адаптировали на СУВРе, а затем переносили в теплицу.

Результаты и обсуждение

Изучение особенностей морфогенеза *in vitro* является необходимым условием успешного микроразмножения растений *B. riger elatior*. Морфогенез растений находится под действием ряда факторов [8, 9]. Формирование адвентивных микропобегов может происходить непосредственно из клеток экспланта или из образующегося в результате дедифференциации первичного каллуса.

В процессе исследований стерильные экспланты — сегменты соцветий исследуемых сортов длиной 12 мм помещали на агаризованную питательную среду, в состав которой были включены макроэлементы по прописи Кнопа, микроэлементы по Буржен-Ничу и дополненную регуляторами роста, сахарозой, аденин сульфатом. Через 4–5 недель культивирования на эксплантах активно формировался морфогенный каллус. Следует отметить, что активную индукцию каллусообразования наблюдали в пазухах прицветников и на базальных частях цветоножки, особенно у молодых соцветий. В процессе исследований установлено влияние регуляторов роста на индукцию каллусогенеза *B. riger elatior* исследуемых сортов. Так, каллус образовывался из сегментов соцветий во всех вариантах опытов. Максимальная частота каллусообразования была отмечена на агаризованной питательной среде, дополненной 2,69 мкМ НУК и 13,30 мкМ БАП. Наличие в питательной среде цитокинина в отсутствии ауксинов вызывало снижение частоты индукции образования каллуса в 2–3 раза. При этом увеличение концентрации НУК приводило к замедлению образования адвентивных почек и микророзеток в культуре сегментов соцветий *B. riger elatior*. В результате проведения экспериментов

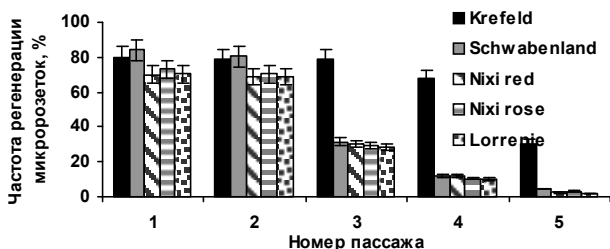


Рис. Влияние количества пассажей на частоту регенерации микророзеток в культуре каллуса *B. riger elatior*

с различными концентрациями БАП на фоне постоянных концентраций НУК (2,69 мкМ) и ИУК (1,14 мкМ) было выявлено, что применение БАП в концентрации 2,20–4,40 мкМ в среде активно индуцировало развитие адвентивных почек и микророзеток в каллусной культуре *B. riger elatior*.

Известно, что каллусные клетки можно длительное время культивировать в условиях *in vitro*, но при этом в них обычно возникают цитогенетические изменения [14]. В наших экспериментах для снижения уровня соматической изменчивости период роста каллуса ограничивали 3–4 пассажами. Так, средняя частота регенерации микророзеток из каллуса 1-го пассажа сортов Krefeld и Schwabenland составляла 80–84%, а у сортов Nixi red, Nixi rose и Lorrenie — 70–73%. У большинства исследуемых сортов *B. riger elatior* индукция регенерации микророзеток ограничивалась 1–2 пассажами (рис.).

У сорта Krefeld формирование адвентивных почек и микропобегов наблюдали до 3–4 пассажа. При более длительном культивировании после 5–7 пассажей отмечали образование аномальных нежизнеспособных микророзеток и снижение частоты регенерации. Спустя 2–3 недели культивирования каллуса формировались микророзетки с 2–4 листочками. Наличие в питательной среде наряду с БАП, НУК и ИУК 61,96 мкМ сульфата цинка и 2,89 мкМ ГК способствовало вытягиванию и росту микророзеток, а также их лучшему разделению для укоренения.

Наряду с трофическими и гормональными факторами на регенерацию растений *B. riger elatior* значительное влияние оказывали физические: интенсивность освещения, фотопериод и температура. Наиболее активно процессы морфогенеза в культуре изолированных сегментов соцветия происходили на свету. В отсутствии или при слабом освещении (в пределах от 1 клк и ниже) отмечали замедление формирования морфогенного каллуса. В этом случае частота каллусогенеза в среднем составляла 35%. При интенсивности освещения от 2 до 3 клк в 88–96% исходных эксплантов изучаемых сортов формировали морфогенный каллус. При 4–5 клк наблюдали резкое снижение частоты каллусообразования. Изучение влияния температуры и продолжительности освещения на регенерационные процессы в каллусе показало, что непрямой органогенез в культуре сегментов соцветий *B. riger elatior*

**Влияние физических факторов культивирования на регенерационный потенциал
эксплантов *B. riger elatior***

Температура, °С	Среднее количество эксплантов, образовавших микророзетки, %	Фотопериод, ч	Среднее количество эксплантов, образовавших микророзетки, %
21	49,8 ± 2,5	12	56,4 ± 2,8
23	83,4 ± 3,7	14	72,4 ± 4,6
25	96,2 ± 4,9	16	96,2 ± 4,7
27	66,3 ± 4,5	18	67,3 ± 4,6
29	40,4 ± 3,6	20	52,4 ± 2,7

всех исследуемых сортов активно происходил при 23–25 °С и 16-часовом фотопериоде (табл.). Уменьшение или увеличение фотопериода и температуры культивирования вызывало уменьшение количество эксплантов, образовавших микророзетки.

Проведенные эксперименты показали, что коэффициент размножения зависел не только от состава питательной среды и освещенности, но и от сортовых особенностей культуры. При соблюдении равных условий культивирования *in vitro* активно развивались сорта Krefeld и Schwabenland (красные, не махровые). Активность регенерации микророзеток была ниже у сортов Nixi red и Nixi rose (с махровыми цветами); среднее количество микророзеток на эксплант составляло 30,2±5,2 шт. у сорта Krefeld, 31,3±1,7 шт. у сорта Schwabenland, 27,9±1,2 шт. у сорта Nixi red, 26,6±1,2 шт. у сорта Nixi rose и 21,3±2,7 шт. у сорта Lorrenie.

Для индукции ризогенеза использовали вещества ауксинового типа действия (ИМК, НУК и ИУК) в различных концентрациях. Микророзетки *B. riger elatior* переносили на среду МС. 100%-ное укоренение микророзеток наблюдали в присутствии 2,95–7,36 мкМ ИМК. Через 14 суток среднее количество корней достигало 4,15 ± 1,2 шт. на эксплант, а их средняя длина — 2,51±1,2 см.

На этапе адаптации *in vivo* полученные миниатюрные растения высаживали в вазоны, наполненные смесью торфа и перлита в соотношении 2:1. Использование стерильных субстратов позволило увеличить частоту приживаемости растений в условиях *in vivo* до 95%. В первые сутки адаптации растения выдерживали в условиях повышенной влажности (80–90%), а через 2 недели при относительной влажности 70%. Длительность периода адаптации составила 2 месяца.

Выводы

Разработаны биотехнологические приемы клонального микроразмножения пяти сортов *B. riger elatior* через непрямо́й органогенез. Полученные результаты могут быть использованы в практической селекции с целью размножения ценных генотипов, тиражирования изученных сортов *B. riger elatior* и их сохранения в условиях *in vitro*.

Литература

1. Шахова Г.И. Бегониевые.— М.: Планета, 1987.— Сер. Комнатные растения, Вып.3.— 60 с.
2. Bigot C. Multiplication vegetative *in vitro* de *Begonia hiemalis* (Rieger et Schwabenland): I. Methodologie // Agronomie.— 1981a.— V.1.— P. 433–440.
3. Jain S.M., Brar D.S., Ahloowalia B.S. Somaclonal variation and induced mutations in crop improvement // Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Acad. Publ., 1998.— P. 603.
4. Mikkelsen E.P., Sink K.C. *In vitro* propagation of rieger Elatior Begonias // Hort Science.— 1978.— V.13.— P. 242–244.
5. Reuter G., Bhandari N.N. Organogenesis and histogenesis of adventitious organs induced on leaf blade segments of *Begonia elatior* hybrids (*Begonia hiemalis*) in tissue culture // Gartenbauwissenschaft.— 1981.— B.46.— S. 241–249.
6. Welander T. *In vitro* organogenesis in explants from different cultivars of *Begonia hiemalis* // Physiol Plant.— 1977.— V.41.— P. 142–145.
7. Митрофанова О.В., Иванова Н.Н. Микроразмножение бегонии Элатиор // Цветоводство.— 1986.— №6.— С. 12–13.
8. Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений.— М.: Наука, 1964.— 272 с.
9. Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений.— К.: Наукова думка, 1980.— 488 с.
10. Митрофанова О.В., Митрофанова И.В., Смыков А.В., Лесникова Н.П. Методы биотехнологии в селекции и размножении субтропических и косточковых плодовых культур // Интенсификация селекции плодовых культур: Сб. науч.тр. ГНБС.— 1999.— Т.118.— С. 189–200.
11. Knop W. Quantitative Untersuchungen uber di Ernahrungsprozess der Pflanzen // Land.Vers. Sta.— 1865.— V.7.— P. 93.
12. Bourgin J.P., Nitsch J.P. Obtention de *Nicotiana* haploides apartir detamines cultivees *in vitro* // Ann. Physiol. Veg.— 1967.— V.9, N4.— P. 377–382.
13. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays tobacco tissue culture // Physiol. Plant.—1962.— 15, №3.— P. 473–497.
14. Фролова Л.В. Особенности популяции культивируемых клеток // Культура клеток растений.— М.: Наука, 1981.— С. 5–16.

Резюме

На основі даних досліджень показано можливість одержання регенерантів п'яти сортів *B. riger elatior*. Визначені оптимальні концентрації регуляторів росту в поживному середовищі, фізичні фактори культивування, що впливають на процеси регенерації рослин. Вивчені умови утворення коренів у мікророзеток *in vitro* і адаптації рослин *in vivo*.

На основе данных исследований показана возможность получения регенерантов пяти сортов *B. riger elatior*. Определены оптимальные концентрации регуляторов роста в питательной среде, физические условия культивирования, влияющие на процессы регенерации растений. Изучены условия укоренения микророзеток *in vitro* и адаптации растений *in vivo*.

The possibility of regenerants obtaining from 5 cultivars of *B. riger elatior* has been shown on the base of researches' data. The optimal concentrations of growth regulators in culture medium, physical factors of cultivations, influenced on the process of plants regeneration have been determined. The conditions of microrosettes rooting *in vitro* and plants adaptation *in vivo* have been studied.

ИННЮТКИНА А. Г., ЕГОРОВА Н. А.

*Институт эфиромасличных и лекарственных растений УААН,
АР Крым, 95493, Симферополь, ул. Киевская, 150, e-mail: artemisiadr@gmail.com*

ИНДУКЦИЯ КАЛЛУСО- И МОРФОГЕНЕЗА В КУЛЬТУРЕ ИЗОЛИРОВАННЫХ ОРГАНОВ ПОЛЫНИ ЭСТРАГОН

В настоящее время в селекции большинства эфиромасличных и лекарственных растений используются в основном традиционные методы гибридизации и отбора. Повысить эффективность селекционного процесса возможно за счет применения биотехнологических подходов, и в частности, таких клеточных технологий как получение соматональных вариантов, клеточная селекция, мутагенез *in vitro*. Использование этих методов позволяет расширить уровень генетической гетерогенности исходного селекционного материала и получить ценные генотипы. Одним из сложных этапов многих клеточных технологий является индукция морфогенеза в культуре каллусных тканей. Вторичная дифференциация, которая ведет к регенерации растений путем соматического эмбриогенеза или органогенеза, зависит от многих факторов. Среди них наиболее важными являются генотип исходного растения, состав питательных сред и условия культивирования *in vitro* [2]. Высокий уровень генетической детерминированности процессов морфогенеза обуславливает необходимость эмпирическим путем для каждого вида или даже сорта оптимизировать условия культивирования каллусных тканей и регенерации из них растений.

На территории Крымского полуострова произрастает 14 видов полыни, из них 6 отнесены к перспективным для селекционной работы, к их числу относится и полынь эстрагон (*Artemisia dracunculus* L.) [4]. Эстрагон широко применяется в пищевой промышленности при приготовлении маринадов и солений, а также в медицине для повышения аппетита, лечения нарушений обмена веществ, заболеваний почек, цинги и других заболеваний.

В литературе имеются сведения об изучении каллусогенеза и морфогенеза у отдельных представителей рода *Artemisia* L. [3, 5, 6]. Данных об исследовании этих процессов у полыни эстрагон в доступной нам литературе не найдено. Поэтому для разработки клеточных технологий, способствующих повышению эффективности селекции этого ценного растения, актуальным является изучение влияния состава питательной среды, генотипа и типа экспланта на индукцию образования каллуса и регенерацию из него растений, что и явилось целью нашей работы.

Материал и методы

Объектом исследований служили селекционные образцы полыни эстрагон (*Artemisia dracunculus* L.) из коллекции Института эфиромасличных и лекарственных растений УААН — №5р.24, №бр.17, и №7р.1, различающиеся по морфологии и составу эфирного масла. Первичный каллус получали, используя в качестве эксплантов фрагменты стебля, высечки листа и меристемы. Стерилизацию эксплантов проводили с использованием 70%

этанол и 50% раствора препарата “Брадофен”. Асептические экспланты помещали на модифицированную питательную среду Мурасиге и Скуга (МС), дополненную фитогормонами (БАП, кинетин, 2,4-Д, НУК) в различных комбинациях и концентрациях. При введении в культуру, приготовлении питательных сред использовали традиционные для работ по культуре тканей методики [1].

Условия культивирования — температура +26 °С, относительная влажность воздуха 70%, освещенность 2–3 тыс. лк, 16-ти часовой фотопериод.

В конце цикла выращивания определяли частоту каллусогенеза (как отношение числа эксплантов с каллусом к общему числу эксплантов), частоту морфогенеза (как отношение числа эксплантов с морфогенным каллусом к общему числу эксплантов), проводили подсчет количества почек (в расчете на одну пробирку с морфогенным каллусом), а также оценивали интенсивность образования каллуса (визуально по 3-х балльной системе).

Полученные данные обработаны статистически с использованием стандартного приложения пакета статистики в Microsoft Excel. На рисунках представлены средние арифметические и доверительные интервалы при уровне значимости 0,05.

Результаты и обсуждение

На начальном этапе введения в культуру *in vitro* изолированных органов полыни эстрагон была проведена оптимизация режимов стерилизации. Установлено, что для получения 92,5–93,3% асептических эксплантов высечек листа и сегментов стебля стерилизацию следует проводить последовательно 70% этанолом (30 секунд), а затем 50% раствором препарата “Брадофен” (12 минут), а изолированных меристем — раствором препарата “Брадофен” в течение 6 минут.

Через 2 недели культивирования на месте среза, а иногда по всей поверхности экспланта, наблюдали образование светло-бежевого с зелеными участками рыхлого каллуса. Частота каллусогенеза на большинстве испытанных питательных сред у образца №5р.24 была на высоком уровне (95–100%). Исключение составили среды, содержащие кинетин или БАП, на которых не наблюдали образования каллуса из листа и стебля. Частота каллусогенеза из меристемных эксплантов на этих средах составила 20% (МС 21) и 95% (МС 24) с интенсивностью прироста каллуса 1,0–1,1 балла (табл.).

Использование в составе питательных сред регуляторов роста цитокининового и ауксинового типа действия позволило повысить интенсивность образования каллуса. Так, на среде с добавлением 0,5 мг/л БАП и 1,0 мг/л НУК она составила 1,3–2,1 балла. Обратное соотношение концентраций этих двух регуляторов роста (МС 58) снизило значения изучаемых показателей. При добавлении к БАП 1,0 мг/л 2,4-Д интенсивность образования каллуса из меристем составила 2,4 балла, а из листа и стебля — 1,2 балла. Совместное введение кинетина и НУК (МС 72) также увеличило показатели, однако интенсивность каллусообразования была ниже, чем на среде МС 160.

Таблица

Влияние гормонального состава питательной среды и типа экспланта на индукцию морфогенеза в первичном каллусе полыни эстрагон (образец №5р.24)

№ питательной среды	Гормональные добавки в питательной среде (мг/л)	Тип экспланта	Частота каллусогенеза, %	Интенсивность образования каллуса, балл	Частота морфогенеза, %	Количество почек, шт./пробирку
МС 24	БАП 1,0	лист	0	-	-	-
		стебель	0	-	-	-
		меристема	95,0±5,0	1,1±0,1	-	-
МС 21	Кинетин 1,0	лист	0	-	-	-
		стебель	0	-	-	-
		меристема	20,0±3,3	1,0±0,0	единичн.	единичн.
МС 72	К 0,5+ НУК 1,0	лист	100,0±0,0	1,2±0,1	-	-
		стебель	100,0±0,0	1,3±0,1	-	-
		меристема	100,0±0,0	1,5±0,1	-	-
МС 160	БАП 0,5+НУК 1,0	лист	100,0±0,0	1,3±0,1	-	-
		стебель	100,0±0,0	2,1±0,1	-	-
		меристема	100,0±0,0	1,8±0,2	20,5±6,2	4,0±0,8
МС 50	БАП 0,5+ 2,4-Д 1,0	лист	100,0±0,0	1,2±0,1	-	-
		стебель	100,0±0,0	1,2±0,4	-	-
		меристема	100,0±0,0	2,4±0,1	9,8±4,7	1,5±0,5
МС 58	БАП 1,0+ НУК 0,5	лист	100,0±0,0	1,0±0,0	-	-
		стебель	95,0±5,0	1,0±0,0	-	-
		меристема	95,0±5,0	1,6±0,1	15,0±5,0	5,2±0,2

Пассирование в течение шести пассажей каллусных тканей листового и стеблевого происхождения на среде МС 160 обеспечивало интенсивный прирост массы каллуса, ростовой индекс в отдельных вариантах опыта достигал 15–20.

В первичном каллусе стеблевого и листового происхождения в данном эксперименте не наблюдали индукции морфогенеза. Морфогенные очаги были выявлены только в каллусной ткани меристемного происхождения. Морфогенный каллус был зернистым, рыхлым и имел зеленую окраску. В морфогенных зонах наблюдали образование темных зеленых точек, из которых развивались почки, а затем формировались небольшие побеги (2–7 мм).

В первичном каллусе индукция морфогенеза с частотой 9,8–20,5% наблюдалась на средах различного фитогормонального состава. На питательной среде, содержащей 1,0 мг/л кинетина (МС 21), индукция морфогенеза

отмечалась в единичных случаях. При совместном использовании БАП и 2,4-Д частота морфогенеза составила 9,8%, а количество развивающихся почек 1,5 шт./пробирку. Добавление к БАП 0,5 мг/л НУК (МС 58) увеличило частоту морфогенеза до 15%, а количество формирующихся почек до 5,2 шт./пробирку. Изменение соотношения концентраций регуляторов роста — БАП и НУК (МС 160) — способствовало повышению частоты морфогенеза до 20,5%, причем количество почек составило 4,0 шт./на пробирку.

Дальнейшее культивирование морфогенного каллуса на средах различного состава показало, что морфогенный потенциал каллусных тканей полыни эстрагон сохраняется до пятого пассажа.

Введение на среду МС 160 различных типов эксплантов других селекционных образцов (№бр.17, №7р.1) также способствовало индукции каллусо- и морфогенеза. Частота каллусогенеза колебалась от 71% до 100%, в зависимости от генотипа и типа экспланта. Интенсивность каллусообразования у этих образцов была приблизительно одинаковой: из листа и стебля она составила 1,0–1,1 балла, а из меристем — 2,0 балла. При изучении морфогенетической способности первичной каллусной ткани было установлено, что у №бр.17 и №7р.1, также как и у №5р.24, индукция морфогенеза наблюдается при использовании каллусной ткани меристемного происхождения.

Частота индукции морфогенеза была максимальной у образца №7р.1 и составила 73,3%, у образцов №5р.24 и №бр.17 этот показатель ниже (16,7%) (рис.). Количество почек в каллусе, полученном из меристем образцов №5р.24 и №бр.17, также было меньше и не превышало 3,3 шт./пробирку, а у №7р.1 — 4,9 шт./пробирку.

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что индукция каллусо- и морфогенеза у полыни эстрагон зависела от генотипа и типа экспланта. Частота образования каллуса в зависимости от генотипа, экспланта и питательной среды варьировала от 0% до 100%, при этом интенсивность его прироста составила 1,0–2,4 баллов. Показано, что в первичной каллусной ткани наблюдалась индукция морфогенеза с частотой

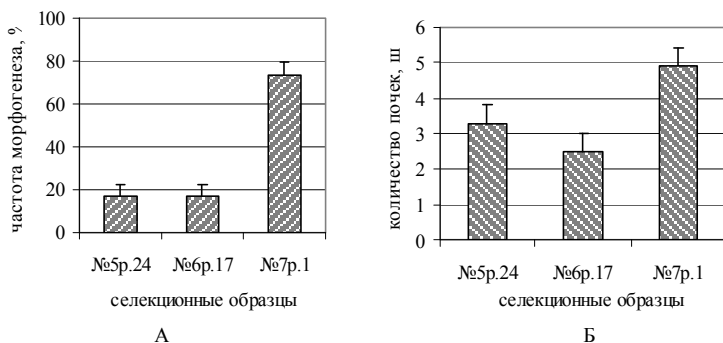


Рис. Влияние генотипа на частоту индукции морфогенеза (А) и количество почек (Б) в каллусе меристемного происхождения полыни эстрагон

от 9,8% до 73,3%. Максимальная частота морфогенеза отмечалась у селекционного образца №7р.1. Из 3-х изученных типов эксплантов (лист, стебель, меристема) морфогенетическими способностями на испытанных питательных средах обладали только каллусные ткани полученные из меристем.

Литература

1. Калинин Ф. Л. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений / Ф.Л. Калинин, В.В. Сарнацкая, В.Е. Полищук. — К.: Наук. Думка. — 1980. — 488 с.
2. Мельничук М. Д. Биотехнологія рослин. Підручник. / М.Д. Мельничук, Т.В. Новак, В.А. Кунах. — К.: Поліграф Консалтинг, 2003. — 520 с.
3. Спринчану Е. К. Размножение в культуре *in vitro* полыни лимонной путем индукции образования почек тканями первичного экспланта и каллуса / Е. К.Спринчану, Р.Г. Бутенко // Физиология и биохимия культурных растений. — 1991. — Т.23, №3. — С. 295–301.
4. Хорт Т. П. Дикорастущие полыни Крыма в природе и культуре / Т.П. Хорт, И.Е. Логвиненко // Бюллетень Никитского ботанического сада. — 1987. — Вып.62. — С. 68–73.
5. Kumar Pradeep S. Effect of amino acid and growth regulators on indirect organogenesis in *Artemisia vulgaris* L. / S. Pradeep Kumar, B.D. Ranjitha Kumari // Asian Journal of Biotechnology. — 2010. — V.2, N1. — P. 37–45.
6. Zia M. Hormonal regulation for callogenesis and organogenesis of *Artemisia absintium* L. / M. Zia, Riaz-ur-Rehman, M. F. Chaudhary // African Journal of Biotechnology. — 2007. — Vol.6 (16). — P. 1874–1878.

Резюме

Исследована индукция каллусогенеза и морфогенеза в культуре *in vitro* полыни эстрагон (*Artemisia dracunculus* L.). Показана зависимость этих процессов от генотипа, состава питательной среды и типа экспланта.

Досліджено індукцію калусогенезу та морфогенезу в культурі *in vitro* полину естрагон (*Artemisia dracunculus* L.). Показано залежність цих процесів від генотипу, складу живильного середовища та типу експланта.

Callusogenesis and morphogenesis induction of *Artemisia dracunculus* L. *in vitro* were researched. It was showed dependence of these processes from genotype, medium composition and explant type.

КИЩЕНКО Е.М.

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

ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ РЕПОРТЕРНОГО ГЕНА β -ГЛЮКУРОНИДАЗЫ ПОД КОНТРОЛЕМ 35S И MII ПРОМОТОРОВ В ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЯХ

В генноинженерной биотехнологии растений актуальной остается проблема обеспечения высокоэффективной экспрессии рекомбинантных генов. В некоторых случаях, конститутивная сверхэкспрессия нежелательна,

т.к. может привести к сайленсингу трансгена либо повлиять на процессы жизнедеятельности, используют тканеспецифические или индуцируемые промоторы. В последнее время множество таких высокоспецифичных промоторов было клонировано и охарактеризовано, среди них корнеспецифический промотор *Mll* [1]. Использование корнеспецифической экспрессии трансгенов представляет интерес для решения различных задач, среди них создание а) растений-биоремедиаторов, б) растений, накапливающих рекомбинантные белки в корнеплодах, в) растений, устойчивых к засухе, засолению, нематодам и насекомым, повреждающим корни.

Целью исследовательской работы было клонировать корнеспецифический промотор *Mll* из сахарной свеклы, получить трансгенные растения табака и моркови, содержащие ген β -глюкуронидазы под контролем *35S* и *Mll* промоторов и проанализировать экспрессию введенного репортерного гена.

Материалы и методы

В качестве источника промотора *Mll* была использована суммарная ДНК растения сахарной свеклы линии Ритма 6/36 (Институт сахарной свеклы УААН, г. Киев, Украина), выделенная СТАВ-методом [2]. Последовательность промотора *Mll* была амплифицирована с помощью ПЦР с использованием пары праймеров 5' gcagaattcGTTTGTAACTGAACTGAACTGTTA ATT 3' и 5' gcatccatggCTTTTGAAAA TTTTGAAACGCTCAC 3'. Последовательности сайтов узнавания рестриктазами *EcoRI* и *NcoI* подчеркнуты. Для ПЦР использовали программу: денатурация 94 °C/3 мин; 34 цикла (денатурация 94 °C/30 с, отжиг 60 °C/40 с, синтез 72 °C/2 мин); заключительный синтез 72 °C/10 мин. Продукты амплификации фракционировали с помощью электрофореза в 0,7% агарозном геле в трис-ацетатном буфере. Амплифицированный фрагмент ДНК (около 1750 п.н.) был очищен с помощью Silica Bead DNA Gel Extraction Kit ("Fermentas", Литва), а затем клонирован в pGEM®-T Easy Vector (Promega). Для клонирования полученного промежуточного вектора использовали *Escherichia coli* штамм XL-Blue. Все стандартные процедуры молекулярного клонирования выполняли согласно [3]. Клонированная последовательность *Mll* была секвенирована с использованием праймеров, гомологичных последовательности вектора pGEM®-T Easy (праймеры к промоторам SP6 и T7), и праймера Mllfwd2 5' CCTTCCACCA ATCTCAACAAA 3', специфического к последовательности внутренней части промотора *Mll*.

При конструировании вектора для трансформации растений за основу был взят бинарный вектор pICBV16 (Icon Genetics GmbH, г. Халле, ФРГ), содержащий репортерный ген β -глюкуронидазы *gusA* под контролем промотора *35S* вируса мозаики цветной капусты и селективный ген неомицинофотрансферазы II *nptII*. Фрагмент *EcoRI-NcoI* бинарного вектора pICBV16, содержащий промотор *35S*, был замещен последовательностью промотора *Mll*, вырезанного теми же рестриктазами из промежуточного вектора. Результирующий вектор был обозначен как pCB129. Плазмидная ДНК бинарных векторов pICBV16 и pCB129 была перенесена в нопалиновый

штамм *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 и агропиновый штамм *A. rhizogenes* A4.

Для генетической трансформации моркови (*Daucus carota* L. subsp. *sativa*) использовали асептические проростки. Для этого семена моркови сортов Красный Великан и Перфекция поверхностно стерилизовали и проращивали на агаризованной среде MS [4], содержащей 2 мг/л дикамба, при +24 °С в темноте. Ночную агробактериальную культуру осаждали, ресуспендировали питательной средой MS с 0,2 мМ ацетосерингона и инкубировали 2 часа на шейкере (200 об/мин), далее проводили вакуум-инфильтрацию асептических проростков, как описано в [5]. После инфильтрации проростки оставляли на фильтровальной бумаге на 2 суток при рассеянном свете, а затем переносили на питательную среду MS, содержащую 2 мг/л дикамба, 500 мг/л цефотаксима (Сх) и 100 мг/л канамицинсульфата (Км). Первичный каллус, сформировавшийся при +24°С в темноте, переносили на безгормональную среду MS, содержащую 300 мг/л Сх и 100 мг/л Км, и культивировали для дальнейшей регенерации при +24 °С и 16-часовом световом периоде.

В качестве исходного материала для генетической трансформации *Nicotiana tabacum* использовали листовые диски асептических растений сорта Wisconsin, выращиваемых при +24 °С и 16-часовом световом периоде. *A. tumefaciens*-опосредованную трансформацию табака проводили согласно общепринятой методике [6], а трансформированные побеги отбирали на селективной среде MS, содержащей 1 мг/л ВАР, 0,1 мг/л NAA, 500 мг/л Сх и 100 мг/л Км. После трансформации табака с помощью *A. rhizogenes* листовые экспланты переносили на безгормональную среду MS, содержащую 300 мг/л Сх и 100 мг/л Км. Образовавшиеся корни и побеги отсекали и переносили на питательную среду того же состава. Трансгенные растения табака T₀ высаживали в почву в условиях теплицы и получали семена при самоопылении.

ДНК из растительных тканей выделяли СТАВ-методом [2]. Реакцию амплификации ДНК проводили в термоциклере Mastercycler® personal (Eppendorf) с использованием праймеров 1) 5' CCTGAATGAACTCCAGGACGAGGCA 3' и 5' GCTCTAGATCCAGAGTCCCCGCTCAGAAG3', амплифицирующих фрагмент гена *nptII* длиной 649 п.н., 2) 5' TGGGTGGACGATACACCGTGGTGA 3' и 5' GGCCCAATCCAGTCC ATTAATGCG 3', амплифицирующих 423 п.н. гена *gusA*, 3) 5' ATGGATCCCAAATTGСТАТТССТТССАСГА 3' и 5' TTAGGСТТСТТСТТCAGGTTТАСТGСА GC 3', специфических к гену *rolB* (продукт амплификации — 780 п.н.).

Гистохимический анализ экспрессии β-глюкуронидазы проводили согласно [7] с наименьшими модификациями. GUS-анализ полученных корней и побегов проводили в 100 мМ фосфатном буфере pH 7,0, содержащем 1 мг/мл X-Gluc, 10 мМ ЭДТА, 0,1% Triton X-100, 50 мкМ K₃[Fe(CN)₆], 50 мкМ K₃[Fe(CN)₆], 2 мМ дитиотрейтол и 20% метанол, при 37 °С в течение ночи.

Результаты и обсуждение

Последовательность промотора *Mll* была амплифицирована с помощью ПЦР, матрицей для которой служила суммарная ДНК, выделенная из сахарной свеклы линии Ритма 6/36. Для определения первичной последовательности клонированной ДНК было проведено ее секвенирование. Анализ обнаружил характерные для промоторов ТАТА- и СААТ-мотивы и показал 99% гомологию с участком в 1742 п.н. заявленного тканеспецифического промотора (WO0240687). Используя базы данных PlantCARE и PLACE, в клонированной последовательности *Mll* были выявлены сайты связывания с MYB, АТВР-1, E2F-DP, GT-1 и Dof-протеинами, цис-регуляторные элементы, индуцируемые низкой температурой, повреждением, дегидратацией, анаэробными условиями, ауксинами и цитокининами, а также регуляторная последовательность, вовлеченная в циркадный контроль. Среди обнаруженных регуляторных элементов следует отметить ряд последовательностей, контролирующих экспрессию в корнях и корнеплодах (SPBF ТАСТАТТ-, АТАТТ-, АААГ- и СТСТТ-мотивы) и которые были ранее описаны для промоторов *rolD*, домена А35S вируса мозаики цветной капусты, *Mec1* маниока, *gSPO-A1*, *gSPO-B1*, β -*Amy* батата, *PHev2.1* гевети, *VfLb29* бобов, *TobRB7* табака и др. [8–13].

Для оценки специфичности и функциональности клонированного промотора *Mll* был сконструирован бинарный вектор рСВ129, содержащий репортерный ген *gusA* под контролем промотора *Mll* и селективный ген *nptII*. Соответствие полученной конструкции подтверждено методом рестриктоного анализа. Бинарные вектора рICBV16 и рСВ129 были перенесены в агробактериальные штаммы, которые в дальнейшем использовали для генетической трансформации.

В результате трансформации табака с помощью *A. tumefaciens*, содержащей бинарный вектор рICBV16 или рСВ129, были получены растения-регенеранты, способные укореняться на селективной среде с 100 мг/л Km. Присутствие генов *gusA* и *nptII* у отобранных растений табака было показано с помощью ПЦР. При гистохимическом окрашивании растения, трансформированные рICBV16, демонстрировали ожидаемую конститутивную экспрессию репортерного гена. Гистохимический анализ растений, трансформированных рСВ129, выявил экспрессию гена *gusA* в корнях, базальной части стебля и первых листьях, сформированных регенерирующими побегами. У зрелых листьев не было соответствующей окрашенности, что указывает на тканеспецифичность промотора *Mll*, контролирующего экспрессию гена *gusA*. У части трансформантов T₁, содержащих *Mll::gusA*, наблюдали конститутивную экспрессию репортерного гена.

Генетическую трансформацию моркови сортов Красный Великан и Перфекция проводили с помощью штамма *A. tumefaciens* GV3101, содержащего бинарный вектор рICBV16 или рСВ129. В результате экспериментов были отобраны растения моркови, устойчивые к 100 мг/л Km и проанализированы на наличие перенесенных генов *gusA* и *nptII* с помощью ПЦР. При гистохими-

мическом анализе трансгенные растения, содержащие *Mll::gusA*, целиком и интенсивно окрашивались, т.е. промотор *Mll* проявлял себя как сильный конститутивный промотор.

Поскольку “hairy roots”, широко использующиеся для синтеза вторичных метаболитов, могут также служить системами продукции рекомбинантных белков [14], мы решили изучить возможность экспрессии репортерного гена под контролем промотора *Mll* в трансгенных корнях. При генетической трансформации табака с помощью *A. rhizogenes*, содержащей бинарный вектор pICBV16 или pCB129, были получены культуры “бородатых корней”, активно растущие на селективной среде с 100 мг/л Km. Для дальнейшего анализа было отобрано по 8 клонов, трансформированных каждым из векторов. Наличие генов *rolB*, *gusA* и *nptII* в препаратах ДНК, выделенных из корневых культур, было подтверждено с помощью ПЦР-анализа. Клоны, трансформированные pCB129, характеризовались спонтанной регенерацией побегов, большая часть которых имела измененный фенотип: морщинистые листья, укороченные междоузлия и т.д. Гистохимический анализ выявил экспрессию гена *gusA* у 6 из 8 линий, трансформированных pICBV16, и у 7 из 8, трансформированных pCB129. Кроме того, листья растений, регенерировавших из 2 наиболее интенсивно окрашивающихся корневых линий, также демонстрировали активность β-глюкуронидазы.

Oltmanns et al. (2006), клонировавшие и исследовавшие промотор *Mll*, сообщают о его активности у трансгенных растений свеклы в корнях, гипокотылях и корнеплодах, а у табака — в корнях, гипокотылях и проводящих пучках листьев [1]. Результаты данной работы в целом согласуются с [1], хотя у моркови и некоторых растений табака активность промотора *Mll* в зеленых тканях не была фоновой, а имела скорее конститутивный характер. Возможным объяснением этого результата может быть то, что последовательность данного промотора *Mll* отличается от использованного в [1], или то, что у гетерологичных видов отсутствуют некие эндогенные факторы, что снижает специфичность активности промотора *Mll*.

Выводы

Был успешно клонирован промотор *Mll* из сахарной свеклы. В проведенных исследованиях промотор *Mll* функционировал как корнеспецифический, хотя в некоторых случаях его активность не ограничивалась только корнями и носила скорее конститутивный характер. Промотор *Mll* может быть использован в метаболической инженерии и для экспрессии генов, участвующих в синтезе и накоплении фармакологически ценных белков в корнях и корнеплодах.

Литература

1. Oltmanns H., Kloos D.U., Briess W. et al. Taproot promoters cause tissue specific gene expression within the storage root of sugar beet // Planta.— 2006.— Vol.224.— P. 485–495.
2. Генная инженерия растений. Лабораторное руководство: Пер. с англ. / Под ред. Дж. Дрейпера, Р. Скотта, Ф. Армидджа, Р. Уолдена.— М.: Мир, 1991.— 408 с.

3. Sambrook J. Molecular Cloning: A Laboratory Manual / Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T.— Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed., 1989.— 1500 p.
4. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant.*— 1962.— Vol.15.— P. 473–497.
5. 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.
6. Horsch R.B., Fraley R.T., et al. Inheritance of functional foreign genes in plants // *Science.*— 1984.— Vol.223.— P. 496–498.
7. Jefferson R.A. Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system / *Plant Mol. Biol. Rep.*— 1987.— Vol.5.— P. 387–405.
8. Elmayan T., Tepfer M. Evaluation in tobacco of the organ specificity and strength of the rolD promoter, domain A of the 35S promoter and the 35S2 promoter // *Transgenic Res.*— 1995.— Vol.4.— P. 388–396.
9. de Souza C.R., Arago F.J., Moreira E.C.O. et al. Isolation and characterization of the promoter sequence of a cassava gene coding for Pt2L4, a glutamic acid-rich protein differentially expressed in storage roots // *Genet. Mol. Res.*— 2009.— Vol.8, N1.— P. 334–344.
10. Ishiguro S. and Nakamura K. The nuclear factor SP8BF binds to the 5'-upstream regions of three different genes coding for major proteins of sweet potato tuberous roots // *Plant Mol. Biol.*— 1992.— Vol.18.— P. 97–108.
11. Pujade-Renaud V., Sanier C., Cambillau L. et al. Molecular characterization of new members of the *Hevea brasiliensis* hevein multigene family and analysis of their promoter region in rice // *Biochim. Biophys. Acta.*— 2005.— Vol.1727.— P. 151–161.
12. Vieweg M.F., Fruhling M., Quandt H.J. et al. The promoter of the *Vicia faba* L. leghemoglobin gene Vflb29 is specifically activated in the infected cells of root nodules and in the arbuscule-containing cells of mycorrhizal roots from different legume and nonlegume plants // *Mol. Plant Microbe Interact.*— 2004.— Vol.17.— P. 62–69.
13. Yamamoto Y.T., Taylor C.G., Acedo, G.N. et al. Characterization of cis-acting sequences regulating root-specific gene expression in tobacco // *Plant Cell.*— 1991.— Vol.3.— P. 371–382.
14. Chun J.-A., Lee W.-H., Han M.-O. et al. Optimization of abiotic factors for improved growth and extracellular production of recombinant fungal phytase in sesame hairy root culture // *Biotech. Bioprocess Eng.*— 2007.— Vol.12.— P. 242–249.

Резюме

Сконструирован бинарный вектор, содержащий ген β-глюкуронидазы под контролем корнеспецифического промотора *Mll*, клонированного из сахарной свеклы. Получены трансгенные растения табака и моркови и корневые линии табака, содержащие ген *gusA* под контролем *35S* и *Mll* промоторов. Гистохимический анализ растений и корневых линий табака, трансформированных *Mll::gusA*, показал корнеспецифическую экспрессию гена *gusA*. У растений моркови экспрессия *Mll::gusA* имела скорее конститутивный профиль.

Сконструйовано бінарний вектор, що містить ген β-глюкуронідази під контролем корнеспецифічного промотору *Mll*, клонованого з цукрового буряку. Отримано трансгенні рослини тютюну і моркви та кореневі лінії тютюну, що містять ген *gusA* під контролем *35S* та *Mll* промоторів. Гістохімічний аналіз рослин і корневих ліній тютюну, трансформованих *Mll::gusA*, показав корнеспецифічну експресію

гена *gusA*. У рослин моркви експресія *Mll::gusA* мала скоріше конститутивний профіль.

Mll promoter was cloned from sugar beet and linked to *gusA* gene to design binary vector. Transgenic tobacco and carrot plants and tobacco hairy roots harboured *Mll::gusA* and *35Sl::gusA* were obtained. GUS-analysis of transgenic tobacco plants and hairy roots transformed with *Mll::gusA* revealed root-specific gene expression. Reporter gene driven by *Mll* promoter has more likely constitutive expression in transgenic carrot.

КЛОЧКО В.В., ЗЕЛЕНА Л.Б., САФРОНОВА Л.А., АВДЄЄВА Л.В.

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, Україна, Київ, 03680, вул. Заболотного, 154, e-mail: vvk@serv.imv.kiev.ua

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ ПРОБІОТИЧНИХ ШТАМІВ *BACILLUS SUBTILIS* УКМ В-5139 ТА УКМ В-5140

Пробіотичні препарати на основі бактерій роду *Bacillus* широко використовуються для корекції дисбіотичних станів. Застосування таких препаратів сприяє відновленню нормальної мікрофлори організму, покращує травлення, має імуностимулюючий та дезінтоксикуючий ефекти. Відібрані штами *B. subtilis* УКМ В-5139 та УКМ В-5140 впливають на неспецифічну резистентність теплокровних організмів: підвищують імунний статус і фагоцитарну активність лейкоцитів крові, стимулюють активність лімфоцитів і лімфоїдних структур, позитивно впливають на білковий склад крові і посилюють індукцію ендogenous інтерферону [1, 2]. Також дані штами характеризуються широкою антагоністичною активністю щодо ряду умовно-патогенних та патогенних мікроорганізмів [3].

До цього часу недостатньо вивченим є питання про межі окремих видів бацил. Широка мінливість цих бактерій і різноманітна біологічна активність обумовлюють високу внутрішньовидову гетерогенність деяких видів бацил. Застосування нових молекулярно-біологічних методів дослідження дало змогу встановити генетичну гетерогенність виду *Bacillus cereus*, однак такі дослідження не проводились для *Bacillus subtilis* — виду, який найчастіше виділяють з довкілля. Останнім часом з використанням сучасних генетичних методів досліджень було встановлено, що вид *B. subtilis* складається з групи споріднених видів і підвидів, які можна відокремити один від одного методами генетичного типування [4, 5].

Метою роботи було визначення штамової специфічності *B. subtilis* УКМ В-5139 та УКМ В-5140 з використанням методів молекулярно-біологічного аналізу.

Матеріали і методи

Об'єкти досліджень — штами *B. subtilis* УКМ В-5139 та УКМ В-5140, що зберігаються в Українській колекції мікроорганізмів та підтримуються у відділі антибіотиків Інституту мікробіології і вірусології НАН України.

Для дослідження процесів метаболізму та засвоєння джерел вуглецю використовували стандартизовані АРІ системи — АРІ 20Е та АРІ 50 СНВ/Е (Biomeгіеих, Франція), що містять вуглеводи, їх похідні, а також ряд інших сполук [6].

Виділення ДНК з суспензії клітин і ПЛР-аналіз проводили відповідно до методик, наведених у роботах [7, 8]. ПЛР виконували на ампліфікаторі “Терцик” (“ДНК-Технологія”, Росія).

Результати і їх обговорення

У результаті проведеного фізіолого-біохімічного аналізу встановлено, що штами *B. subtilis* УКМ В-5139 та УКМ В-5140 схожі між собою за засвоєнням більшості джерел вуглецю. Однак було виявлено і ряд відмінностей — штам УКМ В-5139, на відміну від УКМ В-5140, засвоював триптофан, не засвоював арбутин та D-гуранозу. Після двох діб культивування штам УКМ В-5140 засвоював глікоген, D-цукрозу, D-целобіозу, метил- α D-глюкопіранозид та гліцерин, а споживання цих субстратів штамом УКМ В-5139 було відсутнє. Також у штама УКМ В-5139 газоутворення відбувалось при споживанні глікогена, а у штама В-5140 — інозита і D-маніта. Таку здатність до газоутворення з різними джерелами вуглецю можна використовувати для ідентифікації досліджуваних штамів.

З метою вивчення геномної мінливості даних штамів виду *B. subtilis* був проведений порівняльний аналіз спектрів продуктів ампліфікації з праймерами до міні- та мікросателітних послідовностей. Відмінності між штамми були виявлені при використанні 7 з 8 праймерів. Розмір ампліконів варіював від 200 до 1100 п.н. залежно від праймеру, а їх кількість — від 3 до 9 і становила, у середньому, 5 фрагментів на праймер.

У своїх дослідженнях ми використали універсальний праймер М13, який застосовують для видової ідентифікації мікроорганізмів. Згідно літературних даних [8, 9], представників різних видів можливо відрізнити, порівнюючи спектри фрагментів ампліфікації з праймером М13. У результаті ПЛР з праймером М13 і ДНК, виділеною з двох штамів виду *B. subtilis*, було відмічено, що кількість ампліконів в обох зразках однакова і складає 9 фрагментів розміром від 280 до 1100 п.н. Відмінностей у патернах ПЛР-продуктів між двома штамми не виявлено.

Ампліфікацію бактеріальної ДНК здійснювали з використанням 7 праймерів до мікросателітних послідовностей, з яких один містив тетра nukлеотидний повтор, а 6 — динуклеотидний повтор: 4 мали один “якірний” нуклеотид на 3'-кінці, а один праймер — два нуклеотиди. У результаті ПЛР з кожним праймером були виявлені фрагменти, що дозволяли відрізнити штами між собою, тобто ми спостерігали поліморфізм нуклеотидної послідовності (рис. 1).

Загальний спектр продуктів ампліфікації, залежно від праймеру, нараховував 3–9 фрагментів розміром від 200 до 1000 п.н. Найбільша кількість ампліконів — 9, зафіксована при використанні праймеру до тетра nukлеотидного повтору, а найменша — 3, з використанням праймеру (AG)₈G.

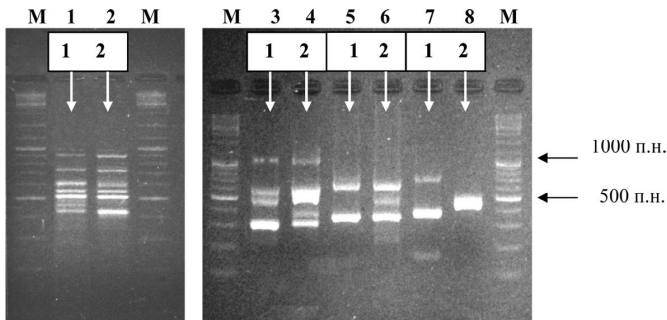


Рис. 1. Електрофореграма продуктів ампліфікації з праймерами до мікросателітних послідовностей і ДНК, виділеною з штамів *B. subtilis* УКМ В-5139 і УКМ В-5140. М — маркер молекулярної маси DNA ladder mix; праймери: 1, 2 — $(GACA)_4$; 3, 4 — $(AG)_8CT$; 5, 6 — $(AG)_8G$; 7, 8 — $(AG)_8T$

Кількість поліморфних фрагментів, в залежності від використаних праймерів, становила від одного до чотирьох ампліконів.

Отже, праймери, що давали значний відсоток поліморфних ампліконів, можна використовувати для аналізу гетерогенності геному представників виду *B. subtilis* та даних штамів зокрема. В той же час, праймери $(GACA)_4$, $(AG)_8G$ та $(AG)_8CT$, за спектрами яких ПЛР-продукти штамів *B. subtilis* УКМ В-5139 і УКМ В-5140 відрізнялися лише одним фрагментом, можна застосовувати для ідентифікації цих штамів.

Висновки

Таким чином, пробіотичні штами *B. subtilis* УКМ В-5139 і *B. subtilis* УКМ В-5140 мають ряд відмінностей як за фізіолого-біохімічними ознаками, так і за спектрами продуктів ампліфікації, що свідчить про необхідність вивчення додаткових філогенетичних ознак пробіотичних штамів бацил для уточнення їх таксономічного положення. Використані нами маркери до мікро- та мінісателітних послідовностей можна застосовувати для диференціації штамів *B. subtilis*.

Література

1. Кудрявцев В.А., Сафронова Л.А., Осадчая А.И., Ганова Л.А., Смирнов В.В. Влияние живых культур *Bacillus subtilis* на неспецифическую резистентность организма // Микробиол. Ж.— 1996.— Т.58, №2.— С. 46–55.
2. Подгорський В.С., Коцофляк О.И., Кирьянова Е.А., Гвоздяк О.Р. Украинская коллекция микроорганизмов. Каталог культур.— Киев: Наук. Думка.— 2007.— 426 с.
3. Кудрявцев В.А., Сафронова Л.А., Осадчая А.И., Вьюницкая В.А., Смирнов В.В. Антагонистическое действие на возбудителей эндометритов крупного рогатого скота // Микробиол. Ж.— 1993.— Т.55, №2.— С. 74–82.
4. Nakamura, L.K., Roberts, M.S. and Cohan, F.M. Relationship of *Bacillus subtilis* clades associated with strains 168 and W23: a proposal for *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* subsp. nov. and *Bacillus subtilis* subsp. *spizizeni* subsp. nov. // Int. J. Syst. Evolut. Microbiol.— 1999.— Vol.49.— P. 1211–1215.

5. Goto, K., Omura, T., Hara, Y. and Sadaie, Y. Application of the partial 16S rDNA sequence as an index for rapid identification of species in the genus *Bacillus* // *J. Gen. Appl. Microbiol.*— 2000.— Vol.46.— P. 1–8.

6. Logan N. A. and Berkeley R. C. W. Identification of *Bacillus* strains using the API System // *Journal of General Microbiology.*— 1984.— Vol.130.— P. 1871–1882.

7. Neve G., Meglecz E. Microsatellite frequencies in different taxa // *Trends Ecol. Evol.*— 2000.— Vol.15, N9.— P. 3761.

8. Rossetti L., Giraffa G. Rapid identification of dairy lactic acid bacteria by M13-generated, RAPD-PCR fingerprint databases // *Journal of Microbiological Methods.*— 2005.— Vol.63.— P. 135–144.

9. Giraffa G., Rossetti L., Neviani E. An evaluation of chelex-based DNA purification protocols for the typing of lactic acid bacteria // *Journal of Microbiological Methods.*— 2000.— Vol.42.— P. 175–184.

Резюме

У роботі наведено результати фізіолого-біохімічного і генетичного аналізу пробіотичних штамів *B. subtilis* УКМ В-5139 та УКМ В-5140. Виявлено відмінності між штамми у засвоєнні різних джерел живлення, а також у спектрах продуктів ампліфікації з праймерами до мікросателітних послідовностей. Показано, що використані маркери можна застосовувати для диференціації штамів *B. subtilis*.

В работе представлены результаты физиолого-биохимического и генетического анализа пробиотических штаммов *B. subtilis* УКМ В-5139 и УКМ В-5140. Выявлены отличия между штаммами в усвоении широкого ряда источников питания, а также в спектрах продуктов амплификации с праймерами к микросателлитным последовательностям. Показано, что использованные маркеры возможно применять для дифференциации штаммов *B. subtilis*.

Results of physiology-biochemical and genetic analysis of *B. subtilis* probiotic strains UCM В-5139 and UCM В-5140 have been performed in the research. Some differences between the strains in the utilization of a wide range of nutrient sources as well as in the pattern of products of amplification with primers to microsatellite sequences have been detected. It has been shown the markers revealed in the research could be used to differentiate *B. subtilis* strains.

КОЛОДЯЖНАЯ Я.С.

Universite Libre de Bruxelles, Bd.du Triomphe, CP242, Bruxelles, 1050, Belgique
e-mail: jsk@ngs.ru

Институт цитологии и генетики СО РАН, Россия, 630090. Новосибирск,
пр. Лаврентьева, 10

СТРАТЕГИИ ИССЛЕДОВАНИЯ МЕХАНИЗМОВ УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ К ТОКСИЧЕСКОМУ ВОЗДЕЙСТВИЮ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ

Как известно, почвы в силу антропогенного влияния загрязнены тяжелыми металлами (ТМ), в число которых входят ртуть, кадмий, свинец, цинк, медь и некоторые другие. Попадая различными путями в атмосферу и почву,

эти металлы поступают сначала в растения, а затем с пищей могут попасть в организм человека или животных.

Существует класс растений, называемых гипераккумуляторами, которые способны абсорбировать и накапливать довольно значительные количества ТМ без видимого токсического проявления. На сегодняшний день насчитывают порядка 400 видов таких растений, способных накапливать цинк, кадмий, кобальт, медь, марганец или никель. В семействе *Brassicaceae* к таким видам относятся *Thlaspi caerulescens* и *Arabidopsis halleri* (Assunção et al., 2003; Bert et al., 2000, Bert et al., 2003). Генетическое родство с *Arabidopsis thaliana* (около 88% гомологии на уровне кодирующих последовательностей) делает эти виды модельными при изучении феномена гипераккумуляции, что особенно важно, поскольку механизмы устойчивости растений к ТМ до сих пор мало изучены. Один из механизмов защиты на уровне цитозоля — транспорт ТМ в вакуоль или апопласт. Предполагают, в частности, что пример таких транспортеров — семейство САХ (Cation Exchangers), которые, по-видимому, редуцируют транспорт в наземную часть растения. Белки семейства САХ имеют длину около 400 аминокислотных остатков (Cai and Lytton, 2004; Shigaki and Hirschi, 2006). На данный момент описано 11 представителей транспортеров этого типа; лучше всех охарактеризованы представители *SAX1*, *SAX2*, *SAX3*, и *SAX4*. Два других члена семейства — *SAX2* и *SAX8* — рассматриваются как потенциальные кандидаты, определяющие устойчивость и накопление ТМ у *A. halleri*. (Becher et al., 2004; Craciun et al., 2006).

Другая стратегия, которая приводит к увеличению устойчивости — хелатирование металлов. Например, в этот процесс вовлечены металлотионеины (МТ) — низкомолекулярные белки, обогащенные цистеином и способные связывать двухвалентные металлы. У растений идентифицировано по крайней мере четыре типа МТ, отличающихся по числу и положению доменов, обогащенных цистеином.

Материалы и методы

В работе использовали растения арабидопсиса *Arabidopsis halleri* и ярутки *Thlaspi caerulescens*

1. Для переноса ДНК использовали вектора *pK7GWIWG2D(II)*. Методами Gateway клонирования созданы конструкции, в результате экспрессии которых должно произойти снижение экспрессии гена, отвечающего за экспрессию металлотионеинов третьего типа (МТ3) — RNAi стратегия.

Поскольку на данный момент не обнаружено растений нокаутов по гену *MT3*, то в ходе работы планировали получить и проанализировать генетически модифицированные растения, у которых экспрессия гена, отвечающего за синтез металлотионеинов, снижена.

Для изучения функции гена *SAX* предполагается получить растения с пониженным и повышенным уровнями экспрессии.

2. Для агробактериальной трансформации были использованы штаммы C58, ЕНА105, Ag10, Ag11.

3. Методика трансформации корневых и листовых эксплантов арабидопсиса *Arabidopsis halleri* и ярутки *Thlaspi caerulescens*

а) *Среды для получения регенерантов из корневых эксплантов*

Среда для индуцирования каллусообразования (K1): среда MS с добавлением 1 мг/л 2,4-D, 0,5 мг/л кинетина, 20 г/л сахарозы, 7 г/л агар.

Среда для индуцирования процесса регенерации (P1): среда MS с добавлением 1,0 мг/л БАП, 0,5 мг/л НУК, 1,0 мг/л гиббереллиновой кислоты, 20 г/л сахарозы, 7 г/л агара.

Экспланты за 10 дней до трансформации помещаются на среду K1 и оставляются в темноте. После культивирования с агробактерией экспланты переносят на среду P1, содержащие антибиотики, подавляющие рост агробактерии.

б) *Среды для получения регенерантов из листовых эксплантов*

На среде MS с добавлением 2 мг/л кинетина, 2 мг/л БАП + 1 мг/л НУК, 30 г/л сахарозы, 7 г/л агара, экспланты культивируют в течение 7–10 дней. После культивирования с агробактерией экспланты переносят на аналогичную среду с добавлением антибиотика, подавляющего рост агробактерии.

Антибиотики, являющиеся селективными и предназначенные для отбора трансформантов, добавляются через 2–3 недели после трансформации, чтобы уменьшить их отрицательное воздействие на процесс регенерации.

Результаты и обсуждение

Как известно, процесс трансформации растений очень тонкий и капризный, зависящий от множества факторов: генотипа, температуры, влажности, продолжительности светового дня и пр. В настоящее время опубликовано только одна работа, посвященная трансформации корневых эксплантов *Arabidopsis halleri* (Hanikenne et al., 2008), и нет публикаций о генетически модифицированных растениях *Thlaspi caerulescens*.

В результате работы было проанализировано влияние агробактериальных штаммов на процесс регенерации у *Arabidopsis halleri*. Отмечено, что

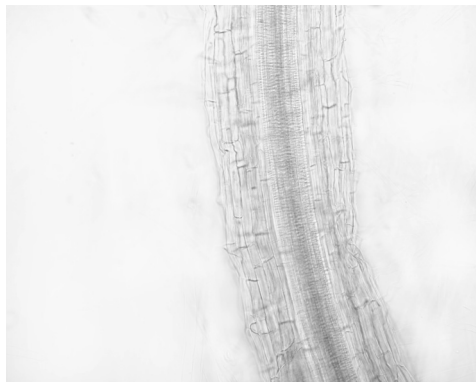


Рис. 1. Окрашивание сосудистых тканей вследствие экспрессии GUS

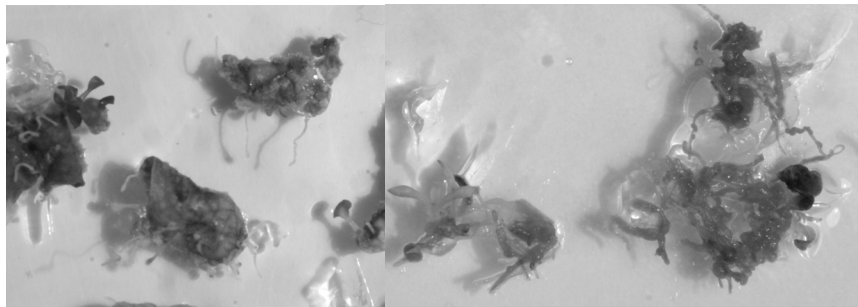


Рис. 2. Регенерация из листовых и корневых эксплантов

большее количество регенерантов получено при трансформации штаммами C58 и AgI1. Причем трансформанты были получены как из корневых, так и из листовых эксплантов. С целью визуализации процесса изначально использовали агробактерии, несущие “пустую” плазмиду с репортерным геном, позволяющим оценить наличие встройки методом GUS окрашивания.

Попытки получить регенеранты из листовых эксплантов были до сих пор неудачны. Нами впервые была разработана такая методика получения не только регенерантов, но и трансформантов.

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 Assunção, A.G.L., Schat, H., Aarts, M.G.M. (2003). *Thlaspi caerulescens*, an attractive model species to study heavy metal hyperaccumulation in plants // *New Phytol* **159**, P. 351–360.
2. Becher M, Talke I, Krall L, Krømer U (2004) Cross-species microarray transcript profiling reveals high constitutive expression of metal homeostasis genes in shoots of the zinc hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *The Plant Journal*, 37: 251-268.
3. Bert V, Macnair M.R., de Laguerie P., Soumitou-Laprade P. and Petit D. (2000) Zinc tolerance and accumulation in metallicolous and nonmetallicolous populations of *Arabidopsis halleri* (Brassicaceae). *New Phytologist*, 146: 225–233.
4. Bert V, Meerts P., Saumitou-Laprade P., Salis P., Gruber W. and Verbruggen N. (2003) Genetic basis of Cd tolerance and hyperaccumulation in *Arabidopsis halleri*. *Plant and soil*, 249: 9–18.
5. Cai X. and Lytton J. The Cation/Ca²⁺ Exchanger Superfamily: Phylogenetic Analysis and Structural Implications. 2004. *Mol. Biol. Evol.* 21(9): 1692–1703.

6. Craciun A.R., Courbot M., Bourgis F., Salis P., Saumitou-Laprade P. and Verbruggen N. Comparative cDNA-AFLP analysis of Cd-tolerant and sensitive genotypes derived from crosses between the Cd hyperaccumulator *Arabidopsis halleri* and *Arabidopsis lyrata* ssp. *petraea*. *Journal of Experimental Botany*, 2006 57(12): 2967–83.

7. Hanikenne M., Talke I.N., Haydon M.J., Lanz C., Nolte A., Motte P., Kroymann J., Weigel D. Krömer U. *Nature*. 2008. 453: 391–395

8. Shigaki T. and Hirschi K.D. (2006) Diverse functions and molecular properties emerging for CAX cation/H⁺ exchangers in plants. *Plant Biol (Stuttg)*, 8(4): 419-29.

**КОМИСАРЕНКО А.Г.,¹ МИХАЛЬСКАЯ С.И.,¹ МОРГУН Б.В.,^{1,2}
МУЖАНОВСКАЯ О.В.,² КОЧЕТОВ А.В.,³ ТИЩЕНКО Е.Н.¹**

¹Институт физиологии растений и генетики НАН Украины

Украина, 03022, Киев, ул. Васильковская, 31/17, e-mail: oltyko@gmail.com

²Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины

Украина, 03143, Киев, ул. Заболотного, 148

³Институт цитологии и генетики Сибирского отделения

Российской академии наук, Новосибирск

ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ *AGROBACTERIUM*- ОПОСРЕДОВАННОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ ИНБРЕДНЫХ ЛИНИЙ ПОДСОЛНЕЧНИКА

Прогресс в генетическом улучшении линий и гибридов подсолнечника методологией *Agrobacterium*-опосредованной трансформации сдерживается низкой эффективностью интродукции рекомбинантных молекул ДНК в клетки, способные к реализации морфогенетического потенциала. На сегодняшний день проанализирована восприимчивость к агробактериальной инфекции ряда эксплантов подсолнечника и для определённых генотипов предложены протоколы трансформации [1–4].

Нами разработан способ индукции регенерации из сегмента побега 3–4-суточных проростков линий и гибридов отечественной селекции подсолнечника, где в отличие от проанализированных на сегодняшний день частей проростка использован сегмент, состоящий из нижней половины семядоли с расщепленной верхней частью гипокотила размером 1–2 мм [5]. Этот эксплант может быть удобным объектом для *Agrobacterium*-опосредованной трансформации, поскольку индукция побегообразования происходит путём прямого органогенеза через короткий период времени (5–7 дней). Однако первоначальные исследования показали низкую эффективность интродукции Т-ДНК в геном подсолнечника одновременно с существенным падением частоты регенерации. В связи с этим целесообразно было проводить поиск факторов, которые положительно влияют на оба эти процесса. Для повышения устойчивости растений подсолнечника к абиотическим стрессорам

может представлять интерес векторная конструкция pVi2E, содержащая антисмысловой супрессор пролиндегидрогеназы и селективный ген *nptII* [6]. В связи с этим оптимизировали условия *Agrobacterium*-опосредованной трансформации инбредных линий подсолнечника штаммом LBA 4404, содержащим pVi2E.

Материалы и методы

Объектом исследования служили инбредные линии подсолнечника 96A/3, 16A/3, 70A/3 (селекции Одесского селекционно-генетического Института, УААН). Индукцию регенерации осуществляли на модифицированной нами питательной среде МСМТ, дополненной тиосульфатом натрия.

Ночную культуру агробактерии центрифугировали при 1700 g 10 мин и ресуспендировали в среде МСМТ (оптическая плотность при 600 нм = 1). Инокулировали экспланты 1 час, потом высаживали на агаризованную среду МСМТ, которая не содержала углеводов, и кокультивировали 2 суток в темноте при 27 °С. Затем пассировали на среде МСМТ с антибиотиком цефотаксимом (Cf) конечной концентрации 500 мг/л, которая полностью ингибировала агробактерию. При этом селективный агент (канамицин — Km, 100 мг/л) добавляли одновременно или через 5, 7, 10 суток после кокультивирования. Появление первых побегов наблюдали на 5 день. Селекцию вели в течение 2–3-х пассажей (продолжительность пассажа 12–14 дней). Селективную концентрацию канамицина определяли, варьируя концентрацией этого антибиотика от 20 до 200 мг/л в МСМТ без агробактериальной инфекции. Ультразвуковую обработку (УЗ) в течение 15 с проводили в период инокуляции эксплантов агробактерией на ультразвуковом диспергаторе УЗДН–1 У4.2 при частоте 44 кГц, 25 °С. Частоту побегообразования исследуемых генотипов оценивали по отношению количества регенерантов к общему числу эксплантов на 3-ем пассаже, а частоту предполагаемых трансформантов как отношение количества Km-устойчивых побегов к общему числу эксплантов. Для каждого генотипа учитывали результаты 6–10 аналитических повторностей опыта (120–240 эксплантов). При статистической обработке результатов сравнительного исследования применяли критерий Стьюдента.

Интродукцию T-ДНК в геном подсолнечника определяли методом ПЦР с использованием пары праймеров к гену *nptII*, которые позволяют амплифицировать фрагмент размером 649 п.н. ДНК выделяли согласно модифицированному нами методу Деллапорта. Состав реакционной смеси: 10×ПЦР буфер 0,2 мМ; дНТФ по 0,2 мМ; праймеры по 0,25 мкМ; *Taq*-полимераза 1 од.; концентрация ДНК — 10 нг/мкл. Амплификацию фрагментов ДНК проводили на термоциклере Mastercycler Personal 5332 (Eppendorf), используя следующую программу: первая денатурация 94 °С, 4 мин.; 35 циклов: денатурация при 94 °С 30 с; отжиг праймеров при 53 °С, 1 мин; элонгация 72 °С, 22 с, заключительная — 10 мин. Наличие агробактериальной примеси контролировали по генам *virD*. Продукты амплификации анализировали в 1,2%-ном агарозном геле при напряженности 3–4 В/см в течение часа в буфере 1хТБЕ.

Результаты и обсуждение

На процесс *Agrobacterium* — опосредованной трансформации могут оказывать влияние ряд факторов, в том числе, условия инокуляции и культивирования, агробактериальный штамм, плазмидный вектор, селективный и бактерицидный агенты, тип экспланта, генотип растения [7]. В данной работе основное внимание было обращено на два момента: условия инокуляции, где по нашему предположению значение может иметь комбинация ультразвука и тиосульфата натрия, а также выбор оптимального периода селекции устойчивых к канамицину побегов.

Что касается первого, то известно, что каждый из этих компонентов: и ультразвук, и тиосульфат натрия, — может приводить к повышению частоты переноса Т-ДНК в клетки ряда растений [8, 5]. Вместе с тем относительно метода SAAT (Sonication-assisted *Agrobacterium* — mediated transformation), который заключается в кратковременной обработке растительных тканей ультразвуком в присутствии агробактерий, данные для подсолнечника неоднозначны, а для тиосульфата Na — отсутствуют. Учитывая, что ранее нами показано увеличение частоты регенерации, максимум которого для тестируемых инбредных линий наблюдался при длительности озвучивания 15 с и концентрации тиосульфата Na, равной 20 мкг/мл, логично было эффективность трансформации анализировать именно в таких условиях инокуляции агробактерией.

Как видно из данных, представленных на рис. 1А, независимо от генотипа в условиях *Agrobacterium* — опосредованной трансформации (в частности, инокуляция в МСМТ, элиминация агробактерий цефотаксимом при концентрации 500 мг/л и одновременно селекция при Km 100 мг/л), канамицин-устойчивых растений-регенерантов получено не было. В то время как ультразвуковая обработка, хотя и с небольшой частотой, приводила к их появлению (рис. 1Б). Очевидно, что при таких условиях повышается вероятность переноса Т-ДНК в тотипотентные клетки экспланта подсолнечника. Это, скорее всего, можно пояснить синергизмом двух факторов — ультразвука и тиосульфата натрия. С одной стороны, последний компонент стимулирует пролиферацию эпидермальных и/или субэпидермальных клеток гипокотыля, способных к последующей дифференцировке, возможно за счёт изменения электрохимического потенциала. С другой стороны, при действии ультразвука, как показано [8], происходит образование значительного количества репарируемых микропоранений на поверхности растительных тканей, что увеличивает колонизацию агробактерий и компетентность эксплантов к инфекции.

Следует отметить, что при *Agrobacterium* — опосредованной трансформации селекция на Km-содержащих средах для подсолнечника не всегда бывает успешной. Этот селективный агент может негативно влиять на частоту побегообразования *in vitro* и приводить к появлению фальшь-трансформантов [9, 4]. Так, по мере увеличения концентрации Km происходило снижение морфогенетического потенциала анализируемых нами линий,

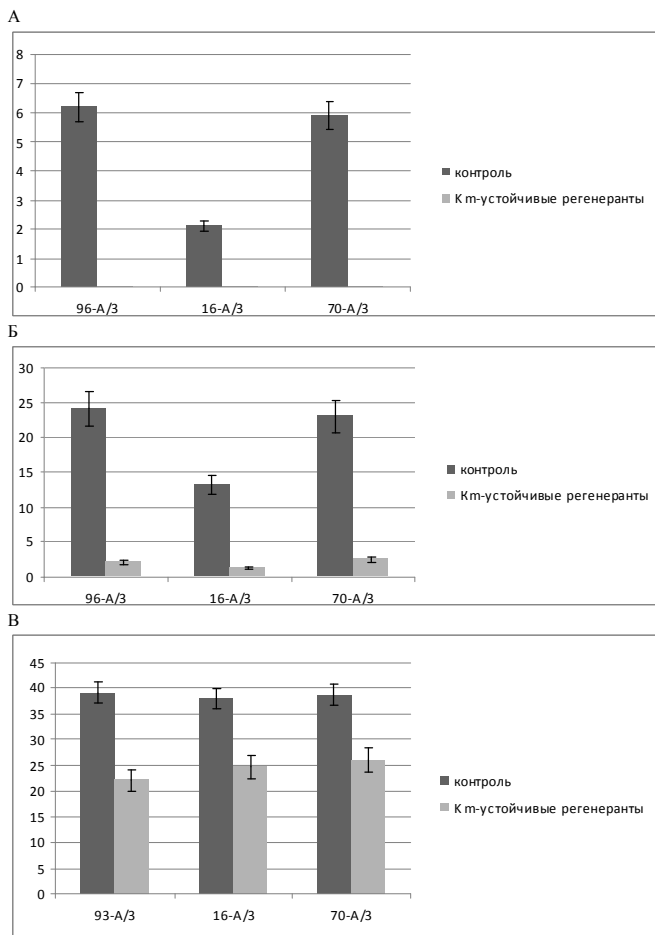


Рис. 1. Частота Km-устойчивых побегов (%) инбредных линий 96A/3, 16A/3 и 70A/3: (А) — селекция одновременно с элиминацией бактерий после кокультивирования; (Б) — ультразвуковая обработка при инокуляции; (В) — селекция на 7–10 день после кокультивирования. Контроль — процент регенерации побегов без *Agrobacterium* — опосредованной трансформации

причём ответная реакция на этот селективный агент была неоднозначная. Если индукция регенерации у линий 16A/3 и 70A/3 прекращалась уже при 150 и 200 мкг/мл канамицина, соответственно, то у 96A/3 при этих же концентрациях она продолжалась. Некоторые растения-регенеранты анализируемых нами генотипов могли выдерживать концентрации Km более 100 мкг/мл в течение длительного периода. При этом фенотипически они не отличались

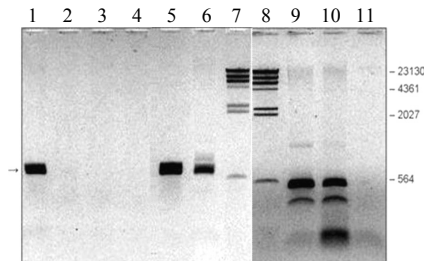


Рис. 2. Электрофореграмма продуктов амплификации ДНК регенерантов подсолнечника с использованием праймеров к гену *nptII* в 1,2%-ном агарозном геле: предполагаемые трансформанты (1, 2, 3, 5, 6); нетрансформированный регенерант (4), негативный(11) и позитивный (9, 10) контроль. Маркер молекулярных масс — ДНК фага λ , гидролизованная *HindIII* (7, 8)

от контрольных (нетрансформированных), однако ПЦР-анализ не показывал наличие гена *nptII* в их геноме (рис. 2, дорожки 2, 3). Повышенный уровень устойчивости к канамицину, по-видимому, является отражением адаптации регенерантов подсолнечника к этому стрессору, что ограничивает возможности надёжного отбора трансформантов с помощью этого агента.

С учётом негативного действия канамицина на реализацию морфогенетического потенциала подсолнечника при агробактериальной инфекции, сравнивали частоту образования Km-устойчивых регенерантов в зависимости от длительности культивирования. Установлен низкий уровень предполагаемых трансформантов в период 0–7 дней после кокультивирования, тогда как далее, когда наблюдаются оптимальные условия для регенерации, происходило значительное его повышение (в ~10–20 раз) независимо от генотипа (рис. 1В). Не исключено, что позитивный эффект может быть отражением комплексного действия УЗ, тиосульфата натрия и цефотаксима, поскольку последний в отличие от Km может как повышать, так и понижать регенерационную способность некоторых видов растений в зависимости от его концентрации [10]. Эти данные свидетельствуют о том, что для получения предполагаемых трансформантов целесообразно увеличивать продолжительность культивирования *in vitro* без селективного агента. Результаты молекулярно-генетического анализа подтвердили интродукцию рекомбинантных молекул ДНК в геном подсолнечника у ряда проанализированных растений-регенерантов, устойчивых к канамицину.

Литература

1. Malone-Schoneberg JB., Scelonge C.J., Burrus M., Bidney D.L. Stable transformation of sunflower using *Agrobacterium* and split embryonic axis explants // Plant Sci.— 1994.— 103.— P. 199–207.
2. 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.

3. Muller A., Iser M., Hess D. Stable transformation of sunflower (*Helianthus annuus* L.), using a non-meristematic regeneration protocol and green fluorescent protein as a vital marker // *Transgenic Research*.— 2001.— 10.— P. 435–444.

4. Neskorodov Ya.B., Rakitin A.L., Kamionskayam A.M., Skryabin K.G. Developing phosphinothricin-resistant transgenic sunflower (*Helianthus annuus* L.) plants // *Plant Cell Tiss Organ Cult*.— 2010.— 100.— P. 65–71.

5. Комисаренко А.Г., Михальская С.И., Малина А.Э., Тищенко Е.Н. Влияние тиосульфата натрия и ультразвука на индукцию регенерации *in vitro* инбредных линий подсолнечника (*Helianthus annuus* L.) // *Вісник українського товариства генетиків і селекціонерів*.— 2009.— Т.7, №1.— С. 31–37.

6. Кочетов А.В., Тутов С.Е., Колодяжная Я.С., Комарова М.Л., Коваль В.С., Макарова Н.Н., Илинский Ю.Ю., Трифанова Е.А., Шумный В.К. Повышение содержания пролина и осмотического давления клеточного сока у трансформантов табака, несущих антисмысловой супрессор гена пролиндегидрогеназы // *Генетика*.— 2004.— Т.40, №2.— С. 282–285.

7. Sh. Mohamed, R. Boehm, P.C. Binsfeld, and H. Schnabl *Agrobacterium*-mediated transformation of two high oleic sunflower (*Helianthus annuus* L.) genotypes; assessment and optimization of important parameters and optimization of important parameters // *HELIA*.— 2004.— 27, Nr.40.— P. 25–40.

8. Trick H.N., Finner J.J. SAAT: sonication-assisted *Agrobacterium* — mediated transformation // *Transgenic Res*.— 1997.— 6.— P. 29–336.

9. Knittel N., Hahne G., Lenee P. Transformation of sunflower (*Helianthus annuus* L.): A reliable protocol // *Plant Cell Rept*.— 1994.— 14.— P. 81–86.

10. Данилова С. А., Долгих Ю.И. Стимуляция регенерации растений в культуре тканей кукурузы под действием антибиотика цефотаксима // *Физиология растений*.— 2004.— 51, №4.— С. 621–625.

Резюме

Показано, что эффективность *Agrobacterium* — опосредованной трансформации подсолнечника (*Helianthus annuus* L.) штаммом LBA 4404, содержащим вектор pBi2E с антисмысловым супрессором гена пролиндегидрогеназы и селективным геном *nptII*, определяется комбинацией ультразвука, бактерицидного и селективного агента, а также последовательностью их действия. Оптимальным является вариант, когда селекция проводится после индукции регенерации побегов и инокуляции совместно с ультразвуковой обработкой.

Встановлено, що ефективність *Agrobacterium* — опосередкованої трансформації соняшника (*Helianthus annuus* L.) штамом LBA 4404, який містить вектор pBi2E з антисмысловим супрессором гена проліндегидрогенази та селективним геном *nptII*, визначається комбінацією ультразвука, бактерицидного і селективного агенту, а також послідовності їх дії. Оптимальним є варіант, коли селекція проводиться після індукції регенерації пагонів та инокуляції сумісно з ультразвуковою обробкою.

The effectiveness of *Agrobacterium* mediated transformation of sunflower (*Helianthus annuus* L.) by LBA 4404, which harbour pBi2E vector with antisense suppression for proline dehydrogenase gene and *nptII*, are determined by combination of sonication, bacterial and selective agent as well as sequence their action. Optimal is variant, when selection is conducted after regeneration induction and inoculation with sonication.

КОРЗИНА Н.В., МИТРОФАНОВА О.В.

*Никитский ботанический сад — Национальный научный центр,
Украина, АР Крым, г. Ялта, 98648, e-mail: in_vitro@ukr.net*

ИНДУЦИРОВАННЫЙ МОРФОГЕНЕЗ В КУЛЬТУРЕ ОРГАНОВ И ТКАНЕЙ РАЙОНИРОВАННЫХ И ПЕРСПЕКТИВНЫХ СОРТОВ ЧЕРЕШНИ (*PRUNUS AVIUM* L.) *IN VITRO*

В последние годы в мире все активнее проводятся исследования в области биотехнологии садовых культур. Известно, что способность к морфогенезу изолированных органов и тканей зависит от многих факторов, таких как видовая принадлежность, сортоспецифичность, возраст растения-донора, тип первичного экспланта и сроки его введения *in vitro*. Кроме того, имеется ряд сообщений о влиянии таких абиотических факторов, как состав питательной среды, физические условия культивирования (температура, освещенность, влажность) и показано их значение для успешной регенерации растений [2, 5]. Работы ряда авторов свидетельствуют о различных сложностях, возникающих при микроразмножении сортов косточковых плодовых культур, обладающих низкой способностью к морфогенезу по сравнению с подвойными сортами и гибридными формами [1, 4, 8, 14, 15]. К числу таких трудноразмножаемых растений относится черешня (*Prunus avium* L.) — культура, наиболее распространенная в южных регионах Украины и имеющая важное промышленное значение. В связи с недостаточной изученностью вопросов регенерации *in vitro* растений *P. avium* целью данной работы было выявление особенностей морфогенеза эксплантов районированных и перспективных сортов черешни с разными сроками созревания плодов на разных этапах клонального микроразмножения.

Материалы и методы

Для исследований были отобраны сорта черешни (Призерша, Рубиновая Ранняя, Сказка, Талисман и Анонс) разных сроков созревания плодов, произрастающих в коллекционных насаждениях Степного отделения НБС-ННЦ (п. Гвардейское, АР Крым) и в опытном хозяйстве “Мелитопольское” Института орошаемого садоводства им. Н.Ф. Сидоренко (г. Мелитополь). В работе применяли биотехнологические методы, как общепринятые, так и разработанные в отделе биотехнологии и биохимии растений НБС-ННЦ [2, 4, 5]. Экспланты помещали на поверхность агаризованной питательной среды в условиях ламинарного бокса Fatran Lf (Чехия) и культивировали на питательных средах Gamborg и Eveleigh (B5) [11], Quoirin и Lepoivre (QL) [13], Tabachnik и Kester (ТК) [16], Murashige и Skoog (МС) [12] и их модификациях. Для изучения морфогенетических потенциалов органов и тканей в питательную среду в зависимости от этапов микроразмножения добавляли регуляторы роста: 6-бензиламинопуридин (БАП), N⁶-(2-изопентил)аденин (2ip), 6-(4-гидрокси-3-метил-2-бутенил-амино)-пуридин (зеатин), β-индолил-3-масляную кислоту (ИМК), β-индолил-3-уксусную кислоту (ИУК), α-нафтилуксусную кислоту (НУК), гибберелловую кислоту (ГК₃). Пробирки с

эксплантами помещали в культуральную комнату с заданным режимом интенсивности освещения (2–3 клк), 16-ти часовым фотопериодом и температурой 23 ± 1 °С.

Результаты и обсуждение

Известно, что для стерилизации растительного материала косточковых плодовых культур используются реагенты: гипохлорит натрия (NaClO) или кальция ($\text{Ca}(\text{ClO})_2$) [1, 14], сулема (HgCl_2) [15], раствор нитрата серебра (AgNO_3) [9]. Однако уровень контаминации эксплантов оставался достаточно высоким. Нами для эксплантов черешни экспериментально определен способ стерилизации, при котором получено минимальное количество инфицированных и потемневших меристем путем погружения вегетативных почек сорта Сказка в 2%-ный раствор гипохлорита натрия (NaClO) на 14–19 минут, и сортов Призерша и Анонс — на 15–18 минут. Для почек сортов Рубиновая Ранняя и Талисман успешным оказалось применение 1,75%-ного и 2%-ного раствора этого антисептика (16 и 15–19 минут соответственно). Показано, что на режим стерилизации оказывают влияние сроки введения эксплантов в культуру *in vitro*. Так, для органов и тканей, изолированных с донорного растения в марте – апреле, положительные результаты были получены при обработке 1,75–2%-ным раствором гипохлорита натрия в течение 12–15 минут. Для почек образцов черешни, отобранных в декабре — феврале, использовали более длительную экспозицию. Наиболее чувствительными к действию стерилизующего вещества оказались вегетативные почки и верхушки растущих побегов сортов черешни раннего (Призерша), раннесреднего (Рубиновая Ранняя) и позднего (Анонс) сроков созревания плодов. Меньше повреждались экспланты сортов среднего (Сказка) и среднепозднего (Талисман) сроков созревания плодов.

Наряду с этим, развитие первичных эксплантов *P. avium* в культуре *in vitro* во многом зависело от фазы вегетации растения. Полученные данные подтвердили, что для всех изученных сортов наиболее оптимальными для изолирования и введения эксплантов в стерильные условия являются февраль — апрель. Таким образом, результаты наших экспериментов показали, что на регенерацию меристем и апексов растущих побегов черешни *in vitro* оказывает влияние совокупность факторов, таких как генотип донорного растения, режимы стерилизации, сроки отбора сортообразцов [7].

При исследовании воздействия трофических факторов на культивирование микропобегов черешни было испытано несколько составов питательных сред, из которых оптимальными оказались среды МС и В5 с высоким содержанием азота, фосфора и калия. Поэтому в дальнейших исследованиях применяли разные модификации этих сред. В зависимости от этапа микроумножения их дополняли регуляторами роста.

Изучение влияния различных ауксинов и цитокининов на регенерацию микропобегов показало стимулирующую роль совместного применения БАП и ГК_3 на этапе введения. Так, для снятия апикального доминирования у первичных эксплантов в питательные среды добавляли вещества цитокинино-

вого типа действия: 2iP, зеатин и БАП. На средах, дополненных 2,46–4,92 мкМ 2iP и 0,73–1,46 мкМ ГК₃, нормальное развитие меристем происходило в течение 10 суток, однако постепенно шчи некротизировались. Применение в опытах зеатина, также как и в случае с 2iP, не показало положительных результатов.

При использовании в качестве регулятора роста ГК₃ выявлено, что первичные экспланты сортов черешни неодинаково реагируют на ее присутствие в среде. Так, концентрации 0,73–1,44 мкМ оказывают индуцирующее действие на развитие меристем сортов Призерша и Рубиновая Ранняя. Наряду с этим для успешной регенерации эксплантов сортов Сказка и Талисман потребовалось увеличение концентрации ГК₃ до 1,44–2,89 мкМ., для сорта Анонс — до 2,16–2,89 мкМ ГК₃. Только у эксплантов сортов Сказка и Рубиновая Ранняя спустя 30 суток после введения развились дополнительные микропобеги, и частота регенерации составила 40% и 8% соответственно [8].

Одним из наиболее сложных этапов клонального микроразмножения является корнеобразование, поэтому опытным путем подобраны концентрации регуляторов роста — НУК (8,06–16,12 мкМ) и ГК₃ (0,73–1,46 мкМ), что способствовало образованию корней у 90% микропобегов *P. avium*. Наиболее интенсивное корнеобразование происходило в период с апреля по июль. При этом корни появлялись уже на 10–12 сутки культивирования, в том числе и в контрольном варианте (среда без регуляторов роста). В остальные месяцы для первичного корнеобразования требовалось минимум 18–20 суток. Установлено, что на этапе укоренения агаризованная питательная среда обладала рядом преимуществ по сравнению с жидкой. На агаризованной среде происходило активное образование корней (3,5±0,64 шт./эксплант) и у регенерантов отсутствовали признаки оводненности. Растения, полученные на жидкой среде, не удалось адаптировать к нестерильным условиям.

Как известно из литературы, процесс формирования корней у *in vitro* у древесных растений может происходить различными путями [3]. Расширить представления о морфогенезе микропобегов черешни на этапе ризогенеза нам удалось в результате выявления 4-х типов формирования корней: 1) непосредственно из тканей микропобега; 2) из каллуса; 3) выше базальной части микропобега; 4) смешанный — корни развиваются из базальной части и на микропобеге (без процессов дедифференциации и каллусообразования) [6].

Лучшим субстратом для адаптации растений черешни оказалась смесь из песка, торфа и перлита с рН 6,95. Применение этого стерильного субстрата способствовало приживаемости (63,1%) и дальнейшему развитию регенерантов в условиях *in vivo*.

Выводы

1. В результате проведенных исследований разработаны биотехнологические приемы клонального микроразмножения сортов черешни разных сроков созревания плодов, основанные на регенерации растений из веге-

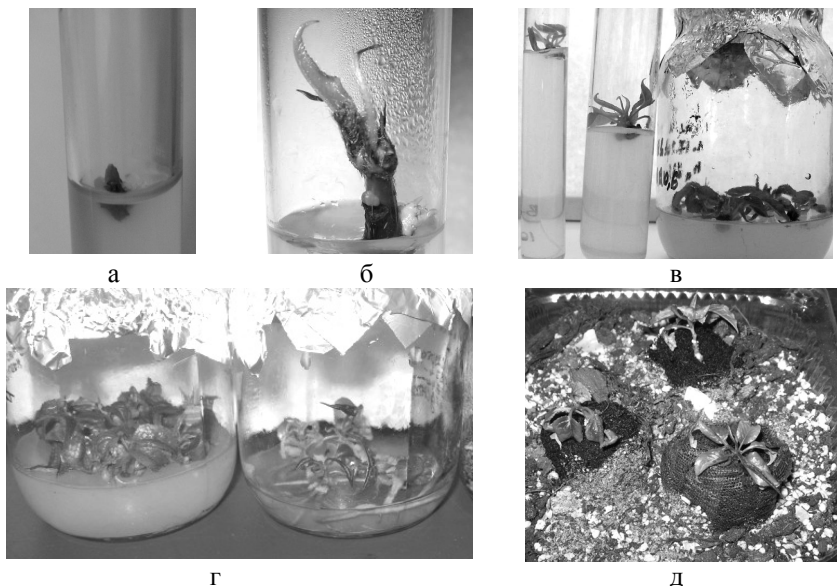


Рис. Этапы клонального микроразмножения растений черешни: а) и б) введение первичных эксплантов; в) регенерация и размножение микропобегов; г) укоренение; д) адаптация *in vivo*

тативных почек и верхушек активно растущих побегов, включающие укоренение микропобегов *in vitro* и адаптацию регенерантов *in vivo* (рис.).

2. Способ клонального микроразмножения черешни может быть использован в биотехнологических и селекционных центрах для получения растений районированных и перспективных сортов *P. avium*.

Литература

1. Бленда А.В. Мікроклональне розмноження *in vitro* представників підроддини *Prunoidae* // Физиология и биохимия культурных растений.— 2000.— Т.32, №5.— С. 428–434.
2. Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений.— М.: Наука.— 1964.— 272 с.
3. Виджешвар П., Митрофанова О.В., Лицук А.И. Клональное микроразмножение актинидии превосходной [*Actinidia deliciosa* (Chev.) Liang, Ferguson] / Сб. науч. тр. Никит. ботан. сада.— 1997.— Т.119.— С. 111–126.
4. Диагностика вирусных болезней и биотехнологические приемы получения безвирусного посадочного материала косточковых плодовых культур / Митрофанова О.В., Славгородская—Курпиева Л.Е., Митрофанова И.В., Лукичева Л.А.— Ялта: Крымпресс, 2000.— 46 с.
5. Калинин Ф.Л., Кушнир Г.П., Сарнацкая В.В. Технология микроклонального размножения растений.— Киев: Наукова думка.— 1992.— 232 с.

6. Корзина Н.В. Микроразмножение перспективных сортов черешни (*Prunus avium* L.) в условиях *in vitro* // Сб. науч. трудов Никит. ботан. сада.— 2009.— Т.131.— С. 112–117.

7. Кузнецова Н.В. Особенности введения первичных эксплантов четырех сортов черешни (*Prunus avium* L.) в условия *in vitro* / Теоретические и прикладные аспекты биохимии и биотехнологии растений: III Междунар. науч. конф., г. Минск, 14–16 мая 2008 г.— Минск, 2008.— С. 265–268.

8. Кузнецова Н.В. Влияние регуляторов роста на регенерационную способность четырех сортов черешни (*Prunus avium* L.) в условиях *in vitro* / Фактори експериментальної еволюції організмів: Зб. наук. пр. Укр. т-ва генетиків і селекціонерів ім. М.І. Вавилова / За ред. М.В. Роїка.— К.: Логос, 2008.— Т.5.— С. 287–290.

9. Лукичева Л.А. Особенности клонального микроразмножения безвирусных сортов вишни и сливы // Сб. науч. трудов Никит. ботан. сада.— 1997.— Т.119.— С. 34–45.

10. Митрофанова О.В., Митрофанова И.В., Смыков А.В., Лесникова Н.П. Методы биотехнологии в селекции и размножении субтропических и косточковых плодовых культур // Сб. науч. тр. Никит. ботан. сада.— 1999.— Т.118.— С. 189–199.

11. Gamburg O.L., Eveleigh D.E. Culture methods and detection of glucanases in cultures of wheat and barley // Can. J. Biochem.— 1968.— V.46, №5.— P. 417–421.

12. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant.— 1962.— Vol.15, №3.— P. 473–497.

13. Quoirin M., Lepoivre Ph. Etude de milieux adaptés aux cultures *in vitro* de *Prunus* // Acta Hort.— 1977.— Vol.78.— P. 437–442.

14. Sauer A. *In vitro* — Vermehrung verschiedener genotypen von *Prunus avium* L. // Gartenbauwissenschaft.— 1983.— Bd.48.— S. 124–127.

15. Sedlbk J. *In vitro* shoot proliferation of sweet cherry cultivars Карельова and Rivan // HortScience.— 2008.— Vol.35, №3.— P. 95–98.

16. Tabachnik L., Kester D.E. Shoots culture for Almond and Almond-Peach hybrid clones *in vitro* // HortScience.— 1977.— Vol.12, №6.— P. 545–547.

Резюме

Разработаны биотехнологические приемы клонального микроразмножения 5 сортов черешни (Призерша, Рубиновая Ранняя, Сказка, Талисман, Анонс) с разными сроками созревания плодов. Установлено индуцирующее влияние трофических и гормональных факторов культивирования на регенерацию растений.

Розроблено біотехнологічні прийоми клонального мікророзмноження 5 сортів черешні (Призерка, Рубінова Раня, Сказка, Талісман, Анонс) з різними строками достгання плодів. Встановлено індукуючий вплив на регенерацію рослин трофічних та гормональних факторів культивування.

Biotechnological methods of clonal micropropagation of 5 sweet cherry cultivars (Prizersha, Rubinovaya Rannaya, Skazka, Talisman, Anons) with different periods of fruits ripening have been worked out. Induction influence of trophic and hormonal factors of cultivation on plant regeneration has been determined.

***КРАСНОВ М.С., *ЯМСКОВА В.П., *РЫБАКОВА Е.Ю., КУЛИКОВА О.Г.,
МАРГАСЮК Д.В., ЯМСКОВ И.А.**

** Учреждение Российской Академии Наук Институт биологии развития
им. Н.К. Кольцова РАН, Россия, 119334 Москва, ул. Вавилова, 26,
e-mail: embbrmsk@mail.ru*

*Учреждение Российской Академии Наук Институт элементоорганических
соединений им. А.Н. Несмеянова РАН, Россия, 119991 Москва, ул. Вавилова, 28*

АКТИВНЫЕ В СВЕРХМАЛЫХ ДОЗАХ БИОРЕГУЛЯТОРЫ, ВЫДЕЛЕННЫЕ ИЗ ПОДОРОЖНИКА И АЛОЭ, ОКАЗЫВАЮТ ПРОТЕКТОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ НА КОЖУ В СИСТЕМАХ *IN VITRO* И *IN VIVO*

Ранее в различных тканях животных нами были идентифицированы биорегуляторы (БР), проявляющие активность в сверхмалых дозах (СМД), соответствующих концентрациям 10^{-8} – 10^{-15} мг/мл. Для исследования БР данной группы был разработан экспериментальный подход, включающий получение тканевого экстракта, содержащего БР, методику очистки, а также метод биотестирования и экспериментальные модели для изучения специфической активности этих биорегуляторов [1–8]. В этих исследованиях было установлено, что БР локализованы во внеклеточном пространстве, а их активность характеризуется наличием тканевой, но отсутствием видовой специфичности. В СМД БР влияют на важнейшие биологические процессы — миграцию, адгезию, пролиферацию, дифференцировку клеток [3–8]. Результаты исследований показали, что данные БР характеризуются сходством ряда физико-химических свойств, а именно: низким значением (менее 10 кДа) молекулярной массы, устойчивостью к воздействию денатурирующих факторов, преобладанием β -структур во вторичной структуре, тенденцией к агрегации, результатом которой является образование наночастиц в водном растворе. Целью настоящей работы явилась идентификация в тканях растительноного происхождения БР данной группы и изучение их специфической активности. В качестве объектов исследования были выбраны лекарственные растения, широко применяемые в медицине, подорожник большой *Plantago major* и алоэ древовидное *Aloe arborescens*.

Материалы и методы

Выделение БР из растений проводили по методике, разработанной для биорегуляторов данной группы [2–8]. Тканевые экстракты получали из свежих листьев подорожника большого и алоэ древовидного, нарезанных на небольшие фрагменты, которые экстрагировали в растворе с pH 6,0, содержащем NH_4NO_3 $2,06 \cdot 10^{-2}$ моль/л; KNO_3 $1,88 \cdot 10^{-2}$ моль/л; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ $3 \cdot 10^{-3}$ моль/л; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $1,5 \cdot 10^{-3}$ моль/л; KH_2PO_4 $1,25 \cdot 10^{-3}$ моль/л, в течение 2-х часов при 4 °С. Далее, полученные экстракты дважды высаливали, добавляя сульфат аммония до образования насыщенного раствора. Фракции супернатантов разделяли либо методом изоэлектрофокусирования в градиенте плотности сахарозы (pH 3,5–10,0), либо с помощью ионообменной

ДЭАЭ-хроматографии, а также методом обращенно-фазовой ВЭЖХ (градиент ацетонитрил-вода). Исследование вторичной структуры БР проводили методом кругового дихроизма в УФ-области (195–260 нм) на КД-спектрометре “Jasco” 720 (Япония) при 20 °С в кварцевых кюветках с длиной оптического пути 1 мм. Размеры частиц в водных растворах БР определяли методом лазерного динамического светорассеивания. Исследование проводили методом динамического светорассеяния на приборе “PhotoCor Complex” (фирма “Фотокор”, Россия). Измерения проводили при интервале величин угла рассеивания 60–120° при 23 °С. Растворы, содержащие биорегулятор, предварительно очищали от пыли фильтрованием через мембраны “Dura-pore” с диаметром пор 0,45 мкм (“Millipore”).

Роллерное органическое культивирование in vitro проводили на взрослых половозрелых тритонах *Pleurodeles waltl* обоего пола, содержащихся в аквариальной ИБР РАН. После наркоза в 2% растворе этилуретана на физиологическом растворе для амфибий (0,65% NaCl) или 0,1% растворе MS-222 (Sigma, Германия), животных декапитировали, брали фрагменты кожи размером 5·5 мм с верхней части спины, которые помещали во флаконы для культивирования ткани. Среда для культивирования ткани кожи содержала: 70 мл среды 199, 10 мл эмбриональной сыворотки крови крупного рогатого скота, 30 мл кипячёной бидистиллированной воды, 200 мкл 4% сульфата гентамицина, проходила холодную стерилизацию через мембранные фильтры типа “CA” фирмы Nalgene, (США) с размером пор 0,2 мкм.

В опытных сериях культивирование проводили в среде (4 мл) с добавлением 40 мкл фракций растительных БР; в контрольной серии к 4 мл культуральной среды добавляли 40 мкл дистиллированной воды. Все флаконы закрывали в стерильных условиях, и далее культивировали, вращая в роллере при температуре 22 °С в течение 7 сут.

Экспериментальная модель кожной раны у мышей F1 (C57bl/CBA) in vivo. У каждого экспериментального животного под эфирным наркозом, на спине вырезали лоскут кожи, диаметром около 1 см. Обработка раны: 1) Контрольная группа мышей, которым наносили травму и не подвергали далее никакому воздействию; 2) опытная группа мышей, которым после нанесения травмы ежедневно наносили в область раны 100 мкл фракции БР алоэ; 3) опытная группа мышей, которым после нанесения травмы ежедневно наносили в область раны 100 мкл фракции БР подорожника. На 11 сутки после нанесения экспериментальной раны всех животных умерщвляли в атмосфере эфира, аккуратно вырезали ткань в области травмы и приготавливали поперечные парафиновые гистологические срезы толщиной 7 мкм. Фиксацию тканей проводили в растворе Буэна, срезы толщиной 7 мкм окрашивали гематоксилин-эозином по стандартной методике. Просмотр гистологических препаратов производили с помощью световой микроскопии на микроскопе фирмы Olympus (Япония).

Специфическую активность кислых БР, выделенных из алоэ и подорожника, изучали в концентрации 10^{-11} мг белка/мл.

Результаты и обсуждение

В процессе выделения и очистки БР растений были обнаружены во фракциях кислых белков ($\text{pH} < 3,5$), которые проявляли мембранотропную активность в сверхмалых дозах на клетках млекопитающих в условиях органного культивирования [9]. Было показано преобладание во вторичной структуре антипараллельных β -структур (30–40%) и статистического клубка (25–37%), в то время как содержание α -спиральных участков (5–9%) весьма незначительно. Данный характер вторичной структуры указывает на тенденцию БР к образованию межмолекулярных ассоциатов [9]. Методом динамического лазерного светорассеяния было установлено, что в водных растворах исследуемые растительные БР образуют наночастицы размерами 70–130 нм, причем эти значения достоверно не изменялись при уменьшении концентрации БР в растворе в 1,3 раза, в 0,9% растворе хлорида натрия и изменении pH от 5,5 до 7,0. С помощью методов иммуногистохимии было показано, что БР, выделенный из листьев подорожника, локализован в межклеточном пространстве ткани листа (рис. 1).

Таким образом, полученные данные указывают на сходство физико-химических свойств и биологической активности БР растительного происхождения со свойствами БР, идентифицированных в тканях животных [1–8].

На модели роллерного органного культивирования кожи тритона *Pleurodeles waltl* показано, что оба БР в СМД проявляют протекторное действие на ткань, которое после 7 суток культивирования выражалось в поддержании структуры кожи, сохранении покровного эпителия, сохранении функций желез по сравнению с контрольными культурами, в которых обнаруживались явные признаки протекания деструктивных процессов (рис. 2).

Наиболее выраженное протекторное действие изучаемых БР продемонстрировано на модели экспериментальной травмы кожи мыши *in vivo* (удаление на спине животного лоскута кожи площадью 1 cm^2). Через 11 суток после операции у всех экспериментальных животных наблюдали практически полную реэпителизацию раневой поверхности, незначительное воспаление в субэпидермальной зоне. У мышей контрольной группы (необработанная рана) происходило образование фиброзного рубца —

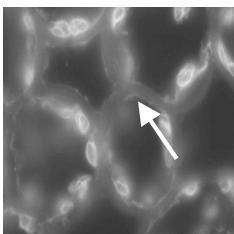


Рис. 1. Локализация биорегулятора подорожника в межклеточном пространстве листьев *Plantago major*. Показано стрелкой. Внутри клеток наблюдается неспецифическое свечение хлоропластов

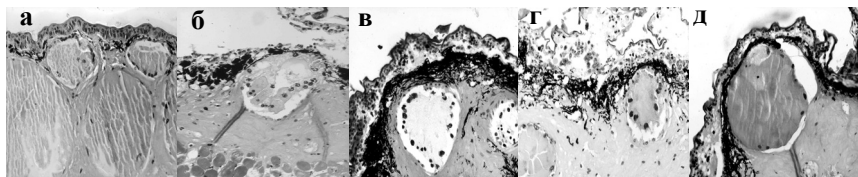


Рис. 2. Кожа тритона *Pleurodeles waltl*: а) — нативная, б) — роллерное культивирование в течение 7 суток (контроль), в) — роллерное культивирование в течение 7 суток с добавлением биорегулятора алоэ, г) — роллерное культивирование в течение 7 суток с добавлением биорегулятора подорожника, д) — роллерное культивирование в течение 7 суток с одновременным добавлением биорегуляторов алоэ и подорожника

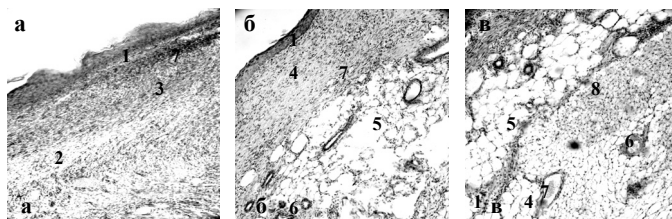


Рис. 3. Кожа мыши через 11 суток после нанесения экспериментальной травмы *in vivo*: а) — контроль; влияние БР алоэ (б) — БР подорожника (в) — на заживление экспериментальной кожной раны. 1 — эпителий, 2 — место протекания воспалительного процесса, 3 — рубцовая ткань, 4 — дерма, 5 — подкожная жировая ткань, 6 — протоки желез, 7 — кровеносный сосуд, 8 — бурый жир. (ув. x40, окрашивание гематоксилин-эозин)

отмечено параллельное эпидермису расположение коллагеновых волокон в виде плотных тяжей (рис. 3,а).

У мышей опытных серий (рану ежедневно обрабатывали, соответственно, растворами БР алоэ (рис. 3,б) и подорожника (рис. 3,в) наблюдали восстановление субэпидермальных слоев. Следует отметить комплексный характер репаративных процессов, протекающий при воздействии БР подорожника и алоэ, по сравнению с контролем. Наблюдали практически полное восстановление эпителия и дермы, в которой были отмечены кровеносные сосуды, особенно при воздействии БР подорожника. В дерме также наблюдали более рыхлое расположение волокон под воздействием растительных БР, чем в контроле, а под дермой наблюдалось интенсивное разрастание жировой ткани, причем при воздействии БР подорожника наблюдали образование мелких жировых клеток с гранулярным содержимым, напоминающих клетки бурого жира. Помимо этого, в подкожной жировой ткани под воздействием растительных БР восстанавливаются протоки желез. В контроле восстановления жировой ткани на месте повреждения не происходило, а также не было восстановления протоков желез.

Выводы

Полученные данные показывают, что БР, выделенные из подорожника и алоэ, в СМД стимулируют ранозаживление у мышей *in vivo*, способствуя восстановлению нормальной морфологии кожи, без образования рубцовой ткани, а также поддерживают нормальную морфологию ткани кожи тритона *in vitro*. В настоящем исследовании установлено, что специфическая активность БР, коррелирует с лекарственным действием растений, из которых они были выделены.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 10-04-00706-а.

Литература

1. Ямскова В.П., Резникова М.М. // Журн. общей биологии.— 1991.— Т.52, №2.— С. 181–191.
2. Ямсков И.А., Ямскова В.П., Даниленко и др. // Российский Химический Журн. (ЖРХО им. Д.И. Менделеева).— 1999.— Т.43, №5.— С. 34–39.
3. Krasnov M.S., Gurmizov E.P., Yamskova V.P. et al. (2007) // In Biochemical Physics Frontal Research, NY, Nova Science Publishers Inc.— 2007.— P. 28–37.
4. Borisenko A.V., Yamskova V.P., Krasnov M.S. et al // In Biochemical Physics Frontal Research, NY, Nova Science Publishers Inc.— 2007.— P. 38–48.
5. Margasyuk D.V., Krasnov M.S., Blagodatskikh I.V. et. al // In Biochemical Physics Frontal Research, NY, Nova Science Publishers Inc.— 2007.— P. 49–56.
6. Yamskova V.P., Rybakova E.Yu., Vecherkin V.V. et al // In Biochemical Physics Frontal Research, NY, Nova Science Publishers Inc.— 2007.— P. 57–70.
7. Yamskova V.P., Krasnov M.S., Rybakova E. Yu et al // In Biochemical Physics Frontal Research, NY, Nova Science Publishers Inc.— 2007.— P. 71–78.
8. Nazarova P.A., Yamskova V.P., Krasnov M.S. et al // In: New Trends in Biochemical Physics Research, NY, Nova Science Publishers Inc.— 2007.— P. 73–82.
9. Ross C.A., Poirier M.A. Protein aggregation and neurodegenerative disease // Nat. Med.— 2004.— 10 Suppl.— P. 10–17.

Резюме

Биорегуляторы, выделенные из подорожника и алоэ, в сверхмалых дозах стимулируют ранозаживление у мышей *in vivo*, способствуя восстановлению нормальной морфологии кожи, без образования рубцовой ткани, а также поддерживают нормальную морфологию ткани кожи тритона *in vitro*. В настоящем исследовании установлено, что специфическая активность биорегуляторов коррелирует с лекарственным действием растений, из которых они были выделены.

Биорегулятори, виділені з подорожника і алоє, в надмалих дозах стимулюють ранозаживлення у мишей *in vivo*, сприяючи відновленню нормальної морфології шкіри, без освіти рубцевої тканини, а також підтримують нормальну морфологію тканини шкіри тритона *in vitro*. У цьому дослідженні встановлено, що специфічна активність біорегуляторів корелює з лікарською дією рослин, з яких вони були виділені.

Bioregulators isolated from plantain and aloe in ultra low doses stimulate wound healing in mice *in vivo*, contributing to the restoration of normal morphology of the skin, without the formation of scar tissue, as well as maintain the normal morphology of the new skin tissue *in vitro*. In the present study found that the specific activity of bioregulators correlated with drug action of plants from which they were allocated.

КРУГЛОВА А.Е., КРУГЛОВА Н.Н.

*Институт биологии Уфимского НЦ РАН,
Россия, 450054, Уфа, пр. Октября, 69, e-mail: Kruglova@anrb.ru*

**МИКРОКЛОНАЛЬНОЕ РАЗМНОЖЕНИЕ *IN VITRO*
РЕДКИХ И НАХОДЯЩИХСЯ ПОД УГРОЗОЙ ИСЧЕЗНОВЕНИЯ
ВИДОВ РОДА *OXYTROPIS* ИЗ ФЛОРЫ ЮЖНОГО УРАЛА
КАК БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ СПОСОБ
ИХ СОХРАНЕНИЯ**

Сохранение редких и находящихся под угрозой исчезновения растений как составная часть сохранения биологического разнообразия — важнейшая научная проблема. Традиционными подходами к решению этой проблемы являются создание охраняемых территорий или заказников, интродукция растений в питомники ботанического сада, в том числе в целях их реинтродукции в естественные местообитания, а также создание банков семян.

Ещё один подход к решению данной проблемы, активно разрабатываемый в последние годы, — биотехнологический. При этом используются такие методы биотехнологии, как клональное микроразмножение, культура *in vitro* различных частей растений, формирование и развитие регенерантов из зародышеподобных структур — эмбриоидов [1–3, 6–9].

Биотехнологические методы культуры *in vitro* могут быть использованы и по отношению к сохранению редких и находящихся под угрозой исчезновения растений рода остролодочник *Oxytropis* (семейство бобовые Fabaceae Lindl.) из флоры Южного Урала.

Следует отметить, что такого рода исследования впервые проведены под руководством К.З. Гамбурга сотрудниками Сибирского института физиологии и биохимии растений СО РАН, разработавшими способ клонального микроразмножения остролодочника трехлисточкового *Oxytropis triphylla* Pall., эндемика западного побережья озера Байкал [4, 10].

Материал и методы

Объектом исследования послужили редкие и находящиеся под угрозой исчезновения растения флоры Южного Урала из семейства бобовые: эндемики Южного Урала остролодочник Гмелина *Oxytropis gmelinii* Fisch. ex Boriss. и остролодочник уральский *O. uralensis* (L.) DC., а также реликтовый вид Южного Урала остролодочник сходный *O. ambigua* (Pall.) DC., включенные в “Красную книгу Республики Башкортостан” [5].

Семена *Oxytropis gmelinii* собраны во время экспедиционных выездов (коллекторы А.А. Мулдашев и А.Х. Галеева) в Кугарчинском районе (склоны горы Маякташ), семена *Oxytropis uralensis* — в Учалинском районе (берега озера Аушкуль), семена *Oxytropis ambigua* — в Ишимбайском районе (склоны горы Тратау) Башкортостана.

За основу проведения экспериментальной части работ использовали метод клонального микроразмножения *in vitro* остролодочника трехлисточкового *Oxytropis triphylla*, изложенный в работе [10]. Для индукции

образования побегов у скарифицированных семян использовали среду MS [Murashige, Skoog, 1962] с половинной концентрацией солей. Для индукции микроразмножения проростков использовали среду MS с концентрацией бензиладенина (БА) в 1 мг/л, оказавшейся оптимальной для аналогичных исследований остролодочника трехлисточкового. Для индукции образования корней у проростков использовали среду MS с концентрацией индолил-3-уксусной кислоты (ИУК) в 1 мг/л, оказавшейся оптимальной для аналогичных исследований остролодочника трехлисточкового. Использовали 3-кратную повторность экспериментов.

Результаты и обсуждение

Скарифицированные семена всех трех изученных видов остролодочника прорастали на 4–5 сут культивирования *in vitro* в климатической камере в темноте. Их всхожесть составила 70% (остролодочник Гмелина), 80% (остролодочник уральский) и 95% (остролодочник сходный).

Полученные «пробирочные» растения в фазе развернутых семядолей переносили на среду для индукции микроразмножения и культивировали в климатической камере на свету в условиях имитации летнего дня (освещение 16 000 лк, 16 час/сут). Отмечены различия «пробирочных» растений изученных видов как по индукции микроразмножения, так и по индукции образования корней, независимо от продолжительности культивирования *in vitro*. При этом максимальные показатели отмечены у остролодочника сходного. По-видимому, использованная концентрация активных веществ-индукторов (БА и ИУК) в 1 мг/л оптимальна для проростков этого вида. Для проростков остальных видов остролодочника следует провести серию экспериментов по оптимизации концентрации БА и ИУК в средах для индукции микроразмножения и корнеобразования, соответственно. С другой стороны, максимальная всхожесть семян именно остролодочника сходного может свидетельствовать о повышенном качестве использованных семян этих растений, в отличие от использованных семян других изученных видов остролодочника.

Укоренившиеся клонированные растения переносили в небольшие сосуды с почвенной смесью. Вокруг растений поддерживали шадящие режимы освещения и влажности. Приживаемость растений через 7 сут проращивания в почвенной смеси составила 75%, независимо от видовой принадлежности.

Растения с хорошо развитой корневой системой переносили в открытый грунт научного стационара Института (Уфимский район). Через 7–10 сут приживаемость растений в открытом грунте составила 85–90%. В настоящее время ведутся наблюдения за прижившимися растениями.

Выводы

Принципиальный образец биотехнологии микрклонального размножения *in vitro* растений рода остролодочник позволяет получать растения-клоны этих редких и исчезающих растений из флоры Южного Урала для проведения работ по их сохранению в условиях интродукции, а в дальнейшем — для их реинтродукции в естественные местообитания.

Авторы выражают искреннюю благодарность д.б.н. К.З. Гамбургу (Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН) за ценные консультации.

Исследование поддержано программой “Ведущие научные школы РФ” (грант №НШ 2096.2008.4).

Литература

1. Актуальные проблемы прикладной генетики, селекции и биотехнологии растений / Сборник научных трудов Государственного Никитского ботанического сада УААН.— Ялта, 2009.— 245 с.

2. Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология / Тезисы докл. IX междунар. конф., г. Звенигород, 8–12 сентября 2008 г.— М., 2008.— 462 с.

3. Биотехнология как инструмент сохранения биоразнообразия растительного мира / Материалы II Всеросс. научно-практ. конф., г. Волгоград, 19–21 августа 2008 г.— Белгород, 2008.— 331 с.

4. Гамбург К.З., Юрьева О.В., Казановский С.Г. Использование клонального микроразмножения для сохранения редких и эндемичных видов, находящихся под угрозой исчезновения // Тезисы докл. IX междунар. конф. “Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология”, Звенигород, 8–12 сентября 2008 г.— М., 2008.— С. 86–87.

5. Красная книга Республики Башкортостан.— Т.1. Редкие и исчезающие виды высших сосудистых растений.— Уфа, 2001.— 208 с.

6. Круглова Н.Н. Эмбриодогения *in vitro* как способ сохранения биоразнообразия: к постановке проблемы // Тезисы докл. научно-практ. конф. “Проблемы сохранения биоразнообразия на Южном Урале”, Уфа, 13–14 мая 2004 г.— Уфа, 2004.— С. 21–22.

7. Круглова Н.Н. Основные этапы технологии получения растений *in vitro* и *ex vitro* для сохранения биоразнообразия // Тезисы докл. III Всеросс. конф. “Научные аспекты экологических проблем России”, Москва, 29–31 мая 2006 г.— М., 2006.— С. 25.

8. Круглова Н.Н. Эмбриологический подход к проблеме сохранения редких и исчезающих бобовых Южного Урала // Вестник Оренбургского государственного университета.— 2009.— Вып.6 (100).— С. 174–175.

9. Круглова Н.Н., Круглова А.Е. Эмбриодогения *in vitro* как способ сохранения разнообразия флоры // Материалы II Всеросс. научно-практ. конф. “Биотехнология как инструмент сохранения биоразнообразия растительного мира”, г. Волгоград, 19–21 августа 2008.— Белгород, 2008.— С. 13–15.

10. Юрьева О.В., Гамбург К.З., Казановский С.Г. Клональное микроразмножение *Oxytropis triphylla* (Fabaceae) // Растительные ресурсы.— 2008.— Вып.3.— С. 36–40.

Резюме

Разработан способ получения растений редких и находящихся под угрозой исчезновения видов рода *Oxytropis* из флоры Южного Урала в экспериментальных условиях *in vitro* путем формирования микроклонов.

The method of obtaining of plants of *Oxytropis* rare and disappearing species from South Ural flora in experimental *in vitro* conditions by the microclone formation was prepared.

КУЛИКОВА¹ О.Г., ЯМСКОВА² В.П., ИЛЬИНА¹ А.П., МАРГАСЮК¹ Д.В., ЯМСКОВ¹ И.А.

¹ Учреждение российской академии наук Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН, 119991, Москва, ул. Вавилова, 28, факс: (499)135-50-37, e-mail:koulikova_olga@mail.ru

² Учреждение российской академии наук Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, 119334, Москва, ул. Вавилова, 26, факс: (499)135-80-12

ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ БИОРЕГУЛЯТОРА, ВЫДЕЛЕННОГО ИЗ ЛУКА РЕПЧАТОГО *ALLIUM CEPA* L.

Ранее в различных тканях животных нами были обнаружены биорегуляторы, которые в сверхмалых дозах (СМД), соответствующих концентрациям 10^{-8} – 10^{-15} мг/мл, оказывают действие на такие процессы как клеточная миграция, адгезия, пролиферация и дифференцировка [1–8]. Биорегуляторы (БР) данной группы способствуют поддержанию структуры ткани, межклеточных адгезионных взаимодействий, жизнеспособности клеток в условиях *in vitro*, а также стимулируют восстановление и репарацию в патологически измененных тканях *in vivo* [9].

В настоящей работе предпринята попытка идентификации БР данной группы в луке репчатом *Allium cepa* L., который представляет собой травянистое растение семейства лилейных. Кроме широкого применения в качестве ценной пищевой культуры, лук репчатый используется как лекарственное растение: в нем содержатся эфирные масла, циклоаллин, метилаллин, тиопропионал, кемпферол, производные кверцетина, органические кислоты, углеводы (глюкоза, фруктоза, мальтоза), каротиноиды, аминокислоты, витамин С, различные микроэлементы и фитонциды. Препараты лука обладают противосклеротическим, сахароснижающим, антимикробным, мочегонным, желчегонным и ранозаживляющим действием [10]. Кроме того, в данной работе было изучено влияние БР, выделенного из лука, на рост и развитие семян нескольких овощных культур.

Материалы и методы

Все использованные химические реактивы были марки ХЧ. Была использована очищенная вода (16 Мом).

Для выделения биорегуляторов был использован лук репчатый (1,808 кг, плодовоовощная база поселка Кольчугино Владимирской области). Луковицы нарезают дольками размером 3–4 см, экстрагировали раствором ($2,06 \cdot 10^{-2}$ моль/л NH_4NO_3 , $1,88 \cdot 10^{-2}$ моль/л KNO_3 , $3 \cdot 10^{-3}$ моль/л $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $1,5 \cdot 10^{-3}$ моль/л $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $1,25 \cdot 10^{-3}$ моль/л KH_2PO_4) в течение суток при $+4^\circ\text{C}$. Полученный экстракт центрифугировали при 3000 г (Т 32А Janetzki, Германия).

Метод высаливания растительного экстракта. К охлажденному раствору растительного экстракта добавляли сухой серноокислый аммоний до образования насыщенного раствора соли ($+4^\circ\text{C}$, 100 ч). Центрифугированием отделяли надосадочную жидкость (супернатант), диализовали до полного удаления серноокислого аммония.

Исследование мембранотропной активности растительных биорегуляторов проводили на органных культурах печени мышей-гибридов F1 (C57BL/СВА, самцы весом 18–20 г), содержащихся в виварии ИБР РАН [1].

Определение концентрации белков в растворах определяли спектрофотометрически, измеряя оптическую плотность (D) исследуемых растворов при различных длинах волн в диапазоне 230–280 нм [11].

Хроматографическое разделение супернатанта экстракта лука проводили с использованием хроматографа высокого давления фирмы Millichrom и гидрофобной колонки Jupiter C₅ (2×150 мм). В качестве элюента использовали 0,1% трифторуксусная кислота — ацетонитрил от 0% до 100%, скорость потока 0,7 мл/мин. Детекция проводилась при длине волны 280 нм.

Масс-спектрометрический анализ методом MALDI-TOF молекулярной массы пептида проводили на время-пролетном масс-спектрометре Ultra-Flex 2 (Bruker Daltonic, Германия). Образцы для масс-спектрометрического анализа получали упариванием досуха, с последующим разведением в 70% ацетонитриле, содержащем 0,1% ТФУ. В качестве матрицы в работе использовали α-циано-4-гидроксицинамовую кислоту.

Методом динамического лазерного светорассеяния исследовали супернатант на приборе “PhotoCor Complex” (фирма “ФотоКор”, Россия) [12]. Измерения проводили при интервале величин угла рассеивания 60–120° при 23 °С. Исследуемый раствор предварительно очищали от пыли фильтрованием через мембраны “Dugapore” с диаметром пор 0,45 мкм (“Millipore”).

Аминокислотный анализ проводили на аминокислотном анализаторе Hitachi 835. Разделение осуществляли на хроматографической колонке с сульфополистирольными катионитами марки 2613, детекция — спектрофотометрическая, в нингидриновых производных (длина волны 570 и 440 нм). Перед анализом проводили гидролиз белка смесью 12 н HCl (конц.) трифторуксусная кислота (2:1) с добавлением 0,005% меркаптоэтанола в течение 1 часа при 155 °С.

Специфическую активность БР, выделенного из лука, изучали на модели проращивания семян в чашках Петри, оценивали всхожесть семян укропа, гороха и чеснока при обработке их раствором супернатанта экстракта лука, в концентрации соответствующей 10⁻¹³ мг белка/мл. В контрольной серии семена обрабатывали водой. Фиксировали количество проросших семян за определенный период времени, а также определяли длину и массу побега и корня каждого растения. Статистическую обработку результатов проводили согласно критерию Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Выделение и очистку растительного биорегулятора проводили по схеме, разработанной ранее для БР животного происхождения [1]. На первом этапе очистки биорегулятора было проведено фракционирование растительного экстракта с помощью метода высаливания сернокислым аммонием. При создании насыщенного раствора соли в растительном экстракте большое количество белков переходило в осадок. Фракции осадка и супернатанта,

после удаления ионов аммония, изучали методом биотестирования. Было показано, что мембранотропную активность в СМД проявляла только фракция супернатанта (рис. 1). Как и для БР животного происхождения, данная фракция характеризовалась наличием полимодальной дозовой зависимости данного типа активности. Методом динамического лазерного светорассеяния было показано, что в растворе супернатанта содержатся частицы размером от 100 ± 5 до $110\pm 1,2$ нм.

Обращенно-фазовой ВЭЖХ было установлено, что основным компонентом супернатанта экстракта лука является полипептид, гомогенность которого была доказана масс-спектрометрическим анализом (рис. 2).

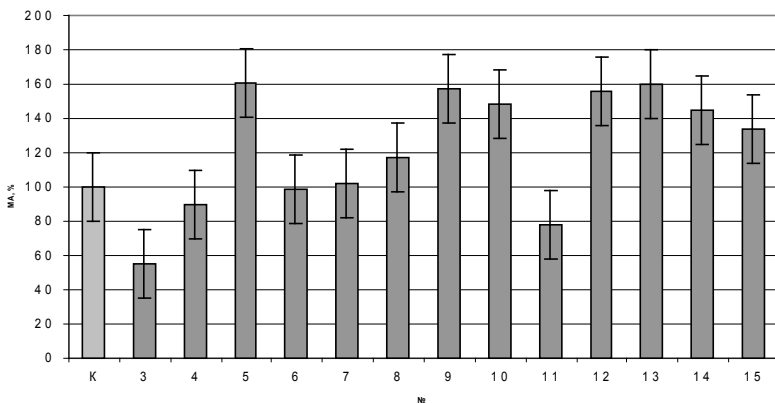


Рис. 1. Дозовая зависимость мембранотропной активности супернатанта экстракта лука. По оси абсцисс — степень 10-кратного последовательного разбавления исходного препарата; по оси ординат — мембранотропный эффект (МЭ) в %.; исходная концентрация белка в супернатанте 0,1 мг/мл

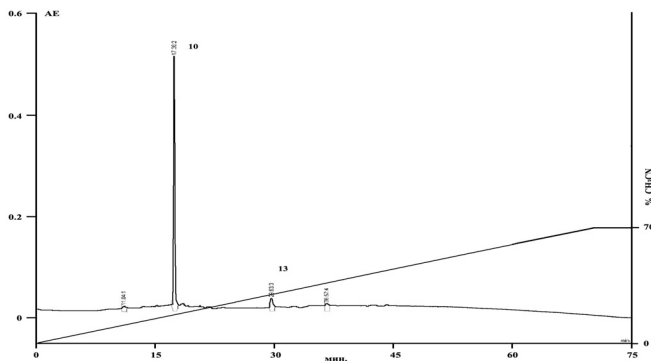


Рис. 2. Разделение супернатанта экстракта лука методом обращенно-фазовой ВЭЖХ в градиенте 0,1%-ный водный раствор ТФУ/ацетонитрил

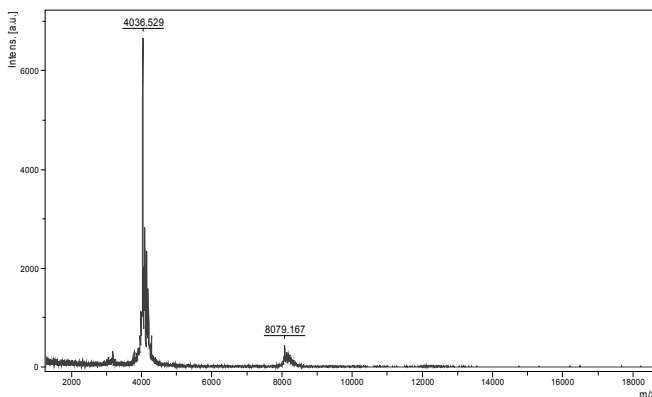


Рис. 3. MALDI-TOF масс-спектр супернатанта экстракта лука

Таблица

Аминокислотный состав супернатанта экстракта лука

Название	Asp	Thr	Ser	Glu	Pro	Gly	Ala	Val	Met
Число остатков	3	2	3	6	3	7	5	2	0
Название	Ile	Leu	Tyr	Phe	Lys	His	Arg	Всего	Мол. масса
Число остатков	1	3	2	1	2	1	2	44	4796

Согласно данным MALDI-TOF масс-спектрометрии молекулярная масса данного полипептида составляет 4036 ± 2 Да (рис. 3).

Аминокислотный анализ полученного полипептида показал содержание в образце 44-х остатков аминокислот (табл.).

Таким образом, применив экспериментальный подход, разработанный для БР животного происхождения, удалось идентифицировать в луке репчатом БР, который по своим физико-химическим свойствам сходен с БР данной группы.

Для изучения специфической активности данного БР нами была выбрана модель оценки всхожести и развития семян растений. Результаты эксперимента показали ингибирующее действие БР, входящего в состав супернатанта экстракта лука, на рост и развитие семян растений. Для эксперимента были выбраны семена овощных культур, которые несовместимы с луком [13]. При воздействии биорегулятора, выделенного из лука, всхожесть семян укропа, гороха и чеснока опытной серии по сравнению с контрольной уменьшилась на 10–30%. В случае семян укропа наблюдалось также уменьшение длины стебля и веса, соответственно, на 8 и 14%. БР, выделенный из лука, не оказывал влияние на изучаемые параметры при его действии на семена чеснока и гороха. Следует отметить, что полученные результаты совпадают с многочисленными данными, указывающими на отсутствие совместимости посадки лука с данными овощными культурами.

Выводы

Таким образом, в данном исследовании впервые показано присутствие в тканях лука репчатого *Allium cepa* L. биорегулятора белковой природы, основным компонентом которого является полипептид. Также было продемонстрировано ингибирующее действие данного биорегулятора на рост и развитие семян некоторых овощных культур.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №10-04-00706-а.

Литература

1. Ямскова В.П., Резникова М.М. // Журн. общей биологии.— 1991.— Т.52.— №2.— С. 181–191.
2. Ямсков И.А., Ямскова В.П., Даниленко и др. // Российский Химический Журн. (ЖРХО им. Д.И. Менделеева).— 1999.— Т.43.— №5.— С. 34–39.
3. Krasnov M.S., Gurmizov E.P., Yamskova V.P., Yamskov I.A. (2007) // In Biochemical Physics Frontal Research, NY, Nova Science Publishers Inc.— 2007.— P. 28–37.
4. Borisenko A.V., Yamskova V.P., Krasnov M.S. et al // In Biochemical Physics Frontal Research, NY, Nova Science Publishers Inc.— 2007.— P. 38–48.
5. Margasyuk D.V., Krasnov M.S., Blagodatskikh I.V. et. al // In Biochemical Physics Frontal Research, NY, Nova Science Publishers Inc.— 2007.— P. 49–56.
6. Yamskova V.P., Rybakova E.Yu., Vecherkin V.V. et al // In Biochemical Physics Frontal Research, NY, Nova Science Publishers Inc.— 2007.— P. 57–70.
7. Yamskova V.P., Krasnov M.S., Rybakova E.Yu et al // In Biochemical Physics Frontal Research, NY, Nova Science Publishers Inc.— 2007.— P. 71–78.
8. Nazarova P.A., Yamskova V.P., Krasnov M.S. et al // In New Trends in Biochemical Physics Research, NY, Nova Science Publishers Inc.— 2007.— P. 73–82.
9. Ямскова В.П., Краснов М.С., Ямсков И.А. Наноразмерные биорегуляторы тканей глаза млекопитающих как основа фармакологических препаратов нового поколения.— М.: МАКС Пресс.— 2009.— 84 с.
10. Мазнев Н.И. Большая энциклопедия здоровья. М.: АСТ.— 2008.— 896 с.
11. Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К. Справочник биохимика: Пер. с англ.— М.: Мир.— 1991.— 544 с.
12. Smith P.K., Krohn R.I., Hermanson G.T., Mallia A.K., Gartner F.H., Provenzano M.D., Fujimoto E.K., Goeke N.M., Olson B.J., Klenk D.C. Anal. Biochem., 150.— 1995.— P. 76–85.
13. Шумаков Н.Е. Приусадебный сад и огород. Полезные советы.— М. Советская Россия.— 1959.— 144 с.

Резюме

В луке репчатом обнаружен биорегулятор, по физико-химическим свойствам сходный с биорегуляторами данной группы животного происхождения. В сверхмалых дозах данный биорегулятор оказывал влияние на рост и развитие семян некоторых овощных культур.

It was shown that a bioregulator was detected in onion *Allium cepa* L. by chemical and physical properties similar to animal bioregulators of this group. At ultra low doses this bioregulators influenced the growth and development of certain vegetable crops.

У цибулі ріпчастої виявлено біорегулятор, за фізико-хімічними властивостями подібний до біорегулятора даної групи тваринного походження. У надмалих дозах даний біорегулятор чинив вплив на ріст і розвиток насіння деяких овочевих культур.

ЛЕСНИКОВА-СЕДОШЕНКО Н.П., МИТРОФАНОВА О.В., ГОРИНА В.М.
Никитский ботанический сад - Национальный научный центр,
Украина, 98648, АР Крым, г. Ялта, пгт. Никита, e-mail: in_vitro@ukr.net

СЕЛЕКЦИЯ *IN VITRO* АБРИКОСА, СЛИВЫ И АЛЫЧИ НА ИММУНИТЕТ К ВИРУСУ ШАРКИ (*PLUM POX VIRUS*)

Среди известных и вредоносных вирусов косточковых плодовых культур одним из самых опасных является *Plum pox virus* (PPV) (род *Potyvirus*, семейство *Potyviridae*), поражающий многие виды рода *Prunus* и распространенный в 38 странах мира [1, 10, 13]. Существующие методы борьбы с вирусом шарки мало эффективны из-за имеющихся активных переносчиков инфекции и естественного распространения в садах. Поэтому устойчивость косточковых плодовых культур к вирусу является одной из важнейших проблем селекции. В связи с этим в Никитском ботаническом саду — Национальном научном центре проводятся поиск и отбор устойчивых и толерантных сортов, а также исследования по созданию иммунных к PPV селекционных форм абрикоса, сливы и алычи с использованием биотехнологических и биохимических методов [4, 6]. Использование культуры органов и тканей в селекции *in vitro* для получения иммунных форм, особенно у представителей рода *Prunus* L., нуждается в детальном изучении.

Цель настоящей работы — выявить особенности культивирования изолированных завязей и зародышей абрикоса, сливы, алычи и разработать биотехнологические приемы получения иммунных гибридных форм к вирусу шарки.

Материалы и методы

Объектами исследования служили бутоны, завязи, зародыши разных стадий развития толерантных и бессимптомных сортов абрикоса (*Prunus armeniaca* L.): Крымский Амур, Крымский Медунец, Harcot, Stark Early Orange; сливы (*Prunus domestica* L.): Венгерка Юбилейная, Клеймен, Миратория, Монфор и алычи (*Prunus cerasifera* Ehrh.): Аштаракская 2, Румяная Зорька, Салгирская Румяная, отобранные на естественном инфекционном фоне и предварительно протестированные на отсутствие вируса шарки с применением системы Пиротест-ИФА [1, 8].

Получение асептической культуры бутонов и завязей осуществляли, используя 70% раствор этанола (C_2H_5OH) с экспозицией 30 с, 1,5–2% раствор гипохлорита натрия ($NaClO$) с экспозицией 6 мин и последующую четырехкратную промывку в стерильной дистиллированной воде. Стерилизацию косточек (эндокарпия) и изолирование зародышей *in vitro* проводили по общепринятой методике [2, 3, 5]. Стадию развития зародыша определяли визуально с помощью стереоскопического микроскопа МБС-10 по методике Поддубной-Арнольди [7]. Для культивирования бутонов, завязей и зародышей были использованы базовые питательные среды Murashige, Skoog (MS) [12], Quoirin, Lepoivre (QL) [14], Монье [11], White [15] в нашей модификации. Работы выполняли в асептических условиях ламинарного бокса Fat-

gan Lf (Чехия). Бутоны, отобранные в период обособления, помещали в условия пробирки, отделяя пыльники, которые переносили в стерильные бюксы и помещали в термостат на 8–10 часов при температуре 25 °С. После расстрескивания пыльников пыльцу наносили на рыльце пестика, а завязь продолжали культивировать.

Пробирки и колбы с эксплантами помещали в культуральную комнату со среднесуточной температурой 24 ± 1 °С, освещенностью 2–3 клк, фото-периодом 16 часов и относительной влажностью воздуха 70%. Культуральные сосуды с зародышами первоначально выставляли в холодильные камеры с низкими положительными температурами (5 ± 1 °С) и отсутствием освещения на 1,5–3 месяца, а затем переносили в культуральную комнату.

Каждый опыт проводили трижды в 15-кратной повторности.

Результаты и обсуждение

Первоначально исследования были направлены на подбор родительских пар для скрещивания абрикоса, алычи, сливы с учетом их устойчивости, толерантности и восприимчивости к вирусу шарки. Экспериментально проводилось тестирование донорного растительного материала на вирус шарки с применением комплексной системы диагностики [1].

Как показали исследования, важным фактором культивирования бутонов и завязей абрикоса, алычи и сливы являются питательные среды QL и MS, содержащие регуляторы роста (табл. 1) и борную кислоту (H_3BO_3) в ко-

Таблица 1

Регуляторы роста и их концентрации для индукции развития бутонов, завязей и недоразвитых зародышей абрикоса, алычи и сливы

Вариант опыта	Питательная среда	Концентрация регуляторов роста, мкМ		
		бутон	завязь	недоразвитый зародыш
Абрикос 4 комбинации скрещивания	QL	0,69 мкМ кинетина 0,29 мкМ ГК ₃	3,33 мкМ БАП 7,99 мкМ ИУК	—
	Монье	-	-	1,86 мкМ кинетина 1,44 мкМ ГК ₃ 0,14 мкМ НУК
Алыча 2 комбинации скрещивания	MS	0,69 мкМ кинетина 0,29 мкМ ГК ₃	3,25 мкМ кинетина 0,29 мкМ ГК ₃	-
	Монье	-	-	1,86 мкМ кинетина 1,44 мкМ ГК ₃ 0,14 мкМ НУК
Слива 2 комбинации скрещивания	MS	0,69 мкМ кинетина 0,29 мкМ ГК ₃	0,46 мкМ кинетина 0,29 мкМ ГК ₃	-
	Монье	-	-	1,86 мкМ кинетина 1,44 мкМ ГК ₃ 0,14 мкМ НУК

личестве 20–25 мг/л, тиамин 1,5 мг/л и сахарозу (60 г/л) и L-глутамин — 1–10 мг/л. Кроме этого, одним из факторов, способствующих успешному культивированию эксплантов, является гибберелловая кислота (ГК₃) (0,29 мкМ), позволяющая сохранить жизнеспособность завязей алычи, сливы до 1–1,5 мес и абрикоса — до 28 суток. Установлено, что через 7 сут после опыления *in situ* завязи алычи достаточно хорошо развивались на питательной среде MS, содержащей 3,25 мкМ кинетина для алычи и 0,46 мкМ кинетина для сливы, 0,29 мкМ ГК₃ и 60 г/л сахарозы (табл. 1). У некоторых завязей после опыления в условиях *in vitro*, спустя 2–2,5 мес были отмечены аномалии в развитии. При добавлении в питательную среду ГК₃ и кинетина увеличивалась жизнеспособность завязей сливы комбинации скрещивания Венгерка Юбилейная x Клеймен, что способствовало развитию зародыша и проростка (табл. 2, рис.). Субкультивирование эксплантов на свежеприготовленные питательные среды осуществляли через 20 сут. Сформированные зародыши переносили на питательные среды MS, QL, Монье и Уайта для получения проростков (табл. 2). Как известно, способность зародышей к формированию проростков в значительной степени определяется длительностью воздейст-

Таблица 2

Влияние питательных сред на развитие проростков в культуре завязей и недоразвитых зародышей абрикоса, алычи и сливы

Вариант опыта	К-во проростков, развившихся на питательных средах, %				
	QL + 3,33 мкМ БАП, 7,99 мкМ ИУК	MS + 3,25 мкМ кинетина, 0,29 мкМ ГК ₃	MS + 0,46 мкМ кинетина, 0,29 мкМ ГК ₃	Монье + 1,86 мкМ кинетина, 1,44 мкМ ГК ₃ , 0,14 мкМ НУК	Уайта + 1,86 мкМ кинетина, 1,44 мкМ ГК ₃ , 0,14 мкМ НУК
	завязь	завязь	завязь	зародыш	зародыш
<i>Абрикос</i> Крымский Амур x Narcot	1,7±0,2	-	-	68,5±1,2	26,4±2,1
Крымский Амур x Stark Early Orange	2,5±0,6	-	-	72,4±1,8	32,8±2,6
Крымский Медунец x Narcot	1,0±0,5	-	-	51,2±2,4	21,5±2,4
Крымский Медунец x Stark Early Orange	1,4±0,4	-	-	55,8±2,6	22,6±2,8
<i>Алыча</i> Салгирская Румяная x Аштаракская 2	-	2,5±0,8	-	50,8±1,9	18,4±1,2
Салгирская Румяная x Румяная Зорька	-	1,8±0,6	-	69,5±3,1	20,5±1,7
<i>Слива</i> Венгерка Юбилейная x Клеймен	-	-	1,0±0,4	5,0±0,8	0
Миратория x Монфор	-	-	0	-	-

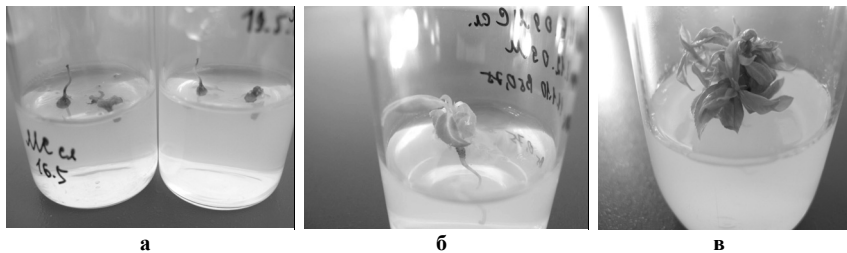


Рис. Развитие завязей (а), проростка (б) и формирование адвентивных микропобегов (в) сливы Венгерка Юбилейная х Клеймен

вия низких положительных температур (5 ± 1 °С) при отсутствии освещения [2]. Для абрикоса, алычи и сливы период холодовой предобработки зародышей составляет 1,5–3 мес, у ряда комбинаций скрещивания – 3–4 недели. При отсутствии холодовой предобработки в большинстве случаев наблюдали anomальное развитие проростков.

Выявлена зависимость индукции развития завязей и зародышей абрикоса, алычи, сливы от содержания и концентрации в питательной среде регуляторов роста, витаминов, а также от стадии развития зародыша и совместимости сортов при скрещивании (табл. 2).

У нормально сформированных зародышей абрикоса Крымский Амур х Нарcot, алычи Салгирская Румяная х Румяная Зорька наблюдали образование полноценных проростков. Несмотря на развитие корней, в ряде случаев у проростков происходило отмирание апикальной части, что характерно при скрещивании абрикоса Крымский Амур х Stark Early Orange (53%), Крымский Медунец х Нарcot (45%) и алычи Салгирская Румяная х Аштаракская 2 (37%). Проростки с отмершей апикальной частью помещали на питательные среды MS, QL и Gamborg, Eveleigh (B5) [9] для индукции развития адвентивных почек из базальной части, что позволило сохранить и размножить полученные гибридные формы.

Выводы

Таким образом, полученные положительные результаты показывают возможность создания новых гибридных форм абрикоса, сливы, алычи в условиях *in vitro* с участием в скрещивании толерантных сортов и подтверждают перспективность и необходимость продолжения исследований в данном направлении.

Полученные *in vitro* гибридные проростки будут высажены на адаптацию в условия *in vivo* для ретестирования с применением системы Пиротест-ИФА и проверки на искусственном инфекционном фоне с последующим выделением иммунных форм.

Работа выполнена в рамках проекта НААНУ 09.02/016.

Литература

1. Биотехнологические системы диагностики вируса шарки сливы (*Plum pox virus*) и отбора толерантных сортов косточковых плодовых культур / О.В. Мит-

рофанова, И.В. Митрофанова, С.Н. Чирков, В.Н. Ежов, Н.П. Лесникова-Седошенко // Актуальные проблемы прикладной генетики, селекции и биотехнологии растений: Сб. науч. трудов Никит. ботан. сада.— 2009.— Т.131.— С. 94–103.

2. *Здруйковская-Рихтер А.И.* Культура изолированных зародышей и некоторые другие приемы выращивания растений *in vitro*.— М.: ВАСХНИЛ, 1974.— 60 с.

3. *Здруйковская-Рихтер А.И.* Эмбриокультура изолированных зародышей, генеративных структур и получение новых форм растений.— Ялта: Крым-Фарм-Трейдинг, 2003.— 368 с.

4. Изучение вирусов и вирусных болезней косточковых плодовых культур на юге Украины и особенности оздоровления растений *in vitro* / О.В. Митрофанова, И.В. Митрофанова, В.Н. Ежов, Н.П. Лесникова-Седошенко, Л.А. Лукичева, А.В. Смыков, В.В. Сенин, Т.В. Литвинова // Бюлл. Никит. ботан. сада.— 2005.— Вып.91.— С. 111–120.

5. *Митрофанова О.В., Митрофанова И.В., Смыков А.В., Лесникова Н.П.* Методы биотехнологии в селекции и размножении субтропических и косточковых плодовых культур // Интенсификация селекции плодовых культур: Сб. науч. тр. ГНБС.— 1999.— Т.118.— С. 189–200.

6. *Митрофанова О.В., Лесникова-Седошенко Н.П., Ходаков Г.В.* Биотехнология в селекции и оздоровлении косточковых плодовых и субтропических культур // Фактори експериментальної еволюції організмів: Зб. наук. праць Укр. т-ва генетиків і селекціонерів ім. М.І. Вавилова.— Київ: Логос, 2006.— Т.3.— С. 619–624.

7. *Поддубная-Арнольди В.А.* Исследование зародышей у покрытосеменных растений в живом состоянии // Бюлл. ГБС.— 1952.— Т.14.— С. 3–12.

8. *Чирков С.Н., Приходько Ю.Н.* Пиротест — новый метод диагностики вируса шарки сливы // Промышленное производство оздоровленного посадочного материала плодовых, ягодных и цветочно-декоративных культур: Междунар. науч.-практ. конф.— 20–22 ноября 2001 г.— М.: ВСТИСП, 2001.— С. 71–72.

9. *Gamborg O.L., Eveleigh D.E.* Culture methods and deletion of glucanases in cultures of wheat and barley // Can. J. Biochem.— 1968.— V.46, N5.— P. 417–421.

10. Molecular identification of *Plum pox virus* isolates from Lithuania and Ukraine / T. Norkus, J. Staniulis, M. Zizyte, M. Melnyk, L. Yusko, H. Snihur, I. Budzanivska, V. Polischuk // Zemdirbyste-Agriculture.— 2008.— Vol.95, N3.— P. 277–285.

11. *Monnier M.* Croissance et développement des embryons globulaires de *Capsella bursa-pastoris* cultivés *in vitro* dans un milieu à la base d'une nouvelle solution mineral // Bull. Soc. Bot. France, Memoires, Coll. Morphologie.— 1973.— P. 179–194.

12. *Murashige T., Skoog F.* A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant.— 1962.— Vol.15, N3.— P. 473–497.

13. *Plum pox virus* and the estimated costs associated with sharka disease / Cambra M., Capote N., Myrta A., Llacer G. // Bulletin OEPP/EPPO Bulletin.— 2006.— 36.— P. 202–204.

14. *Quoirin M., Lepoivre P.* Etude de milieux adaptes aux cultures *in vitro* de Prunus // Acta Hort.— 1977.— Vol.78.— P. 437–442.

15. *White P.R.* Handbook of plant tissue culture.— Jaques Cattel Press, 1943.— Vol.4.— P. 791–794.

Резюме

Изучение влияния различных факторов культивирования позволило получить гибридные проростки из завязей и зародышей абрикоса, сливы, алычи и разработать биотехнологические приемы создания новых селекционных форм садовых растений.

Вивчення впливу різних факторів культивування дозволило отримати гібридні проростки з зав'язей і зародків абрикоса, сливи, аличі та розробити біотехнологічні прийоми створення нових селекційних форм садових рослин.

The studying of influence of different factors of cultivation allowed to obtain the hybrid germs from ovaries and embryos of apricot, cherry-plum, plum and to work out the biotechnological methods of obtaining new selection forms of horticultural plants.

МАЛЬЦЕВ Д.И.¹, ЯМСКОВА В.П.², ИЛЬИНА А.П.¹, МАРГАСЮК Д.В.¹, ЯМСКОВ И.А.¹.

¹Учреждение Российской Академии Наук Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН, Россия, 119991 Москва, ул. Вавилова, 28, e-mail: mal-dima@yandex.ru

²Учреждение Российской Академии Наук Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Россия, 119334 Москва, ул. Вавилова, 26

ИССЛЕДОВАНИЕ БИОРЕГУЛЯТОРОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ТКАНИ ПЕЧЕНИ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Впервые биорегуляторы данной группы были обнаружены в печени млекопитающих как адгезивные белки [1]. Впоследствии присутствие этих белков было показано для многих тканей позвоночных животных [2–8]. На основании сходства их физико-химических свойств и характера биологической активности они были выделены в отдельную группу. Активность биорегуляторов характеризуется отсутствием видовой, но проявлением тканевой специфичности [5–9]. Показано, что в основе протекторного действия и ранозаживляющих свойств биорегуляторов лежит их способность активировать клеточные источники регенерации в тканях [5]. Биорегуляторы данной группы представляют собой сложные ассоциаты белков, углеводов, липидов, весьма устойчивые к воздействию ряда физико-химических факторов [4–10]. Важнейшим свойством биорегуляторов является их способность присутствовать в водных растворах в виде частиц размером 100–200 нм и проявлять свою активность в сверхмалых дозах (СМД), соответствующих 10^{-8} – 10^{-15} мг белка/мл [3].

В настоящей работе было проведено сравнительное исследование биорегуляторов, выделенных из печени крыс и печени быка. С помощью метода MALDI-TOF масс-спектрометрии был изучен состав пептидов, входящих в их состав. На модели роллерного органотипического культивирования печени тритона *in vitro* было изучено протекторное действие данных биорегуляторов.

Материалы и методы

Экстракты получали по методике, ранее разработанной для биорегуляторов данной группы [2, 4]. Количественное определение белка в исследуе-

мых фракциях осуществляли с помощью колориметрического метода с использованием бидинхонината меди при 562 нм. Во время очистки во всех фракциях идентифицировали биорегуляторы с помощью адгезиометрического метода, в основе которого лежит определение их мембранотропной активности [2, 4]. Анализ молекулярной массы пептидов проводили методом MALDI-TOF на времяпролетном масс-спектрометре Ultra Flex 2 (Bruker Daltonic, Германия). Времяпролетные масс-спектры фиксировали в линейном режиме и режиме рефлектора. Образцы для масс-спектрометрического анализа получали упариванием досуха, с последующим разведением в 70% ацетонитриле, содержащем 0,1% ТФУ. В качестве матрицы в работе использовали а-циано-4-гидроксицианомовую кислоту. состояние ткани печени тритона при роллерном органотипическом культивировании *in vitro*.

Результаты и обсуждение

Для выделения и очистки биорегуляторов был использован экспериментальный подход, разработанный для биорегуляторов данной группы [4]. Этот метод включает выделение биорегуляторов из ткани в определенных условиях, которые заключаются в экстракции физиологическим раствором ткани, неповрежденной ферментативной и механическим воздействиями. Ранее предполагалось, что экстракция биорегуляторов является следствием их секреции клетками печени [5–10]. Получение биорегуляторов данной группы из замороженной ткани печени быка указывает на то, что биорегуляторы присутствуют в ткани, очевидно, в межклеточном пространстве, из которого “вымываются” в экстрагирующий раствор.

Исследование мембранотропной активности экстрактов печени крысы и быка показало, что оба экстракта проявляют этот тип активности, характерный для биорегуляторов данной группы [4]. В качестве примера на рис. 1 представлена диаграмма, отражающая полимодальную дозовую зависимость мембранотропной активности экстракта печени быка.

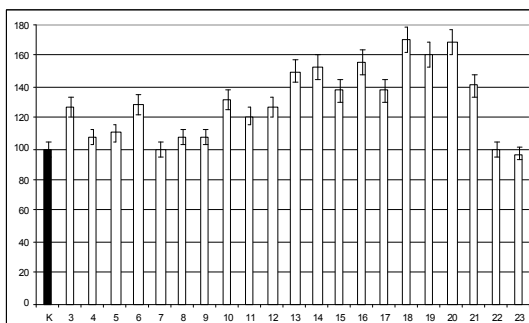


Рис. 1. Мембранотропная активность экстракта печени быка.

По абсциссе — показатель степени последовательного 10-кратного разбавления исходного препарата; по ординате — значение показателя, отражающего мембранотропную активность

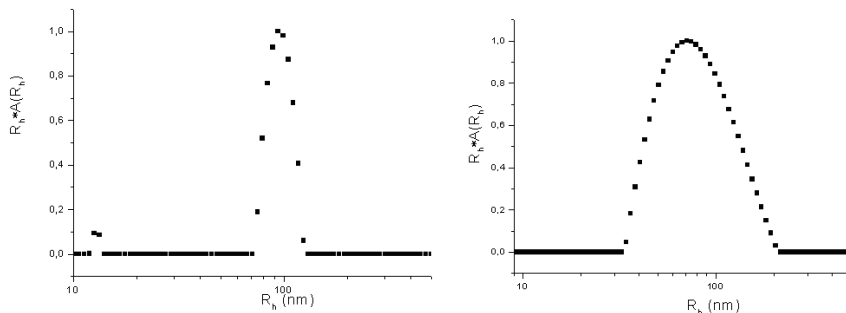


Рис. 2. Распределение частиц по гидродинамическому радиусу (метод лазерного динамического светорассеивания):

A — в растворе супернатанта экстракта печени крысы; *б* — в растворе супернатанта экстракта печени быка. По абсциссе — средний гидродинамический радиус частиц; по ординате — количество частиц с соответствующим радиусом

При высаливании тканевых экстрактов сернокислым аммонием происходит значительная очистка биорегуляторов: примесные белки переходят в осадок, а биорегуляторы остаются в растворенном состоянии [2, 4]. Действительно, осадки экстрактов печени не обладали активностью, а супернатанты экстрактов проявляли ее в СМД. Исследование супернатантов экстрактов методом динамического лазерного светорассеивания, показало, что в них присутствуют частицы, средний гидродинамический радиус которых составлял 70–150 нм. Распределение этих частиц в обеих фракциях супернатантов было унимодальным. На рис. 2 представлены кривые распределения по размеру частиц, присутствующих в супернатантах печени крысы и быка. Эти данные совпадают с результатами исследования биорегуляторов, выделенных из других тканей млекопитающих, и показывают, что на данной стадии очистки биорегуляторы печени присутствуют в виде наноразмерных частиц [5–10].

При исследовании методом MALDI-TOF масс-спектрометрии в фракции супернатанта, выделенного из экстракта печени крысы, были идентифицированы пептиды с мол. массой 3648 и 5024±2 Да, а из печени быка — 2112, 2170, 2866, 2940, 3009, 3151, 5026, 5237±2 Да. В этом аспекте обращает внимание присутствие в обоих супернатантах пептида с мол. массой 5026±2 Да. Можно предположить, что именно этот пептид входит в состав биорегуляторов печени млекопитающих двух видов, и что он отвечает за тканеспецифическую активность биорегуляторов печени. Действительно, на модели роллерного органотипического культивирования печени тритона *in vitro*, разработанной для изучения специфической активности биорегуляторов, выделенных из ткани печени млекопитающих [7], было показано, что оба супернатанта оказывают практически одинаковое выраженное протекторное действие на состояние культуры тритона.

На рис. 3 представлены гистологические срезы интактной печени тритона, а также ткани после 3-х дневного роллерного культивирования. Как

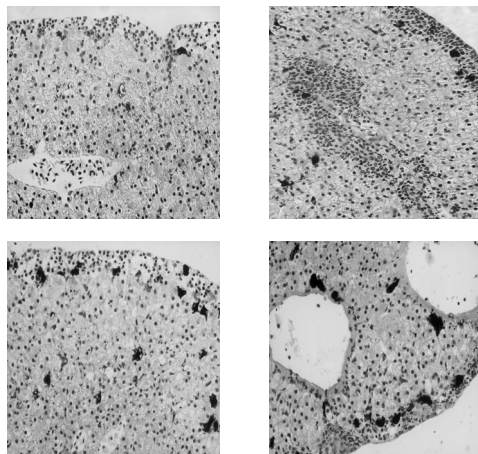


Рис. 3. Гистологические срезы печени тритона:

a — интактная печень тритона; *б* — после 3-х дневного органотипического роллерного культивирования, без добавления биорегуляторов (контроль); *в* — после 3-х дневного органотипического роллерного культивирования, при добавлении супернатанта экстракта печени быка; *г* — после 3-х дневного органотипического роллерного культивирования, при добавлении супернатанта экстракта печени крысы

видно, после культивирования в ткани печени наблюдаются процессы деградации: часть паренхиматозных клеток находится в состоянии апоптоза, нарушаются адгезионные и контактные межклеточные взаимодействия, нарушаются процессы кроветворения.

Следует отметить сохранение структуры ткани печени и кроветворных клеток при действии в СМД обоих супернатантов по сравнению с культурами контрольной серии: сохраняется балочное строение ткани печени и кроветворение в субкапсулярной области и вокруг сосудов, поддерживаются адгезионные, контактные взаимодействия между клетками, а также их жизнеспособность, то есть состояние ткани наиболее приближается к состоянию интактной печени тритона.

Кроме того при добавлении в СМД супернатантов печени быка и крысы было выявлено статистически достоверное увеличение приблизительно на 50% площади, занимаемой меланомacroфагами в ткани печени тритона, по сравнению с культурами контрольной серии ($p < 0,05$), а также по сравнению с интактной печенью тритона, в которой площадь, занимаемая пигментированными клетками соответствовала $2,9 \pm 0,4\%$ от общей площади среза ($p < 0,05$). Различия в биологическом действии обоих супернатантов не было обнаружено ($p > 0,5$) (табл.).

Последнее можно ценить как стимулирование в печени тритона защитной функции ткани, которая развивается в ответ на повреждающие условия культивирования.

Площадь пигментированных клеток в печени тритона при роллерном культивировании

Исследованная фракция	Площадь, занимаемая пигментированными клетками в % от общей площади среза
Контроль (физ. раствор)	2,54±0,23
Супернатант экстракта печени крысы	4,27±0,46
Супернатант экстракта печени быка	3,8±0,33

Из литературных источников известно, что у хвостатых амфибий при неблагоприятных условиях (изменение температуры, интоксикация, гипоксемия и др.) меланомакрофаги печени, являющиеся аналогами клеток Купфера млекопитающих, способны образовывать крупные скопления [11]. Эти клетки располагаются как в кортикальном слое, так и в паренхиме печени, часто по периферии сосудов и в лимфатических щелях, в основном, в виде скопления темно-бурого или черного цвета, окруженных соединительнотканными клетками, идентичными кортикальным. Основной функцией меланомакрофагов печени амфибий, как и купферовских клеток у млекопитающих, является фагоцитоз различных бактерий, вирусных частиц, клеточного детрита и другие частицы размером до 10 нм, а также осуществление процессов детоксикации организма [11–14]. При неблагоприятных условиях внешней среды, а также при интоксикации организма у амфибий в печени увеличивается площадь кластеров меланомакрофагов [11]. Поэтому экспериментально установленный факт влияния биорегуляторов, выделенных из печени млекопитающих двух видов, на площадь пигментированных клеток в печени тритона еще раз подтверждает гепатопротекторное действие этих эндогенных веществ.

Литература

1. Ямскова В.П., Модянова Е.А., Резникова М.М., Маленков А.Г. // Молекул. биология.— 1977.— Т.11.— №5.— С. 1147–1154.
2. Ямскова В.П., Резникова М.М. // Журн. общей биологии.— 1991.— Т.52.— №2.— С. 181–191.
3. Ямскова В.П., Скрипникова В.С., Краснов М.С., Ямсков И.А. // Биохимия.— 2009.— Т.74.— №9.— С. 1195–1203.
4. Ямсков И.А., Ямскова В.П., Даниленко А.Н. и др. // Рос. Хим. Журн.— 1999.— Т.43, №5.— С. 34–39.
5. Margasyuk, D.V., Krasnov, M.S., Blagodatskikh, I.V. et al // In: New Trends in Biochemical Physics Research, NY, Nova Science Publishers Inc.— 2007.— P. 47–59.
6. Krasnov M.S., Gurmizov E.P., Yamskova V.P., Yamskov I.A. (2007) // In Biochemical Physics Frontal Research, NY, Nova Science Publishers Inc.— 2007.— P. 28–37.
7. Borisenko, A.V., Yamskova, V.P., Krasnov, M.S et al . et al // In: New Trends in Biochemical Physics Research, NY, Nova Science Publishers Inc.— 2007.— P. 35–46.
8. Yamskova, V.P., Krasnov, M.S., Rybakova, E.Yu., Vecherkin., et al // In: New Trends in Biochemical Physics Research, NY, Nova Science Publishers Inc.— 2007.— P. 71–78.

9. Nazarova P.A., Yamskova V.P., Krasnov M.S. et al // In: New Trends in Biochemical Physics Research, NY, Nova Science Publishers Inc.— 2007.— P. 73–82.

10. Yamskova V.P., Rybakova E.Yu., Vecherkin V.V. et al // In Biochemical Physics Frontal Research.— NY, Nova Science Publishers Inc.— 2007.— P. 57–70.

11. Sichel G., Scalia M., Corsaro C. // Microsc. Res. Tech.— 2002.— V.57.— P. 477–490.

12. Cicero R, Sciuto S, Chillemi R, Sichel G. // Comp Biochem Physiol.— 1982.— V.73A.— P. 477–479.

13. Corsaro C., Scalia M., Blanco A.R., et al // Pigment. Cell Res.— 1995.— V.8.— P. 279–282.

14. Corsaro C., Scalia M., Leotta N., et al // J. Anat.— 2000.— V.196.— P. 249–261.

Резюме

Показано, что биорегуляторы, выделенные из печени быка и крысы, оказывают в сверхмалых дозах гепатопротекторное действие на экспериментальной модели роллерной органоспецифической культуры печени тритона *Pleurodeles waltl*. В состав данных биорегуляторов входит пептид с молекулярной массой 5026±2 Да, ответственный за их тканеспецифическую активность.

It was shown that bioregulators isolated from bovine and rat livers, hepatoprotective effect at ultra low doses on the experimental model roller organotypic liver culture of newt *Pleurodeles waltl*. There is a peptide with molecular weight of 5026±2 Da, responsible for tissue-specific activity of bioregulators in their composition.

Показано, що біорегулятори, виділені з печінки быка і пацюка, мають у надмалих дозах гепатопротекторну дію на експериментальній роллерній моделі органоспецифічної культури печінки тритона *Pleurodeles waltl*. До складу даних біорегуляторів входить пептид з молекулярною масою 5026±2 Да, відповідальний за їх тканинспецифічну активність.

**МАТВЕЕВА А.Ю.¹, КОРЖ Л.П.¹, ХРИСТАН О.О.¹, МОРГУН Б.В.²,
ТИЩЕНКО Е.Н.¹**

¹Институт физиологии растений и генетики НАН Украины

Украина, 03022, Киев, ул. Васильковская, 31/17, e-mail: oltuko@gmail.com

²Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины

Украина, 03143, Киев, ул. Заболотного, 148

АНАЛИЗ КОМПЕТЕНЦИИ К AGROBACTERIUM-ОПОСРЕДОВАННОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ МОРФОГЕННОГО КАЛЛУСА ИНБРЕДНЫХ ЛИНИЙ КУКУРУЗЫ

Для кукурузы (*Zea mays* L.) предложен ряд способов генетического улучшения этой культуры современными биотехнологиями [1–5], которые показали, что при разработке системы методов *Agrobacterium*-опосредованной трансформации в качестве экспланта целесообразно использовать незрелые зародыши или апикальные меристемы побега. Несмотря на то,

что и другие ткани (в частности, мезокотилля) могут подвергаться агробактериальной инфекции, предпочтение имеют экспланты, с использованием которых максимально может реализовываться морфогенетический потенциал и в конечном итоге могут быть получены трансгенные растения-регенеранты. К их числу в первую очередь относятся незрелые зародыши. Однако способность к образованию из них эмбрионного каллуса присуща далеко не всем инбредным линиям кукурузы, что существенно ограничивает возможности генетической трансформации. Поэтому заслуживают внимание ряд эффективных протоколов регенерации *de novo* кукурузы, где как эксплант используются сегменты побега, содержащие меристематические ткани [2, 3].

При *Agrobacterium*-опосредованной трансформации критическим этапом является перенос Т-ДНК в тотипотентные клетки растений. Одной из проблем, связанной с этим процессом, является значительное снижение или даже потеря морфогенетического потенциала, а также гибель клеток морфогенного каллуса. В связи с этим цель данной работы состояла в анализе морфогенетического потенциала и компетентности к агробактериальной инфекции каллуса инбредных линий кукурузы при разных условиях их инокуляции агробактерией.

Материалы и методы

Для получения морфогенного каллуса использовали сегменты побегов 5–7-дневных проростков инбредных линий кукурузы селекции ИФРГ НАН Украины — Л390, 1551, 1552, 1553, 1554, 1555, 1556, 1557, 1558, 1560, 1561, 1563, 1564, 1565, 1568, 1569, 1570, 1572, 1589, 1835, 1839, 1862, 1890, 1675, 1677, 2083. Стерилизацию зрелых зерновок проводили путём последовательной обработки этанолом 70% в течение 5 минут, затем промывали стерильной дистиллированной водой и помещали на 30 минут в 5% раствор коммерческого отбеливателя, трижды промывали стерильной дистиллированной водой. Зрелые зерновки проращивали в чашках Петри (100·15 мм) на разных питательных средах [3, 7] при 16-часовом фотопериоде, 25–27 °С. В качестве эксплантов использовали узелковый сегмент побега (УСП), в котором содержится и меристематическая зона. Данный сегмент разрезали вдоль и помещали раневой поверхностью на MSW среду согласно Сидорову с соавт. [3]. Для индукции морфогенного каллуса анализировали питательные среды на основе МС-среды, варьируя различными сочетаниями гидролизата казеина, мезоинозита, 2,4-Д, БАП, кинетина, аспарагина, ИУК, НУК, ИМК. Эти среды содержали 2% сахарозы, 0,5% агара, рН 5,8–6,1 до автоклавирования.

Инокуляцию ночной культурой агробактерии (среда LB) проводили 1 и 2 часа (оптическая плотность при 1 660 нм составляла 0,4 и 0,8 О.Е.), с и без ультразвуковой обработки (5 с при 22 кГц на ультразвуковом диспергаторе УЗДН-1 У4.2, Россия). Исследования проводили используя морфогенный каллус полученный от эксплантов — продольно разрезанных УСП, культивируемых на упомянутой выше MSW-среде [3]. *Agrobacterium*-опосредованную трансформацию каллуса осуществляли штаммом *LBA* 4404,

содержащим вектор с геном *nptII*. Для селекции использовали 50 мкг/мл канамицина, в присутствии 500 мкг/мл цефотаксима. Интродукцию Т-ДНК в геном кукурузы определяли по наличию гена *nptII* методом ПЦР с использованием праймеров *kanpr2* (5'-CCT GAA TGA ACT CCA GGA GGA GGC A-3') и *kanpr6* (5'-GCT CTA GAT CCA GAG TCC CGC TCA GAA G-3'), где размер амплифицированного фрагмента составляет 649 п.н. ДНК выделяли согласно модифицированному нами методу Деллапорта [8]. Состав реакционной смеси был: 0,2 мМ 10×ПЦР буфер; дНТФ, по 0,2 мМ; праймеры по 0,25 мМ; *Taq*-полимераза 1 од.; концентрация ДНК составляла 10 нг/мкл. Амплификацию фрагментов ДНК проводили на термоциклере Mastercycler Personal 5332 (Eppendorf), используя следующий режим: первая денатурация 94 °С, 4 мин, заключительная элонгация 10 мин, 72 °С; 35 циклов: денатурация при 94 °С 30 с; отжиг праймеров при 53 °С, 1 мин; элонгация 72 °С, 22 с. Для того, чтобы проверить чистоту материала, проводили ПЦР-анализ на наличие генов агробактерии *virD1*. Продукты амплификации анализировали в 1,2%-ном агарозном геле при 3–4 В/см в течение 45 мин в буфере 1хТБЕ [9].

Результаты и обсуждение

Из узелкового сегмента побега 5–7-дневных проростков инбредных линий кукурузы формировался морфогенный и неморфогенный каллус. При этом первый из них мог индуцироваться и развиваться отдельно, одновременно с неморфогенным, а также параллельно с прорастанием. Неморфогенная каллусная ткань была серо-желтого цвета, рыхлая, при этом наблюдалось образование корней, однако индукции побегообразования не происходило. Морфогенный каллус отличался тем, что был светло-желтого цвета, плотной консистенции, характеризовался глобулярным строением. В результате проведенной работы была показана генотипическая зависимость индукции морфогенного каллуса из узелкового сегмента побега, где высокая частота его образования была присуща только нескольким линиям кукурузы.

Морфогенный каллус при использовании в качестве экспланта продольно расщепленной узелковой области проростка был получен для инбредной линии Л390. Индукцию каллуса и его культивирование осуществляли на MSW- и MS3-среде [3], тогда как для регенерации использовали другие модификации MS-среды [3, 10].

Известно, что на процесс *Agrobacterium*-опосредованной трансформации могут оказывать влияние ряд факторов, в том числе условия инокуляции, кокультивирования, тип экспланта. В связи с чем анализировали ответную реакцию морфогенного каллуса, полученного от продольно расщепленного УСП указанной линии, на агробактериальную инфекцию при разных условиях его инокуляции. Интродукцию Т-ДНК в геном кукурузы анализировали методом ПЦР.

Учитывая, что в стандартных экспериментах по *Agrobacterium*-опосредованной трансформации кукурузы рекомендованы концентрации агробактерии (0,2–1,0)×10⁹ клеток/мл [1], были использованы две различающиеся

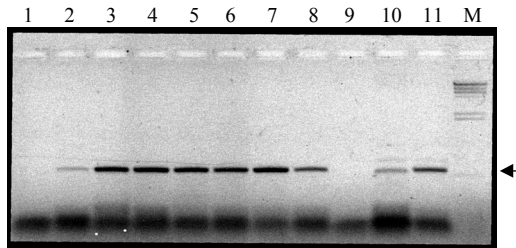


Рис. Электрофореграмма продуктов амплификации ДНК морфогенного каллуса кукурузы линии Л390 с использованием праймеров к селективному гену *nr1II* при разных условиях инокуляции штаммом *LBA 4404*, содержащим вектор с данным геном (2 – 8):

время инокуляции 1 час — без (2) и с (3) обработкой ультразвуком при 0,8 О.Е.; без (4) и с (5) обработкой ультразвуком при 0,4 О.Е.; время инокуляции 2 часа — без (6) и с (7) обработкой ультразвуком при 0,8 О.Е.; с (8) обработкой ультразвуком при 0,4 О.Е. 1 — нетрансформированный каллус-контроль, 9 — негативный контроль, 10, 11 — контроль: листья трансгенных растений-регенерантов подсолнечника, 12 — маркер молекулярных масс — ДНК бактериофага λ , гидролизованная *Hind III*.

Стрелкой показано амплификацию ожидаемого фрагмента длиной 649 п.о.

в 2 раза концентрации, значения которых соответствуют указанной области. Другой момент касается продолжительности инокуляции, где также термин обработки варьировал в два раза. Для повышения частоты переноса Т-ДНК в клетки растений, в том числе и кукурузы, применяли метод SAAT (Sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation), который заключается в кратковременной обработке растительных тканей ультразвуком в присутствии агробактерии [11]. Считается, что позитивный эффект этого метода — результат образования значительного количества репарируемых микропоранений на поверхности растительных тканей, что увеличивает колонизацию агробактерий и компетентность эксплантатов к их инфекции. В связи с чем анализировали целесообразность использования ультразвука в указанных выше условиях обработки.

Для определения селективной концентрации канамицина каллус высаживали на MSW-среду с концентрацией антибиотика (мкг/мл): 25, 50, 100, 150, 200 и выдерживали по 2 недели 3 пассажа. При концентрациях выше 25 мкг/мл наблюдалось заметное угнетение (прекращение) роста каллуса и его некроз при дальнейшем культивировании, что и определило выбор минимальной концентрации селективного агента — 50 мкг/мл.

На рис. представлены результаты ПЦР-анализа ДНК морфогенного каллуса линии Л390 на присутствие гена *nr1II*.

Данные молекулярно-генетического анализа свидетельствуют, что независимо от варьирования условий инокуляции агробактерией, Т-ДНК переносится в клетки каллуса и способна интродуцировать в геном кукурузы. Результаты ПЦР-анализа показали (данные не приведены), что после элиминации

агробактерии цефотаксимом примесь *virD1*-генов этого патогена в суммарной ДНК каллуса отсутствует. Это говорит об адекватности анализированных условий для *Agrobacterium*-опосредованной трансформации.

Вместе с тем, морфогенный каллус после трансформации прекращал свой рост, темнел, со временем наблюдался его некроз, то есть анализируемый каллус терял способность к реализации морфогенетического потенциала. Это позволяет предположить, что происходит гибель клеток, возможно путём программированной клеточной гибели, поскольку для эмбрионного каллуса кукурузы есть указания на этот счёт [12]. Наиболее вероятно, что подобная ситуация является отражением генотипических особенностей и/или зависимости морфогенетического потенциала от типа экспланта, так как ранее нами для иного экспланта — незрелые зародыши — было показано, что при агробактериальной инфекции способность к индукции регенерации у некоторых инбредных линий кукурузы сохраняется. Следует отметить, что для анализируемого генотипа, используя в качестве экспланта незрелые зародыши, индуцировать каллусогенез не удалось.

Таким образом, было показано, что полученный из УСП морфогенный каллус инбредной линии кукурузы Л390 оказался компетентным к *Agrobacterium*-опосредованной трансформации независимо от анализируемых нами условий инокуляции.

Литература

1. Ishida Y., Satto h., Hiei Y., Komari T., Kumashiro T. High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens* // Nat. Biotech.— 1996.— 14.— P. 745–750.
2. Sairam R.V., Parani M., Franklin G. et al. Shoot meristem: an ideal explant for *Zea mays* L. transformation // Genome.— 2003.— 46.— P. 323–329.
3. Sidorov V., Gilbertson L., Addae P., Duncan D. *Agrobacterium*-mediated transformation of seedling-derived maize callus // Plant Cell Rep.— 2006.— 25.— P. 320–328.
4. Данилова С.А., Долгих Ю.И. Условия, необходимые для эффективной агробактериальной трансформации *Agrobacterium tumefaciens* эмбрионного каллуса кукурузы // Физиология растений.— 2005.— Т.25, №4.— С. 600–608.
5. Sticklen M. B., Oraby H. F. Shoot apical meristem: a sustainable explant for genetic transformation of cereal crops // In Vitro Cell Dev. Biol.— Plant.— 2005.— 41.— P. 187–200.
6. Zhong H., Srinivasan C., Mariam B. S. In-vitro morphogenesis of corn (*Zea mays* L.). I Differentiation of multiple shoot clumps and somatic embryos from shoot tips // Planta.— 1992.— 187.— P. 483–489.
7. Струнин Д.Е., Сергеева Л.Е., Тищенко Е.Н. Регенерация растений путем прямого органогенеза из сегментов проростков элитных инбредных линий кукурузы (*Zea mays* L.) // Физиология и биохимия культ.растений.— 2008.— Т.40, №2.— С. 164–170.
8. Dellaporta S.L., Wood J., Hicks J.B. A plant DNA miniprep: version II // Plant Mol. Biol. Rep.— 4.— P. 419–421.
9. Маниатис Т. и др. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование: Пер. с англ. / Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж.— М.: Мир, 1984.— 480 с.

10. Чеченева Т.Н. Спонтанная и индуцированная изменчивость кукурузы *in vitro*. 03.00.15 — генетика. Диссертация на соискание уч. ст. д.б.н.— Киев, 2003.— 302 с.

11. Trick H.N., Finner J.J. SAAT: sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation // Transgenic Res.— 1997.— 6.— P. 329–336.

12. Hansen G. Evidence for *Agrobacterium*-Induced Apoptosis in Maize Cells // Molecular Plant-Microbe Interactions.— 2000.— 13, №6.— P. 649–657.

Резюме

Исследовали морфогенный потенциал инбредных линий кукурузы, используя в качестве эксплантов узелковый сегмент побега проростков, а также компетентность морфогенного каллуса к агробактериальной инфекции. Показана генотипическая зависимость реализации морфогенетического потенциала и интродукция Т-ДНК в геном независимо от проанализированных условий инокуляции (концентрация агробактерии, время инокуляции, ультразвуковая обработка).

Досліджували морфогенний потенціал інбредних ліній кукурудзи, використовуючи в якості експлантів вузелковий сегмент пагону проростків, а також компетентність морфогенного калусу до агробактеріальної інфекції. Показані генотипова залежність реалізації морфогенного потенціалу й інтродукція Т-ДНК в геном незалежно від проаналізованих умов инокуляції (концентрація агро бактерії, час инокуляції, ультразвукова обробка).

Maize (*Zea mays* L.) inbred lines morphogenic potential using as explant seedling nodal segment and competence of morphogenic callus to *Agrobacterium* infection were studied. Genotype dependence morphogenetic potential realization and introduction T-DNA in genome independently from analyzed conditions of inoculation (agrobacterium concentration, time of inoculation, sonication) were shown.

МЕЛИХОВА Г.И., МИТРОФАНОВА И.В.

Никитский ботанический сад — Национальный научный центр, Украина, 98648, АР Крым, г. Ялта, пгт. Никита, e-mail: in_vitro@ukr.net

ОСОБЕННОСТИ ВВЕДЕНИЯ СЕГМЕНТОВ ПОБЕГА И ИНДУКЦИИ МОРФОГЕНЕЗА *IN VITRO* МАСЛИНЫ ЕВРОПЕЙСКОЙ (*OLEA EUROPAEA* L.)

Маслина европейская (*Olea europaea* L.) — одно из древнейших культурных растений. Плоды маслины и получаемое из них оливковое масло — ценные легкоусвояемые диетические продукты питания, обладающие терапевтическим действием. В Никитском ботаническом саду собрана единственная в Украине и одна из крупнейших в СНГ коллекция, насчитывающая 228 сортов и гибридов маслины [2, 4].

При использовании традиционных методов размножения (прививка, черенкование) количество получаемых растений маслины невелико, к тому же черенки многих сортов трудно и долго укореняются. Результаты исследо-

ваний последних лет показали, что успешное размножение маслины возможно с применением методов культуры органов и тканей. Многие учёные Италии, Греции и других стран занимались разработкой и совершенствованием биотехнологических способов размножения маслины [5–7, 9]. Большинство работ по культуре органов и тканей касались сортов средиземноморского происхождения. В 80-х годах прошлого столетия для получения новых сортов в НБС-ННЦ были начаты работы по эмбриокультуре маслины [3]. Однако особенности морфогенеза *in vitro* крымских сортов маслины до настоящего времени не исследованы.

Целью нашей работы было выявить морфогенетический потенциал органов и тканей ценных сортов маслины селекции НБС на начальных этапах их культивирования в условиях *in vitro*. В задачи исследования входило получение асептической культуры и изучение особенностей развития первичных эксплантов на агаризованной среде.

Материалы и методы

Объектами настоящего исследования служили два перспективных сорта маслины из коллекционных насаждений НБС — ННЦ: Никитская и Никитская Крупноплодная. Отбор растительного материала осуществляли с мая по август 2009 г. с промежуток в 1–2 недели. Стерилизацию сегментов побега проводили в несколько этапов. Растительный материал промывали в проточной водопроводной воде с мыльным раствором, ополаскивали проточной водопроводной водой, затем дистиллированной водой и протирали марлевой салфеткой, смоченной в 70%-ном этаноле. В качестве первичных эксплантов использовали верхушки и сегменты однолетних побегов с 1–3 междоузлиями. Срезав листья, экспланты помещали в стерильные стаканы и последовательно обрабатывали растворами стерилизующих агентов (табл. 1).

Экспланты помещали в 70%-ный C_2H_5OH , затем применяли 2,5%-ный раствор гипохлорита натрия либо 0,1%-ный раствор сулемы. Для повышения эффективности стерилизации в растворы антисептиков добавляли детергент Tween-80 (1–2 капли).

Экспланты, прошедшие стерилизацию, в асептических условиях высаживали в пробирки на агаризованную питательную среду. Длина эксплантов

Таблица 1

Схема стерилизации первичных эксплантов маслины

Этап стерилизации	Стерилизующий раствор	Производитель	Экспозиция
1	70% C_2H_5OH	Септол, Украина	1 мин
2	2,5% $NaClO$	Domestos, Великобритания	1; 1,5; 5 мин
	0,1% $HgCl_2$	Sigma, США	40с; 1; 2; 5 мин
3	5-кратная промывка в стерильной дистиллированной воде		
4	0,1% Thimerosal	Merk, Германия	5 мин
5	5-кратная промывка в стерильной дистиллированной воде		

в зависимости от количества междоузлий составляла 0,7–3,7 см. В качестве базовой среды использовали среду Мурасиге и Скуга [8], pH 5,2, с добавлением регуляторов роста: БАП и ГК. Субкультивирование эксплантов на свежую питательную среду осуществляли каждые 6 недель. Пробирки с эксплантами помещали в культуральную комнату с температурой 24±1 °С, 16-часовым фотопериодом и интенсивностью освещения 2000–3000 лк.

Обработку результатов экспериментов производили при помощи методов статистического анализа: методы первичной статистической обработки, однофакторного дисперсионного анализа [1]. В таблице 3 приведены средние арифметические и ошибки репрезентативности. Повторность опыта была не менее 10-кратной.

Результаты и обсуждение

Стерилизация является одним из самых сложных этапов при разработке биотехнологических приёмов размножения растений. Известно, что для получения асептической культуры маслины применяются следующие стерилизующие агенты: этанол, аскорбиновая кислота, NaClO, HgCl₂, HCl [5, 6, 9].

В наших исследованиях стерилизация оказывала различное воздействие на экспланты исследуемых сортов маслины (табл. 2).

Так, стерилизацию 0,1%-ным раствором сулемы (не более 40 с) хорошо перенесли сегменты побегов сорта Никитская Крупноплодная, у 53% которых на 2–3-й неделе культивирования отмечали образование микропобегов, тогда как после стерилизации гипохлоритом натрия (5 мин) — лишь у 22%. Контаминация эксплантов Никитской Крупноплодной при данных режимах обработки антисептиками составила 27% и 64% в вариантах с сулемой и гипохлоритом натрия соответственно.

Таблица 2

Выход эксплантов маслины (%) после стерилизации 0,1%-ным раствором сулемы и 2,5%-ным раствором гипохлорита натрия

		Сорт	Экспозиция											
			5 мин			1,5-2 мин			1 мин			40 с		
			Ин	Пт	Об	Ин	Пт	Об	Ин	Пт	Об	Ин	Пт	Об
Антисептики	0,1% HgCl ₂	Никитская	17	66	17	0	100	0	9	82	9	55	30	15*
		Никитская Крупноплодная	0	100	0	25	75	0	0	100	0	27	20	53
	2,5% NaClO	Никитская	23	4	73	-	-	-	0	100	0	-	-	-
		Никитская Крупноплодная	64	14	22	0	100	0	33	77	0	-	-	-

Примечание: Ин — инфицированных; Пт — потемневших; Об — образовавших побеги; (*) — формирования каллуса, ингибирующего развитие микропобегов и отмирание экспланта; (-) — опыт не проводился.

Для сорта Никитская результаты стерилизации улучшались при использовании 2,5%-ного раствора гипохлорита натрия (5 мин). Развитие пазушных побегов после стерилизации гипохлоритом натрия происходило у 73% эксплантов, в то время как после стерилизации сулемой — только у 22%. При превышении экспозиции обработки стерилизующими растворами происходило потемнение и отмирание эксплантов в течение 2–3 недель после введения в пробирочную культуру, при снижении — увеличивалась частота контаминации. Однако, по имеющимся литературным данным, сегменты однолетних побегов маслины сорта Kalamon сохраняли жизнеспособность после обработки 10%-ным раствором NaClO в течение 10 минут [6]. Следовательно, реакция первичных эксплантов маслины на стерилизацию тем или иным антисептиком носит сортоспецифичный характер.

В таблице 3 представлены результаты эксперимента по инициации развития в условиях *in vitro* первичных эксплантов сортов Никитская и Никитская Крупноплодная, отобранных в июле 2009 г.

У сохранивших жизнеспособность эксплантов на 7–10-е сутки культивирования происходила активизация развития пазушных почек. Частота индукции развития меристем на эксплант для обоих сортов составило в среднем 65–70%. При использовании верхушек побегов с 2–3 междоузлиями было отмечено развитие микропобегов только из пазушных меристем, но не из апикальных. Верхушки побегов в течение 3 недель засыхали и отмирали, или были отделены от жизнеспособной части экспланта рыхлым каллусом.

Среди эксплантов сорта Никитская, обработанных разными стерилизующими агентами, в течение четырёх недель культивирования не было выявлено существенного различия по скорости роста микропобегов. Однако на пятой неделе культивирования в варианте опыта с сулемой произошло отделение микропобегов от основного экспланта и отмирание эксплантов вследствие интенсивного нарастания каллуса. Каллус рыхлый, полупрозрачный, жёлтой или светло-зелёной окраски, формировался на местах среза

Таблица 3

Формирование микропобегов первичными эксплантами маслины

Сорт	Размер первичных эксплантов, см	Анти-септик	Количество развившихся почек на эксплант, %	Длина микропобегов, см		
				2 недели	4 недели	6 недель
Никитская	1,0-3,7	NaClO	67,3±5,0	0,28±0,01	0,47±0,02	0,67±0,08
		HgCl ₂	64,9±4,3	0,31±0,08	0,50±0,10	—*
Никитская Крупноплодная	1,3-3,2	NaClO	75,0±7,4	0,52±0,08	1,17**±0,18	1,75**±0,23
		HgCl ₂	69,2±10,3	0,49±0,10	0,61±0,07	0,89±0,12

Примечание: (*) — формирования каллуса, ингибирующего развитие микропобегов и отмирание экспланта; (**) — величина достоверно отличается от результата в варианте с сулемой (p=0,95).

или отделения листового черешка. В варианте с гипохлоритом натрия микропобеги продолжали нормально развиваться без образования или с образованием незначительного количества каллуса, и спустя 6 недель с момента введения эксплантов в условия *in vitro* они достигали в среднем длины $0,67 \pm 0,08$ см.

Для эксплантов сорта Никитская Крупноплодная влияние антисептиков на формирование микропобегов было отмечено начиная с 4-й недели культивирования. В варианте с гипохлоритом натрия микропобеги росли быстрее, чем в варианте с сулемой. Спустя 6 недель культивирования длина микропобегов на эксплантах, обработанных раствором гипохлорита натрия, составила в среднем $1,75 \pm 0,23$ см и раствором сулемы — $0,89 \pm 0,12$ см.

Полученные микропобеги спустя 6 недель с момента введения в культуру *in vitro* черенковали на сегменты длиной 0,3–1,0 см с разным количеством междоузлий и субкультивировали на свежую среду. Верхушки микропобегов с 2–3 листьями, а также сегменты длиной до 0,5 см с 1 междоузлем и 2 листьями погибли спустя 2 недели после субкультивирования. В то же время характерной особенностью эксплантов длиной 0,5–1,0 см, имеющих 2–4 междоузлия и не менее 4 листьев, была 100% жизнеспособность.

У субкультивированных микропобегов уже в первом пассаже произошла приостановка роста. В течение 7 недель культивирования развитие пазушных почек наблюдали только у 7% эксплантов сорта Никитская, причём вновь образовавшиеся побеги прекращали расти, достигнув длины 0,3–0,4 см. В базальной части микропобегов обоих сортов формировалось утолщение из плотного тёмно-бурого каллуса. Во втором пассаже роста также не отмечали, но происходило постепенное отмирание побегов, что могло быть вызвано длительным промежутком между пассажами (1,5 месяца) и истощением ресурсов питательной среды. Исследования продолжаются.

Выводы

1. Выбор способа стерилизации влиял на жизнеспособность первичных эксплантов исследуемых сортов маслины. Так, для обработки сегментов побега сорта Никитская Крупноплодная предпочтительно использовать 0,1%-ный раствор сулемы в течение 40 с, а для сорта Никитская — 2,5%-ный раствор гипохлорита натрия в течение 5 мин. Последствие гипохлорита натрия на рост и развитие микропобегов исследуемых сортов маслины было менее ингибирующим по сравнению с сулемой.

2. Скорость роста микропобегов сорта Никитская Крупноплодная в нулевом пассаже была выше, чем у сорта Никитская при аналогичных режимах стерилизации.

3. Для сохранения жизнеспособности эксплантов необходимо увеличить частоту субкультивирований, а также подобрать оптимальные концентрации регуляторов роста в среде для развития микрочеренков и микропобегов.

Литература

1. Лакин Г.Ф. Биометрия: Учеб. пособие для биол. спец. вузов.— М.: Высшая школа, 1990.— 352 с.

2. Мязина Л.Ф. Состояние генофонда и селекционный потенциал маслины в Никитском ботаническом саду // Проблемы формирования генетических коллекций плодовых, ягодных культур и перспективы их селекционного использования: Мат. XXI Мичуринских чтений, 28–30 октября 2002. — Мичуринск. — 2002. — С. 47–48.

3. Шевченко С.В., Шолохова В.А., Мязина Л.Ф. Эмбриокультура маслины европейской (*Olea europaea* L., сем. *Oleaceae*) // Бюллетень ГНБС. — 2009. — Вып.99. — С. 97–100.

4. Шолохова В.А. Селекция маслины в Никитском ботаническом саду // Бюллетень ГНБС. — Вып.3 (46) — 1981. — С. 53–66.

5. Khan M.R., Rashid. H., Quraishi A. *In vitro* shoot development from juvenile cuttings of field-grown olive (*Olea europaea* L.) cv. Leccino // OnLine Journal of Biological Sciences. — 2002. — Vol.2. — №7. — P. 438–440.

6. Rama P., Pontikis C.A. *In vitro* propagation of olive (*Olea europaea sativa* L.) “Kalamon” // The Journal of Horticultural Science. — 1990. — Vol.65. — №3. — P. 347–353.

7. Rugini E., Gutierrez-Pesce P., Spampinato P.L., Ciarmiello A., D’Ambrosio C. New perspective for biotechnologies in olive breeding: morphogenesis, *in vitro* selection and gene transformation // Acta Horticulturae. — 1999. — Vol.474. — P. 107–110.

8. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant.* — 1962. — Vol.15. — №3. — P. 473–497.

9. Varlaro M.E., Casacchia T., Alfei B., Briccoli Bati C. *In vitro* adaptability of some Italian olive genotypes // Acta Horticulturae. — 2009. — №812. — P. 125–128.

Резюме

Начаты исследования по получению асептической культуры двух сортов *Olea europaea* L. селекции НБС-ННЦ. Разработаны способы стерилизации сегментов побега с применением 2,5%-ного раствора NaClO или 0,1%-ного раствора HgCl₂. Индуцирована регенерация *in vitro* микропобегов у сортов Никитская и Никитская Крупноплодная.

Розпочато дослідження з отримання асептичної культури двох сортів *Olea europaea* L. селекції НБС-ННЦ. Розроблено способи стерилізації сегментів пагону з використанням 2,5%-ого розчину NaClO або 0,1%-ого розчину HgCl₂. Індуковано регенерацію *in vitro* мікропагонів сортів Нікітська та Нікітська Крупноплодна.

The investigation of obtaining the aseptic culture in two *Olea europaea* L. cultivars, bred in NBG-NSC, has been started. The methods of shoot segments sterilisation with 2,5% NaClO or 0,1% HgCl₂ have been worked out. The *in vitro* regeneration of olea microshoots cvs. Nikitskaya and Nikitskaya Krupnoplodnaya has been induced.

ЧНЕБИКОВ М.В.,¹ СЕРЖУК О.П.

¹Національний дендрологічний парк “Софіївка” НАН України, Україна, 20300, г. Умань, вул. Київська, 12а; e-mail: sofievka@ck.ukrtel.net

²Уманський Національний університет садівництва, Україна, 20305, г. Умань, п/о “Софіївка-5” ; e-mail: Serzhuk83@rambler.ru

РОЗМНОЖЕННЯ ПРЕДСТАВНИКІВ РОДУ *CRATAEGUS* L. У КУЛЬТУРІ *IN VITRO*

Однією з цінних малопоширених плодкових рослин є рід *Crateugus*. У садівництві враховуються не лише корисні харчові та лікувальні властивості, а й декоративні характеристики культури.

У природних умовах глід розмножується насінням, а в плодівництві і декоративному садівництві використовують вегетативні способи. Проте насіння проростає через 2–3 роки після посіву, а вегетативне розмноження не завжди дає позитивні результати [1, 3, 6].

Успішне впровадження в плодівництво і декоративне садівництво представників роду *Crateagus* залежить від ефективних методів масового розмноження і вирощування садивного матеріалу. Завдяки відпрацьованій технології культури *in vitro* можливо швидко і в потрібній кількості отримати звільнений від патогенних організмів садивний матеріал генетично ідентичний батьківській рослині.

Матеріал та методи

У дослідженні використовували експланти з 3–5-річних рослини *видів роду Crateagus: C. almaatensis* A. Pojark., *C. arnoldiana* Sarg., *C. pentagyna* Waldst et Kit.

У роботі використовували методи культури рослинних тканин та індукції морфогенних процесів *in vitro*, викликаних гормонами. Культивування експлантів проводили у культуральній кімнаті з кондиційованим повітрям на скляних стежах при температурі 25 ± 1 °C, відносній вологості повітря 70–75%, фотоперіоді 16 годин і штучному освітленні інтенсивністю 3–5 тис. люкс. Посуд, матеріали, інструменти та живильні середовища стерилізували згідно загальножививаних методик [2, 4].

Використання стерилізації вихідного матеріалу сприяє вивільненню його від епіфітних мікроорганізмів та грибів. Для підбору оптимальних стерилізаторів випробували водні розчини різних хімічних реагентів, зокрема 2,5% гіпохлорид натрію, 0,1% дихлорид ртуті та 1,0% нітрат срібла при різних експозиціях. Найбільш ефективним для всіх видів виявилось використання 0,1% дихлориду ртуті при експозиції 10 хв [5].

Регенерацію мікропагонів здійснювали на різних живильних середовищах: Драйвера і Куніюки (DKW) [7], Ллойда і Мак Коуна (WPM) [8], Мурасіге — Скуга (MS) [9], які модифіковані стимуляторами росту, сахарозою 30 г/л та агар-агаром 8 г/л. Використані фітогормони: цитокініни — 6-бензиламінопурин (БАП), ауксини — β -індолилцетова кислота (ІОК), β -індолилмасляна кислота (ІМК), α -нафтилоцетова кислота (НОК).

Результати та обговорення

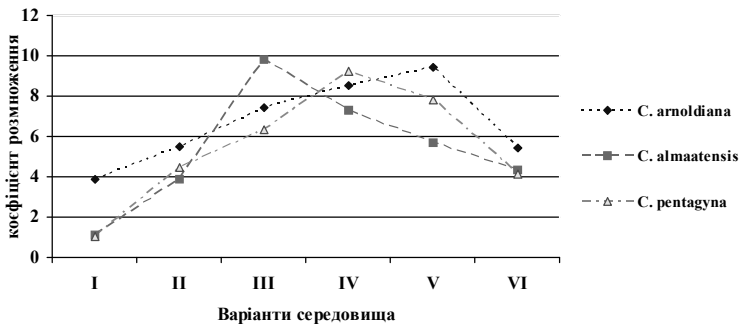
Вивчення здібності до адвентивної регенерації різних видів глоду проводилось на шести варіантах живильних середовищ, відібраних експериментальним шляхом, які б забезпечували коефіцієнт розмноження більше двох (табл.).

Меристематичні верхівки і бруньки, взяті як експланти, при культивуванні на штучних живильних середовищах починали розвиватися через 10–15 діб. Наступне пасажування на свіже виготовлене живильне середовище проводили через 10–15 тижнів.

Коефіцієнт розмноження під час першого пасажу дорівнював нулю, під час другого спостерігалася проліферація адвентивних бруньок. При наступ-

Вміст фітогормонів у модифікованих живильних середовищах, мг/л

Варіант середовища	Мінеральна основа	Фітогормони, мг/л	
		БАП	ауксини
I	MS	0,5	0,1 НОК
II	MS	0,75	0,3 ІМК
III	WPM	1,0	0,1 ІОК
IV	DKW	1,5	0,01 ІОК
V	MS	1,5	—
VI	MS	2,0	—

Рис. 1. Коефіцієнт розмноження представників роду *Grategus* в залежності від вмісту фітогормонів

них пасажах експланти утворювали конгломерати, які склалися не лише з бруньок, але й з пагонів. Для збільшення коефіцієнту розмноження у перших пасажах конгломерати бруньок і пагонів не розділяли на окремі одиниці, а переносили великими частками.

Оцінку ефективності середовищ та облік коефіцієнта розмноження проводили після четвертого пасажу. Кожен окремий вид потребує індивідуального підбору живильних середовищ (рис. 1).

При культивуванні рослин на середовищі I у всіх видів коефіцієнт розмноження знаходився в межах від 1,0 до 3,9. У II варіанті спостерігали підвищення коефіцієнта розмноження до 3,9–5,5. На середовищі III у експлантів виду *C. almaatensis* було отримано найбільш високий коефіцієнт розмноження (9,8). Середовище IV сприяло збільшенню коефіцієнту розмноження у виду *C. pentagyna* до 9,2. А при культивуванні експлантів виду *C. arnoldiana* на середовищі V коефіцієнт розмноження склав 8,5. Середовище варіанту VI сприяло зниженню виходу мікроклонів у всіх досліджених видів до 4,1–5,4.

Культивування експлантів на даних середовищах забезпечило активний ріст як центрального, так і формування додаткових адвентивних пагонів на 18–24 добу (рис. 2).



Рис. 2. Формування адвентивних пагонів *Crataegus in vitro*

Впродовж наступних 25–35 діб було сформовано від 2 до 10 пагонів.

У процесі розмноження отримані пагони мікроклонували кожних 35–50 діб, для цього експланти завдовжки 3–6 см відокремлювали від материнської рослини та розділяли на частини розміром близько 2–3 см завдовжки.

Таким чином, наші дослідження засвідчили: на процеси морфогенезу у представників роду *Crataegus* впливає як мінеральна основа, так і гормональний склад живильних середовищ; доцільно здійснювати підбір живильних середовищ для кожного виду окремо.

Література

1. Кокоба Ю.А., Балабак А.Ф. Агротехнічні особливості розмноження глodu (*Crataegus* L.) стебловими живцями // Наук. вісник НЛТУУ.— 2005.— Вип. 15.5.— С. 74–78.
2. Кунах В.А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи.— К.: Логос, 2005.— 730 с.
3. Меженська Л.О. Джерела господарсько цінних ознак глodu (*Crataegus* L.) як плодової культури // Генетичні ресурси для адаптивного рослинництва: мобілізація, інвентаризація, збереження, використання: Тези доп. міжнар. наук.-практ. конф. (Оброшино, 29 червня — 1 липня 2005 р.).— Оброшино, 2005.— С. 149–150.
4. Калинин Ф. Л., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений.— К.: Наук. думка, 1980.— 488 с.
5. Опалко О.А., Небиков М.В., Сержук О.П. Развитие эксплантов представителей рода *Crataegus* L. залежно від строків введення в культуру *in vitro* // Науковий вісник НАУ.— 2008.— Вип. 122.— С. 291–297.
6. Полетико О.М. Боярышник — *Crataegus* L. // Деревья и кустарники СССР дикорастущие, культивируемые и перспективные для интродукции.— М.; Л.: Изд-во АН СССР, 1954.— Т.3.— С. 514–577.

7. Driver J., Kuniyuki A. *In vitro* propagation of Paradox walnut rootstock // Hort-Science.— 1984.— Vol.19.— P. 507–509.

8. Lloyd G., McCown B. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel *Kalmia latifolia* by use of shoot-tip culture // Proc. Inter. Pl. Prop. Soc.— 1980.— Vol.30.— P. 421–427.

9. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture // Physiol. Plant.— 1962.— Vol.15.— №13.— P. 473–497.

Резюме

Представлены результаты сравнительного анализа регенерационной способности представителей рода *Crataegus* в культуре *in vitro*. Проанализировано влияние минеральной основы и гормонального состава питательных сред на морфогенные процессы.

Представлено результати порівняльного аналізу регенераційної здатності представників роду *Crataegus* у культурі *in vitro*. Проаналізовано вплив мінеральної основи та гормонального складу живильних середовищ на морфогенні процеси.

The results of comparative analysis of the genus *Crataegus* representatives regenerative ability in the *in vitro* culture are given. An impact of mineral basis and hormonal composition of nutrient mediums on the morphogeny processes was analyzed.

**ОСТАШ Б.О.¹, МАКІТРИНСЬКИЙ Р.П.¹, РАБИК М.В.¹, ЗАБУРАНИЙ Н.В.¹,
ОСТАШ І.С.¹, УОКЕР С.², ФЕДОРЕНКО В.О¹**

Львівський національний університет імені Івана Франка,

¹Україна, 79005, Львів, вул. Грушевського, 4, e-mail: v_fedorenko@franko.lviv.ua

²Гарвардська медична школа,

США, 02115, Бостон, МА

ГЕНЕТИЧНІ ЕЛЕМЕНТИ, ЩО РЕГУЛЮЮТЬ ПРОДУКЦІЮ МОЕНОМІЦИНІВ У *STREPTOMYCES GHANAENSIS*

Сьогодні спостерігається значне поживлення інтересу до впровадження нових класів антибіотиків і фосфогліколіпідний антибіотик моюноміцин А (Мм, рис.) розглядається як одна із найперспективніших моделей у галузі розробки протибактерійних препаратів. Його продукує низка стрептоміцетів, зокрема *Streptomyces ghanaensis*. Моюноміцин А — єдиний відомий природний інгібітор глікозилтрансфераз (трансглікозилаз), що задіяні у передостанньому кроці біосинтезу пептидоглікану у бактерій [3]. Моюноміцин А виявляє активність у субнаномолярних концентраціях, що є найкращим показником серед усіх відомих антибіотиків. Він пригнічує метицилін- та ванкоміцин-резистентні бактерії. Сьогодні проводяться інтенсивні дослідження, спрямовані на створення похідних Мм за допомогою методів хімічного синтезу і генно-інженерних маніпуляцій [5, 7]. Гени біосинтезу Мм клонувано і секвеновано, а також встановлено основні етапи його біосинтезу [5, 6].

Водночас, механізми регуляції цього процесу не вивчено. Гени біосинтезу моеноміцину А у *S. ghanaensis* зосереджені у двох кластерах, але на відміну від більшості досліджених кластерів генів синтезу антибіотиків, в них не виявлено жодного регуляторного гена. Доведено, що застосувавши генно-інженерні підходи, можна отримати похідні Мм з покращеними фармакокінетичними параметрами, проте, їхній біосинтез відбувається на надзвичайно низькому рівні [5]. Метою роботи є пошук і дослідження генів, які потенційно задіяні у регуляцію біосинтезу а моеноміцину А та опрацювання підходів до отримання штамів з підвищеним синтезом цього антибіотика.

Матеріали і методи

У роботі використано штами актиноміцетів *S. ghanaensis* ATCC14672, *S. albus* J1074, *S. lividans* TK24 та 1326, *S. coelicolor* M145 і M512, а також їхні похідні. *Escherichia coli* DH5а використали для маніпуляцій з субклонування ДНК, а *E. coli* ET12567 (рUB307) — для проведення міжродових кон'югацій. Як тест-культуру для визначення антибіотичної активності штамів актиноміцетів використали *Bacillus cereus* ATCC19637. Актиноміцети вирощували на вівсяному середовищі [1], а також у середовищах TSB і R5A [2] при температурі 28 °С, а *E. coli* — у середовищі LB при 37 °С. Схрещування *E. coli* — *Streptomyces* проводили на вівсяному середовищі згідно описаної методики [1] Антибіотичну активність штамів актиноміцетів визначали методом дифузії в агар і методом LS-MS. Виділення препаратів сумарної та плазмідної ДНК, обробку ДНК ендонуклеазами рестрикції, T4-ДНК-лігазою, електрофоретичний аналіз ДНК, полімеразну ланцюгову реакцію, трансформацію *E. coli* проводили за стандартними методиками [2]. Аналіз *in silico* геномів *S. ghanaensis* і *S. albus* J1074 проводили, використовуючи такі програмні продукти, як Glimmer, Prodigal, BLAST, Elph, tRNAscan і Artemis.

Результати та обговорення

Використання штамів *S. lividans*, *S. coelicolor* і *S. albus* як гетерологічних господарів для експресії генів біосинтезу моеноміцинів. У попередніх роботах нами показано можливість синтезу моеноміцинів за гетерологічних умов з використанням *S. lividans* TK24 [5, 6]. Проте рівень синтезу Мм був доволі низьким. До того ж продукування вихідним штамом *S. lividans* забарвлених метаболітів актинородину та ундецилпродегіозину значно утруднювало виявлення Мм. Тому ми вирішили перевірити штами *S. albus* і *S. coelicolor* щодо можливості ними синтезу Мм. *S. albus* J1074 широко використовують як гетерологічний господар для синтезу різноманітних сполук. Він характеризується дрібнодисперсним ростом і не синтезує забарвлених метаболітів. *S. albus* J1074 є чутливим до МмА, тому нами отримано mutant *S. albus* R1, стійкий до цього антибіотика.

Як гетерологічні господарі використано два штами *S. coelicolor* — M145 (продуцент антибіотиків актинородину та ундецилпродегіозину) та його похідний M512 *DactII-orf4*, *DredD*. У M512 делетовані гени шлях-специфічних активаторів біосинтезу згаданих антибіотиків, тому він їх не синтезує.

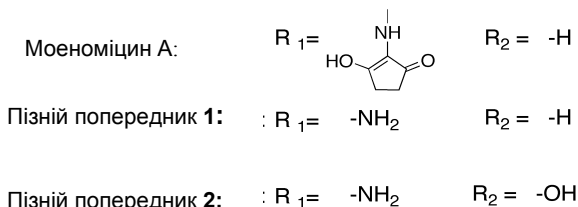
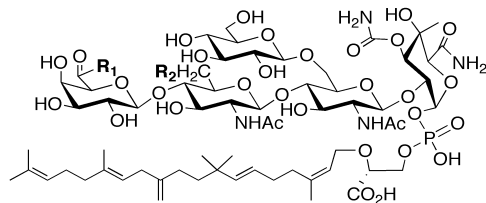


Рис. 1. Структурні формули молекул моеноміцинів. Моеноміцин А та пізній попередник 1 накопичуються штамом *S. ghanaensis*, а пізній попередник 2 синтезується гетерологічними господарями

Для досягнення поставленої мети сконструйовано косміду moeno38-5, що містить гени біосинтезу безхромових похідних ММА. Косміду перенесено у вищезазначені штами актиноміцетів за допомогою міжродової кон'югації *E. coli* — *Streptomyces*. Усі штами, що несли цю косміду, синтезували Мм. Результати LC-MS засвідчують, що *S. coelicolor* M512 moeno38-5⁺ синтезує приблизно у три рази менше антибіотика, ніж *S. coelicolor* M145 moeno38-5⁺. Можливо, шлях-специфічні регулятори ActII-ORF4 та RedD, гени яких відсутні у M512, впливають на синтез Мм. Мутант *S. albus* R1 moeno38-5⁺, стійкий до Мм, продукує більше Мм, ніж чутливий до нього штам *S. albus* J1074 moeno38-5⁺. Рівень синтезу Мм у *S. albus* R1 moeno38-5⁺ приблизно у два рази вищий, ніж у штамів *S. lividans*. У той час *S. coelicolor* M512 moeno38-5⁺ продукує у 30 разів менше Мм, ніж *S. albus* R1 moeno38-5⁺. Ми також порівняли синтез Мм двома штамми *S. lividans*, що містять згадану косміду — диким типом 1326 та його мутантом TK24 з мутацією у гені *rpsL*, що кодує рибосомальний білок S12. Однак на відміну від *S. lividans*, де мутація *rpsL* зумовлювала значне зростання синтезу актинородину [4], вона не впливала на синтез Мм у *S. lividans* TK24 moeno38-5⁺. Отримані дані свідчать про штамову та видову залежність синтезу ММА. Отже, серед проаналізованих штамів найкращим гетерологічним господарем для експресії клонованих генів біосинтезу моеноміцинів є *S. albus* R1.

Титрування промоторів генів *moeO5* і *moeE5*. Гени *moeE5* і *moeO5* контролюють перші кроки біосинтезу моеноміцину А у *S. ghanaensis* [5]. Продукт гена *moeO5* — пренілтрансфераза, що каталізує утворення С15 ліпід-фосфогліцерату із фарнезил-пірофосфату і моеноциніл-пірофосфату.

моєЕ5 — епімераза, яка перетворює УДФ-глюкуронову кислоту у УДФ-галактуринову кислоту, і тим самим постачає перший цукор для біосинтезу ММА [6]. Ми припустили, що промотори цих генів можуть бути основними мішенями дії різних транскрипційних регуляторів. Для того, щоб оцінити вплив на них регуляторів ми використали метод титрування промоторів. Повну послідовність промоторів генів *моєЕ5* і *моєО5* ампліфіковано і клонувано в мультикопійну плазмиду рSOK101. Отримані рекомбінантні плаزمіди рSOKмоєО5р і рSOKмоєЕ5р, перенесено у штами *S. ghanaensis* і *S. albus* R1моє38-5⁺. Порівняли рівень продукції Мм у штамів, що несуть клоновані промотори — *S. ghanaensis* (+рSOKмоєО5р), *S. ghanaensis* (+рSOKмоєЕ5р), *S. albus* R1 (+моє38-5; +рSOKмоєО5р), і *S. ghanaensis*, що несе лише вектор рSOK101, а також у *S. albus* R1 з цим вектором і космоїдою моє38-5. Штами, які містять обидві мультикопійні плазміди з клонованими промоторами, синтезують менше Мм, контрольні штами. Падіння рівня синтезу антибіотика є більшим в штамів, що містять рSOKмоєО5р. Метаболіти *S. ghanaensis* (+рSOKмоєО5р) проаналізовано з допомогою методу ВЕРХ-МС. Отримані результати свідчать про падіння продукції Мм у більш, ніж чотири рази порівняно з контрольним штамом. Ці дані дають змогу припустити, що з промоторними ділянками ключових генів біосинтезу ММА *моєЕ5* і *моєО5* імовірно зв'язуються позитивні транскрипційні регулятори.

Вивчення впливу глобальних регуляторних генів на біосинтез моєноміцинів штамми актиноміцетів. Відсутність регуляторних генів, асоційованих із кластерами генів біосинтезу Мм, а також результати попередніх дослідів, дали змогу припустити, що деякі глобальні регуляторні елементи можуть впливати на синтез ММА. Низку глобальних регуляторів добре вивчено у *S. coelicolor*, тому ми провели аналіз *in silico* наявності їхніх гомологів у геномах *S. ghanaensis* і *S. albus*, які частково секвеновано.

Проаналізовано 10 імовірних генів негативної та 10 — позитивної регуляції. Усі вони присутні у геномі *S. ghanaensis* і більшість (16 із 20) — у *S. albus*. Вивчено вплив генів глобальних регуляторів *relA*, *afsS*, *afsR*, *nsdAgh* і *atrAgh* на рівень синтезу ММА, за умови їхньої надекспресії у штамі дикого типу *S. ghanaensis*, а також *S. albus* R1 моєно38-5⁺. Ці гени клонувано у складі плазмід рIJ6085, рKcafS рIJ2476 та перенесено у згадані штами. Надекспресія гена *relA* у *S. ghanaensis* спричиняла зростання синтезу ММА удвоє порівняно з вихідним штамом, тоді як *afsS* і *afsR* достовірно не підвищували рівень синтезу антибіотика. Так само *S. albus* R1 моєно38-5⁺, в якому клонувано ген *relA*⁺, продукує у два рази більше антибіотика, ніж *S. albus* R1 моєно38-5⁺. Надекспресія гена *afsS* зумовлювала зростання синтезу сполуки на 25%, а гена *afsR* — суттєво не впливала на біосинтез моєноміцинів. З'ясовано, що гени *nsdAgh* і *atrAgh* не впливають на синтез Мм за умов їхньої надекспресії у штамі *S. ghanaensis*. З усього сказаного випливає, що синтез ММА підлягає впливу певних глобальних регуляторів. Доведено можливість використання глобальних регуляторних елементів задля створення штамів зі збільшеним рівнем синтезу моєноміцинів.

Висновки

1. Як гетерологічні господарі для синтезу моеноміцину А можна використати *S. albus*, *S. coelicolor* і *S. lividans*. Серед проаналізованих штамів найкращим гетерологічним господарем є *S. albus* R1, що несе косміду моепо38-5 з генами, які забезпечують біосинтез безхромософних похідних МмА.

2. З промоторними ділянками ключових генів біосинтезу моеноміцину А *moeE5* і *moeO5* імовірно зв'язуються позитивні транскрипційні регулятори.

3. Біосинтез моеноміцину А підлягає впливу певних глобальних регуляторів. Надекспресія гена *relA* як у штамі дикого типу *S. ghanaensis*, так і гетерологічному господарі *S. albus* R1мoe38-5⁺, спричиняє зростання синтезу антибіотика.

4. Мутація *rpsL* не впливає на синтез моеноміцину у клітинах гетерологічного господаря *S. lividans* ТК24 моепо38-5⁺.

Література

1. Федоренко В. О., Остап Б. О., Гончар М. В., Ребець Ю. В. Великий практикум з генетики, генетичної інженерії та аналітичної біотехнології мікроорганізмів.— Львів: Видавн. центр ЛНУ імені Івана Франка, 2007.— 279 с.

2. Kieser T., Bibb M., Buttner M., Chater K., Hopwood D. Practical *Streptomyces* Genetics. Norwich: The John Innes Foundation, 2000.— 634 p.

3. Ochi K. From microbial differentiation to ribosome engineering // Bioci. Biochem. Biochem.— 2007.— Vol. 71, N6.— P. 1373–1386.

4. Ostash B., Walker S. Bacterial transglycosylase inhibitors // Curr. Opin. Chem. Biol.— 2005.— Vol. 9, N5.— P. 459–466.

5. Ostash B., Saghatelyan A., Walker S. A streamlined metabolic pathway for the biosynthesis of moenomycin A // Chem. Biol.— 2007.— Vol. 14, N3.— P. 257–267.

6. Ostash B., Doud E. H., Lin C., Ostash I., Perlstein D. L., Fuse S., Wolpert M., Kahne D., Walker S. Complete characterization of the seventeen step moenomycin biosynthetic pathway // Biochemistry.— 2009.— Vol. 48, N37.— P. 8830–8841.

7. Ostash B., Makitrinsky R., Walker S., Fedorenko V. Identification and characterization of *Streptomyces ghanaensis* ATCC14672 integration sites for three actinophage-based plasmids // Plasmid.— 2009.— Vol. 61, N3.— P. 171–175.

Резюме

З'ясовано, що штами *Streptomyces coelicolor*, *S. albus* і *S. lividans* можуть бути використані як гетерологічні господарі для експресії генів біосинтезу моеноміцинів, клонованих з *S. ghanaensis*. Надекспресія глобального регуляторного гена *relA* як у штамі дикого типу *S. ghanaensis*, так і гетерологічному штамі *S. albus* R1мoe38-5⁺, спричиняє зростання синтезу моеноміцинів.

Установлено, что штаммы *Streptomyces coelicolor*, *S. albus* и *S. lividans* можно использовать как гетерологические хозяева для экспрессии генов биосинтеза моеномицинов, клонированных из *S. ghanaensis*. Повышенная экспрессия гена глобального регуляторного гена *relA* как в штамме дикого типа *S. ghanaensis*, так и гетерологическом штамме *S. albus* R1мoe38-5⁺, обуславливает возрастание синтеза моеномицинов.

It has been shown that strains *Streptomyces coelicolor*, *S. albus* and *S. lividans* can be used as heterologous hosts for expression of the biosynthetic genes from moenomycin cluster of *S. ghanaensis*. Overexpression of the global regulatory gene *relA* in both wild type strain *S. ghanaensis* and heterologous strain *S. albus* R1мoe38-5⁺ led to increase of moenomycin production.

САХНО Л.А.¹, ОСТАПЧУК А.Н.², КЛОЧКО В.В.², БАННИКОВА М.А.¹,
КУЧУК Н.В.¹

¹ Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины
Украина, Д 03680, Киев, МСП, ул. Академика Заболотного, 148,
e-mail: sakhno2007@ukr.net

² Институт микробиологии и вирусологии НАН Украины
Украина, Д 03680, Киев, МСП, ул. Академика Заболотного, 154

ИЗМЕНЕНИЯ В СОСТАВЕ ЖИРНЫХ КИСЛОТ У ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ РАСТЕНИЙ РАПСА, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ ГЕН *суп11А1* ЦИТОХРОМА P450_{SCC} ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Цитохромы P450 — цитохром-зависимые могооксигеназы — это белки, вовлечённые в процессы биосинтеза регуляторных соединений, в том числе стероидных гормонов [1]. Растения табака *Nicotiana tabacum* cv. Petit Havana SR1, в ядро которых был интегрирован ген *суп11А1* цитохрома P450_{SCC} животного происхождения, опережали контрольные в среднем на две недели по темпам роста и развития, характеризовались увеличением количества растворимого белка, растворимых и нерастворимых углеводов, возрастом биомассы [2]. Наблюдаемый фенотипический эффект авторы объясняли влиянием новых биологически-активных стероидных веществ, не характерных для растений дикого типа. В нашей лаборатории были получены биотехнологические растения сельскохозяйственно ценных видов — рапса [3] и картофеля [4], в ядерный геном которых был введён упомянутый выше ген.

Поскольку рапс является третьей по количеству производимого растительного масла (после пальмы и сои [5]) масличной культурой в мире, представляло интерес изучение влияния введённого гена на качественный и количественный состав жирных кислот в трансформированных растениях рапса.

Материалы и методы

Растительный материал. В качестве анализируемого материала использовали выращиваемые в условиях закрытого грунта и в условиях асептической культуры трансформированные растения ярового рапса (*Brassica napus* L. var. *oleifera* DC., сорт Мария), несущие в ядерном геноме ген *суп11А1* цитохрома P450_{SCC} из митохондрий коры надпочечников быка [3].

Газовая хромато-масс-спектрометрия эфиров жирных кислот. Выделение жирных кислот и образование их метиловых эфиров для проведения газо-хроматографических анализов проводили одноэтапно по методике [6]. Для определения использовали семена, полученные при самоопылении растений исходного сорта и первичных трансформантов в условиях теплицы. Кроме того, анализировали состав жирных кислот в листьях трансформантов T₀ и T₁-поколения.

Для приготовления образцов навеску семян (50 мг) измельчали в ступке, переносили в стеклянные пробирки с закручивающимися крышками, кото-

рые имели тефлоновые прокладки, и добавляли сначала 3,3 мл реакционной смеси, состоявшей из метанола:толуола: H_2SO_4 в объёмном соотношении 44:20:2, затем 1,7 мл гексана. Пробирки выдерживали на водяной бане при 80 °С в течение 2 час. После охлаждения при комнатной температуре отбирали верхнюю фазу, в которой и концентрировались образовавшиеся метиловые эфиры жирных кислот. рН раствора доводили до нейтрального насыщением 1н раствором фосфата натрия.

Жирные кислоты из листьев выделяли аналогично, используя 400 мг нарезанных скальпелем листьев для каждой пробы. Полученные образцы имели рН раствора, не требующий изменений перед проведением анализа.

Определение метиловых эфиров жирных кислот проводили на газовой хромато-масс-спектрометрической системе Agilent 6890N/5973inert с капиллярной колонкой DB-FFAP (30м·0,25мм·0,25мкм) (J&W Scientific). Температурная программа от 150 °С до 220 °С с градиентом 2°/мин, температура испарителя — 250 °С. В качестве газа-носителя использовали гелий со скоростью потока 1 мл/мин. Идентификацию проводили при помощи библиотеки масс-спектров NIST 02 и стандартной смеси метиловых эфиров жирных кислот бактерий (Supelco).

Результаты и обсуждение

Анализ спектров жирных кислот, выделенных из листьев T_0 и T_1 поколения трансформантов, показал, что качественный состав жирных кислот остаётся без изменений (рис. А).

Отмечено, что у первичных трансформантов значительно повышается доля ненасыщенной пальмитиновой (C16:0) кислоты, меньше меняются

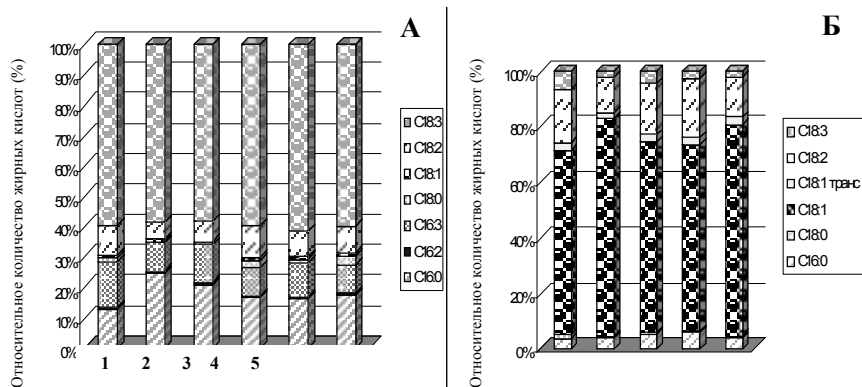


Рис. Относительное количество жирных кислот:

А — в листьях: 1 — исходный рапс, сорт Мария, 2, 3 — первичные трансформанты, линии T_0 12/93/14 и T_0 12/93/18), 4, 5, 6 — трансформанты T_1 -поколения (линии T_1 12/93/26, T_1 12/93/126, T_1 12/93/14в); **Б** — в масле семян: 1 — исходный рапс, сорт Мария, 2–5 — T_1 -поколение трансформантов (линии T_1 12/93/14в, T_1 12/93/1а, T_1 12/93/26, T_1 12/93/126)

количества С16:3 кислоты, падает почти вдвое синтез линолевой (С18:2) кислоты. Доля основной для листьев рапса жирной кислоты — линоленовой (С18:3) остаётся без изменений (рис. А).

В первом поколении трансформированных растений продолжают наблюдаться изменения в соотношении жирных кислот. Доля пальмитиновой кислоты снижается по сравнению с первичными трансформантами, но остаётся выше, чем у исходных растений. Синтез С16:3 кислоты уменьшается по сравнению с таковым у растений T_0 и становится ещё ниже, чем в исходных растениях. За счёт этого происходят изменения и в соотношении линолевой и линоленовой кислот: доля линолевой повышается и становится равной (линия T_1 12/93/26) или незначительно меньшей (линии T_1 12/93/126, T_1 12/93/14в), чем в контрольных растениях. Уровень линоленовой кислоты остаётся либо на уровне исходных растений (линия T_1 12/93/14в), либо незначительно уменьшается (линия T_1 12/93/26), либо незначительно увеличивается (T_1 12/93/126).

Количество ненасыщенных жирных кислот в листьях растений коррелирует с их устойчивостью к абиотическим стрессам (холоду, повышенным температурам) [7].

В результате введения гена *sup11A1* цитохрома P450_{SCC} из митохондрий коры надпочечников быка в растения рапса были получены растения с изменённым соотношением жирных кислот в листьях. В потомстве от самоопыления первичных трансформантов обнаружены линии с незначительно уменьшенным (T_1 12/93/126, T_1 12/93/14в) количеством С18:2, что говорит о снижении их способности противостоять понижению температуры в период вегетации, что может быть актуальным в период развития всходов. В то же время линия T_1 12/93/26 сохраняет способность синтезировать линолеовую кислоту в листьях на уровне растений исходного сорта.

Изучение газ-спектров эфиров жирных кислот, полученных из семян исходного сорта и T_1 поколения трансформантов, показало, что качественный состав жирных кислот всех проанализированных биотехнологических линий не отличается от такового у контрольных растений. В то же время наблюдаются различия в количестве основных жирных кислот рапсового масла как между контрольными и трансформированными растениями, так и между разными трансгенными линиями.

Количество основной кислоты, запасаемой семенами рапса, — олеиновой (С18:1) — варьирует незначительно. У некоторых линий (Вn12/93/1а, Вn12/93/26) доля олеиновой кислоты остаётся на уровне контроля, у линий Вn12/93/14в, Вn12/93/12а она выше, чем у исходного сорта Мария (рис. Б).

Доля пальмитиновой (С16:0) кислоты остаётся либо на уровне контроля, либо повышается (линии (Вn12/93/1а, Вn12/93/26)). Поскольку количество этой кислоты обратно коррелирует с общим количеством масла в семенах [8], то сохранение этого показателя на уровне контрольных растений является позитивным фактором.

Изменения затрагивают и накопление линолевой (С18:2) кислоты, доля которой у линии Вn12/93/14в снижается почти вдвое.

Одновременно наблюдается почти трехкратное снижение доли линоленовой (С18:3) кислоты у четырёх проанализированных линий. Эта кислота, как и линолевая, из-за своей ненасыщенности (три и две двойные связи соответственно) обладает высокой способностью к окислению. Это может приводить к прогорканию семян, порче масла и других продуктов переработки. Для снижения ненасыщенности масел используют их гидрирование, что удорожает конечный продукт. Поэтому уменьшение доли линоленовой кислоты в семенах является желательным признаком, оно может привести к увеличению периода хранения семян и продуктов переработки без ухудшения их качества.

Среди проанализированных линий выделяется генетически модифицированная линия Вп12/93/14в, которая характеризуется увеличением доли олеиновой и уменьшением доли линоленовой кислот в семенах при сохранении других характеристик исходного сорта Мария. Учтывая, что она также обладает устойчивостью к фосфинотрицину [3] (действующему веществу гербицида BASTA [9]), эта линия может послужить материалом для получения сортов рапса, устойчивых к гербицидам на основе фосфинотрицина и с измененным составом масла, которые могут быть использованы как в пищевых целях, так и в качестве сырья для производства биодизеля.

Выводы

Введение гена *суп11А1* цитохрома P450_{scс} из митохондрий коры надпочечников быка в ядерный геном растений рапса влияет на количественный состав жирных кислот в листьях и семенах полученных биотехнологических растений. В результате проведенной газовой хроматографии эфиров жирных кислот, выделенных из семян T₁ поколения трансформантов, выявлена перспективная линия Вп12/93/14, которая характеризуется увеличением доли олеиновой (С18:1) и уменьшением доли линоленовой (С18:3) кислот.

Робота виконувалась в рамках проекту “Отримання генетично змінених рослин рапа з підвищеною продуктивністю, стійкістю до гербіцидів та зміненням складом олії як сировини для виробництва біодизелю” целевої комплексної програми наукових досліджень НАН України “Біомаса як паливна сировина” (“Біопалива”).

Литература

1. Morant M., Bak S., Muller B. L., le Werck-Reichhart D. Plant cytochromes P450: tools for pharmacology, plant protection and phytoremediation // Current Opinion in Biotechnology. — 2003. — **14**. — P. 151–162.

2. Спивак С.Г., Бердичевець И.Н., Ярмолинский Д.Г., и др. Создание и характеристика трансгенных растений табака *Nicotiana tabacum* L., экспрессирующих кДНК *СУР11А1* цитохрома P450_{scс} // Генетика. — 2009. — **45**, №9. — С. 1217–1224.

3. Сахно Л.А., Моргул Б.В., Кищенко Е.М., Кучук Н.В. Наследование введенных генов *bar* и *суп11А1* цитохрома P450_{scс} животного происхождения в T₁ поколении трансформированных линий табака и рапса // Фактори експериментальної еволюції організмів. — Збірник наукових праць, за ред. Кунаха В.А. — Київ: Логос. — 2009. — Т.7. — С. 250–255.

4. Рудас В.А., Шаховський А.М., Моргул Б.В. Отримання трансгенних рослин картоплі, стійких до гербіциду БАСТА, що містять ген *суп11А1* цитохрома P450_{scс} //

Факторы экспериментальной эволюции организмов.— Збірник наукових праць, за ред. Кунаха В.А.— Київ: Логос.— 2009.— Т.7.— С. 245–250.

5. <http://faostat.fao.org/site/636/default.aspx#ancor>.

6. *Garces R., Mancha M.* One-step lipid extraction and fatty acid methyl esters preparation from fresh plant tissues // *Analytical Biochemistry*.— 1993.— **211**.— P. 139–143.

7. *Лось Д.А.* Структура, регуляция экспрессии и функционирование десатураз жирных кислот // *Успехи биологической химии*.— 2001.— Т.41.— С. 163–198.

8. *Schnurbusch T., Mullers C., Becker H.C.* A mutant of *Brassica napus* with increased palmitic acid content // *Plant Breed.*— 1999.— V.119, №2.— P. 141–144.

9. *Thompson C.J., Movva N.R., Tizard R. et al.* Characterization of the herbicide-resistance gene *bar* from *Streptomyces hygroscopicus* // *The EMBO J.*— 1987.— V.6, N9.— P. 2519–2523.

Резюме

Введение гена *sup11A1* цитохрома P450_{SCC} из митохондрий коры надпочечников быка в ядерный геном рапса влияет на количественный состав жирных кислот в листьях и семенах полученных биотехнологических растений. В результате проведенной газовой хроматографии эфиров жирных кислот, выделенных из семян T₁ поколения трансформантов, выявлена перспективная линия Bn12/93/14в, которая характеризуется увеличением доли олеиновой (C18:1) и уменьшением доли линоленовой (C18:3) кислот.

Введення гена *sup11A1* цитохрома P450_{SCC} з мітохондрій кори надниркових залоз бика до ядерного геному ріпака впливає на кількісний склад жирних кислот в листі і насінні отриманих біотехнологічних рослин. В результаті проведеної газової хроматографії ефірів жирних кислот, виділених з насіння T₁ покоління трансформантів, виявлена перспективна лінія Bn12/93/14в, яка характеризується збільшенням частки олеїнової (C18:1) і зменшенням частки ліноленової (C18:3) кислот.

The *sup11A1* gene of cytochrome P450_{SCC} from bovine adrenal cortex mitochondria introduction in the nuclear genome of oilseed rape affects the quantitative composition of fatty acids in the leaves and seeds of biotechnological plant obtained. Perspective line Bn12/93/14в, which is characterized by an increase in the proportion of oleic (C18:1) and a decrease in the proportion of linolenic (C18:3) acids revealed as a result of gas chromatography of fatty acids esters isolated from the seeds of T₁ transformant generation.

СЕЛЬДИМИРОВА О.А., КРУГЛОВА Н.Н.

Учреждение Российской академии наук Институт биологии Уфимского НЦ РАН, Россия, 450054, Уфа, пр. Октября, 69, e-mail: Kruglova@anrb.ru

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ НАЧАЛЬНЫХ ЭТАПОВ ЭМБРИОДОГЕНЕЗА В КАЛЛУСАХ АНДРОКЛИННОГО И ЗАРОДЫШЕВОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ ЯРОВОЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ

Биотехнологические методы культуры *in vitro* в настоящее время широко используются для решения прикладных задач селекции ценных сельскохозяйственных растений [8, 11, 12] и в частности яровой мягкой пшеницы — основного хлебного злака [6].

Практическую значимость большинства методов культуры *in vitro* определяет образование на конечном этапе полноценных фертильных растений-регенерантов. Один из путей регенерации растений *in vitro* — эмбриоидогенез в каллусных культурах различного происхождения. Формирование эмбриоидов — биполярных зародышеподобных структур — биотехнологически оптимальный путь регенерации растений *in vitro* [6], поскольку предполагает работу с генетически однородным материалом. В связи с этим основной вопрос при регенерации растений посредством эмбриоидогенеза *in vitro* — происхождение эмбриоида: считается, что одноклеточное происхождение эмбриоида снижает риск возникновения химерных растений-регенерантов. Генотип эмбриоида в случае образования в результате случайного объединения нескольких различных клеток каллусной ткани можно считать практически неидентифицируемым. Это обстоятельство исключает возможность использования эмбриоидов и растений, полученных из них, в генно-инженерных и клеточно-инженерных манипуляциях [8, 11–13].

До сих пор вопрос о клеточных механизмах формирования эмбриоидов в каллусных культурах остается дискуссионным. В связи с этим цель нашей работы заключалась в ультраструктурном анализе начальных этапов эмбриоидогенеза в каллусах андроклинного и зародышевого происхождения у яровой мягкой пшеницы.

Материал и методы

Материалом для исследования послужили сорта яровой мягкой пшеницы Скала, Башкирская 26 и Башкирская 28.

В работе использованы: метод культуры *in vitro* пыльников яровой мягкой пшеницы с учетом эмбриологических данных [4], метод культуры *in vitro* незрелых зародышей пшеницы в модификации [7], методы световой микроскопии (СМ) [1] и трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ) [2]. Постоянные препараты просматривали и документировали с применением цифрового микроскопа проходящего света серии Микровизор μ Vizo-103 (ЛОМО ФОТОНИКА, г. Санкт-Петербург). Объекты, подготовленные к исследованию методом ТЭМ, анализировали с помощью просвечивающего электронного микроскопа JEM-1200 EX (JEOL, Japan).

Результаты и обсуждение

Экспериментально установлено, что начальный этап морфогенеза *in vitro*, и в частности эмбриоидогенеза, в каллусах как андроклинного [6], так и зародышевого [3] происхождения, — формирование в каллусе параллельно его поверхности меристематической зоны (МЗ).

Согласно данным светооптического анализа, МЗ в каллусах обоих типов имеет сходное строение. Она представлена несколькими слоями клеток, структурная организация которых значительно отличается эти клетки от других клеток каллуса и позволяет рассматривать их как меристематические. Клетки МЗ имеют, как правило, изодиаметрическую форму и плотно прилегают друг к другу. Клетки содержат крупные центрально расположенные ядра, окруженные многочисленными мелкими вакуолями. Цитоплазма клеток МЗ

окрашивается значительно интенсивнее по сравнению с остальными клетками каллуса. Клетки нижележащих слоев имеют более крупные размеры по сравнению с клетками МЗ, вытянутую форму, сильнее вакуолизированы и, в целом, имеют признаки, характерные для клеток паренхимы. Между клетками появляются крупные межклетники. Клетки, лежащие выше МЗ сильно вытягиваются, вакуолизируются, и, в конечном итоге, подвергаются деструкции. Остатки таких клеток сохраняются на поверхности каллуса в виде гомогенного, интенсивно окрашивающегося слоя полисахаридной природы.

Методом ТЭМ в таких клетках выявлены высокое ядерно-плазменное отношение и плотная, за счет присутствия большого количества свободных рибосом, цитоплазма. Присутствуют единичные каналы гранулярного эндоплазматического ретикулума (гЭПР). Пластиды и митохондрии ювенильны по внутренней структуре и почти одинаковы по размеру. Немногочисленные пластиды имеют очень слабо развитую систему внутренних мембран, представленную отдельными тилакоидами. В пластидах имеется небольшое количество крахмала в виде мелких крахмальных зерен. Многочисленные округлые митохондрии не имеют крист. Клеточные стенки тонкие, с многочисленными плазмодесмами. Такие ультраструктурные признаки характеризуют эти клетки как меристематические [5].

Не смотря на определенное сходство, в ультраструктуре клеток МЗ каллусов разного происхождения выявляются значительные различия. Так, в клетках МЗ андроклинных каллусов обнаруживается большое количество каналов агранулярного эндоплазматического ретикулума (аЭПР), с деятельностью которого, по-видимому, связан интенсивный синтез липидов, располагающихся преимущественно вдоль клеточной стенки. Пластиды содержат большее количество более крупных крахмальных зерен по сравнению с клетками МЗ каллусов зародышевого происхождения. Цистерны аппарата Гольджи (АГ) единичны и неактивны. В клетках МЗ каллусов зародышевого происхождения отсутствуют липидные включения и каналы аЭПР. АГ активен и представлен большим количеством диктиосом, цистерны которых заканчиваются секреторными пузырьками.

При переносе каллусов на среду для индукции эмбриодогенеза в клетках МЗ каллусов обоих типов происходят изменения. На светооптическом уровне они заключаются в том, что клетки МЗ становятся более рыхло расположенными за счет увеличения межклетников и утолщения клеточных стенок. Изменения отмечены и на ультраструктурном уровне. В клеточных стенках исчезают плазмодесмы, обнаруживаются только единичные разрушающиеся плазмодесмы. В пластидах продолжается аккумуляция крахмала. Количество митохондрий значительно возрастает, в них формируются кристы. В клетках МЗ андроклинных каллусов начинают появляться каналы гЭПР. Кроме того, в них значительно возрастает длина и количество каналов аЭПР, которые располагаются параллельными рядами вдоль клеточной стенки. В клетках МЗ каллусов зародышевого происхождения усиливается активность АГ: возрастает количество диктиосом, цистерны которых закан-

чиваются многочисленными секреторными пузырьками. Можно предположить, что в клетках МЗ каллусов обоих типов идет активная секреция, направленная на формирование утолщенной клеточной стенки: плазмалемма клеток МЗ андроклинных каллусов имеет многочисленные выросты, направленные в клеточную стенку, в клетках МЗ каллусов зародышевого происхождения отмечены многочисленные экзоцитозные пузырьки. В итоге клеточные стенки клеток МЗ каллусах обоих типов утолщаются и приобретают волокнистую структуру.

В ходе дальнейшего развития в МЗ каллусов обоих типов начинают отчетливо выделяться отдельные клетки с интенсивно окрашивающейся цитоплазмой, в то время как остальные клетки начинают сильно вакуолизироваться. В этих клетках присутствуют автофаговые вакуоли, по-видимому, обуславливающие их деструкцию. По данным ТЭМ клетки с плотной цитоплазмой в каллусах обоих типов характеризуются наличием хорошо развитого гЭПР. Митохондрии многочисленны, имеют хорошо развитую систему крист. В пластидах содержится большое количество крахмала, кроме того, в клетках андроклинного каллуса также содержится большое количество липидов. Такие данные позволяют говорить о том, что в этих клетках идет синтез конституционных веществ, необходимых для процессов, связанных с энергетическими затратами. В целом, эти клетки обладают всеми признаками, характерными для эмбриогенных клеток [9, 10, 14].

Светооптический анализ показывает, что именно в этих изолированных клетках с плотной цитоплазмой происходят деления, ведущие к формированию эмбриоидов. Одноклеточное происхождение эмбриоидов доказывается и данными ультраструктурного анализа: выявлено, что эмбриоиды в каллусах обоих типов окружены утолщенной оболочкой без плазмодесм, тогда как стенки между клетками эмбриоидов тонкие и содержат многочисленные плазмодесмы. Утолщенная оболочка, окружающая эмбриоиды, сохраняется и в ходе их дальнейшего развития и на светооптическом уровне выявляется в виде интенсивно окрашивающегося слоя полисахаридной природы, отделяющего формирующиеся эмбриоиды от массы каллуса.

Выводы

Полученные нами данные свидетельствуют, что эмбриоиды в каллусах как андроклинного, так и зародышевого происхождения имеют одноклеточное происхождение из отдельных изолированных клеток. Однако изолированность клеток в каллусах различного происхождения достигается по-разному.

В клетках андроклинных каллусов в формировании клеточных стенок, по-видимому, активное участие принимает аЭПР, участие которого в формировании клеточных стенок считается вполне вероятным [5]. В зародышевом каллусе действует другой механизм изоляции клеток — за счет секреторной активности АГ.

В целом выявленное одноклеточное происхождение эмбриоидов в каллусах пшеницы разного происхождения позволяет рассматривать эмбриогенез как оптимальный путь регенерации растений и является основой

для создания биотехнологий клонирования хозяйственно ценных генотипов яровой мягкой пшеницы — основного хлебного злака.

Авторы выражают искреннюю благодарность сотрудникам лаборатории физиологии и генетики культивируемых клеток Казанского института биохимии и биофизики Казанского ИЦ РАН за помощь в проведении электроно-микроскопических исследований.

Исследование поддержано грантом РФФИ-Поволжье (грант № 08-04-97045) и программой “Ведущие научные школы РФ” (грант №НШ 2096.2008.4).

Литература

1. Барыкина Р.П., Веселова Т.Д., Девятов А.Г., Джалилова Х.Х., Ильина Г.М., Чубатова Н.В. Справочник по ботанической микротехнике. Основы и методы.— М.: Изд-во МГУ, 2004.— 312 с.
2. Гайер Г. Электронная гистохимия.— М., 1974.— 341 с.
3. Катасонова А.А. Оптимизация технологии получения растений-регенерантов яровой мягкой пшеницы в каллусной культуре *in vitro*: Автореф. дисс. ... канд. биол. наук.— Уфа: Институт биологии УНЦ РАН, 2007.— 25 с.
4. Круглова Н.Н., Батыгина Т.Б. Методические рекомендации по использованию морфогенетического потенциала пыльника в биотехнологических исследованиях яровой мягкой пшеницы.— Уфа: ИБ УНЦ РАН, 2002.— 39 с.
5. Наумова Т.Н. Ультраструктурные аспекты эмбриогенеза // Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепции: Т.2. Семья / Ред. Т.Б. Батыгина. СПб.: Мир и семья, 1997.— С. 557–567.
6. Эмбриологические основы андроклинии пшеницы: атлас / Круглова Н.Н., Батыгина Т.Б., Горбунова В.Ю., Титова Г.Е., Сельдимирова О.А.— М.: Наука, 2005.— 99 с.
7. Шаяхметов И.Ф. Соматический эмбриогенез и селекция злаковых культур.— Уфа: Изд-во Башкирск. ун-та, 1999.— 165 с.
8. Advances in haploid production in higher plants / Eds. Touraev A., Forster B.P., Jain S.M.— Springer Netherlands, 2009.— 347 p.
9. Feher A. Why somatic plant cell start to form embryos? // Plant Cell Monogr.— 2005.— V.2.— P. 85–101.
10. Namasivayam P. Acquisition of embryogenic competence during somatic embryogenesis // Plant Cell, Tiss. Org. Cult.— 2007.— V.90, №1.— P. 1–8.
11. Plant biotechnology and molecular markers / Eds Srivastava P.S., Narula A., Srivastava S.— New Delhi: Anamaya Publishers, 2004.— 325 p.
12. Plant cell and tissue culture — a tool in biotechnology. Basics and application / Eds. Neumann K.-H., Kumar A., Imani J.— Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 2009.— 333 p.
13. Sussex I.M. The scientific roots of modern plant biotechnology // Plant Cell.— 2008.— V.20, №5.— P. 1189–1198.
14. Yeung E.C. Structural and developmental patterns in somatic embryogenesis // *In vitro* embryogenesis in plants / Ed. T.A. Thorpe.— Dordrecht, Boston, London: Kluwer Acad. Publish., 1995.— P. 205–248.

Резюме

Методами световой и трансмиссионной электронной микроскопии выявлено одноклеточное происхождение эмбриоидов в каллусах андроклинического и зародышевого происхождения у яровой мягкой пшеницы.

The single-cell origin of emryoids in androclonic and embryo-derived calli of spring wheat have been revealed by light and transmission electron microscopy.

СПИВАК Н.Я.¹, СИНДАРОВСКАЯ Я.Р.², ЛОЗОВАЯ О.И.¹, САХНО Л.А.²,
ГЕРАСИМЕНКО И.М.², ОЛЕВИНСКАЯ З.М.¹, ДИДЕНКО Л.Ф.¹,
ШЕЛУДЬКО Ю.В.², КУЧУК Н.В.²

¹Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины,
ул. Заболотного 154, г. Киев, 03680, Украина; e-mail: Spivak@serv.imv.kiev.ua

²Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины,
ул. Заболотного 148, г. Киев, 03680, Украина e-mail: ysheludko@ukr.net

ИССЛЕДОВАНИЕ РЕПРОДУКЦИИ ВИРУСА ОЖОГА ГРЕЧИХИ В ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЯХ ТАБАКА, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ ГЕН ИНТЕРФЕРОНА АЛЬФА 2b ЧЕЛОВЕКА

Вирусные болезни растений являются важной проблемой сельского хозяйства. Вирусы способны резко снижать урожайность и ухудшать качество продукции ценных сельскохозяйственных культур. К настоящему времени разработаны новые подходы к стратегии защиты растений от вирусной инфекции, одним из которых является изучение развития вирусной инфекции в растительном организме, экспрессирующем ген интерферона человека. Интерфероны являются неспецифическими факторами защиты клеток от широкого спектра ДНК- и РНК-содержащих вирусов животных [1]. Существуют также данные, что интерферон после экзогенной обработки может повышать устойчивость растительных клеток к вирусным заболеваниям [2-4]. Антивирусный эффект был продемонстрирован и в результате экспрессии генов α - и β -интерферона в трансгенных растениях [5, 6]. С другой стороны, в ряде работ отмечено отсутствие достоверного защитного эффекта интерферона в растительных клетках [7, 8].

Целью настоящей работы являлось изучение восприимчивости растений табака, экспрессирующих ген интерферона человека, к фиторабдовирусу — вирусу ожога гречихи (ВОГ). Интерес использования минус-генного ВОГ мотивирован тем, что механизм его репродукции отличается от ранее изученных плюс-генных фитовирусов. Кроме того, ВОГ поражает ценные сельскохозяйственные культуры, в том числе гречиху, картофель, томаты, табак [9]. Полученные данные могут указать возможный механизм приобретения вирусостойчивости растений к фиторабдовирусам. В работе также было исследовано влияние вирусной инфекции на продукцию рекомбинантного интерферона в трансгенных растениях табака. Исследование накопления целевого белка при развитии вирусной инфекции в трансгенных растениях имеет значение для промышленной биотехнологии.

Материалы и методы

В работе использованы растения табака *Nicotiana tabacum* сорта Wisconsin, несущие рекомбинантный (с растительным сигналом выведения белка в апопласт) или нативный ген интерферона альфа 2b человека (*inf b2b*) [10] и растения табака, несущие, помимо гена *inf b2b* (с растительным транспортным сигналом), ген *cry3A* (устойчивость к насекомым). Исполь-

зовали две линии табаков, несущих нативный ген *inf62b* (073/3, 073/9); три линии табаков, несущих ген *inf62b* с растительным транспортным сигналом (125/1, 125/2, 125/4), и три линии двойных трансформантов (125/150/1, 125/150/3, 125/150/9). Наличие трансгенов подтверждали ПЦР анализом. В качестве контроля использовали нетрансгенный табак сорта Wisconsin.

Трансгенные и контрольные растения табака инокулировали очищенным вирусным препаратом в концентрации 100 мкг/мл. В качестве контроля использовали растения табака, инокулированные буфером. Все растения, вне зависимости от визуальной оценки проявившейся на них вирусной патологии, были использованы для выделения ВОГ [11].

Сбор растительного материала и экстракцию белков проводили каждую неделю в течение месяца как описано в [10]. Для титрования интерферона была использована методика [12].

Результаты и обсуждение

В результате агробактериальной трансформации были получены трансгенные растения табака, несущие ген интерферона человека *inf62b* с разными транспортными сигналами [10], а также растения табака, несущие ген *inf62b* и ген *cru3A* устойчивости к насекомым. Наличие трансгенов в растениях было подтверждено ПЦР анализом, а активность интерферона в растительных экстрактах была подтверждена методом титрования интерферона. Для эксперимента были отобраны линии растений с высокой активностью интерферона. Экспрессия гена *inf62b* не сопровождалась видимыми изменениями фенотипа растений или задержкой их развития.

Мы показали существование фоновой интерфероноподобной активности в экстрактах нетрансгенных растений, которая, по всей вероятности, имеет фазовый характер (чередование уменьшения и увеличения активности). Такие же фазовые изменения обнаружены и в интерфероноподобной активности экстрактов трансгенных растений табака. В последнем случае антивирусная активность экстракта состоит из фоновой интерфероноподобной активности самого растения и активности, полученной вследствие экспрессии гена интерферона.

В первую неделю эксперимента наблюдали резкое изменение уровней интерфероноподобной активности как в опытных (исключение — линии 073/9 и 125/2), так и в контрольных (инокулированных буфером) экстрактах растений. Во всех экстрактах контрольных растений уровень активности снижался, что особенно заметно для линий 073/9, 125/1 и 125/2, у которых активность снизилась с 800 МЕ/мл до 13, 50 и 25 МЕ/мл, соответственно. Данные результаты могли быть следствием включения защитных систем растения в ответ на ранение (втирание буфера в листья). Одним из механизмов защиты от стрессовых факторов является временное изменение белкового профиля растения. В этом случае происходит ограничение синтеза типичных растительных белков и накопление стрессовых белков [13].

Изменение интерфероноподобной активности в экстрактах экспериментальных (зараженных вирусом) растений через неделю после инфициро-

вания имело другой характер. В растительных экстрактах, имеющих изначально высокий уровень активности (≥ 400 МЕ/мл), снижалась интерференоподобная активность в два и более раза (исключение — линии 073/9 и 125/2). Наоборот, в растительных экстрактах с изначально невысоким уровнем активности ≤ 200 МЕ/мл (на уровне неспецифической активности контроля), происходило увеличение интерференоподобной активности, в том числе и в экстракте нетрансгенного растения, до ≥ 400 МЕ/мл. Это особенно заметно для линии 125/150/1, интерференоподобная активность которой возросла до 800 МЕ/мл (рис. 1). Следует отметить, что через неделю после инокуляции интерференоподобная активность экстрактов опытных растений (в любом из вариантов) была выше, чем контрольных (исключение — линия 073/3).

Ко второй неделе после инфицирования интерференоподобная активность в экстрактах трансгенных растений начинает снижаться (кроме линии 125/150/9). Уровень интерференоподобной активности контроля в это время не изменяется и остается на уровне 400 МЕ/мл. Накопление вируса в это

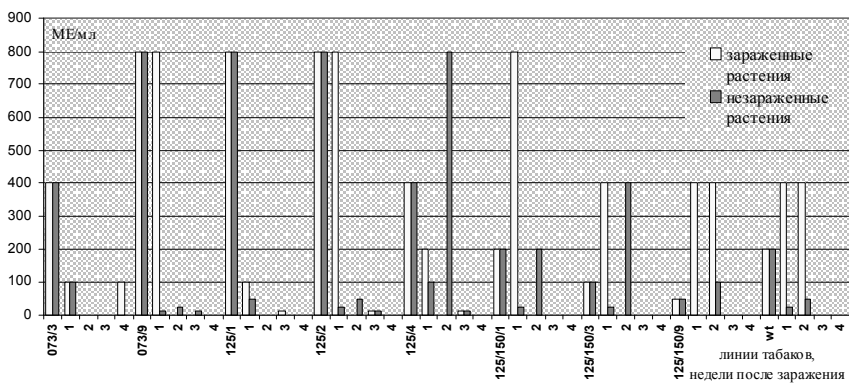


Рис. 1. Интерференоподобная активность у экстрактов растений

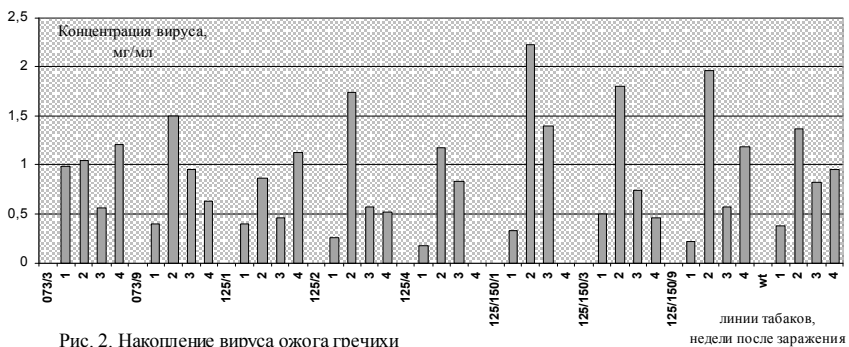


Рис. 2. Накопление вируса ожога гречихи

время достигает максимальных значений для большинства трансгенных линий (исключение — 073/3 и 125/1) и нетрансгенного контроля (рис. 2). В это время появляются симптомы вирусной инфекции на верхних листьях табаков.

В дальнейшем, вплоть до конца эксперимента (4-я неделя после заражения), интерферноподобная активность экстрактов всех опытных растений оставалась низкой. При этом в экстракты двух линий контрольных растений (125/4 и 125/150/3) к третьей неделе демонстрируют увеличение интерферноподобной активности, незначительный всплеск активности показан также для линии 125/150/1. Подобные данные свидетельствуют в пользу предположения, что ВОГ ингибирует накопление рекомбинантного интерферона, что и сказывается на интерферноподобной активности экстрактов. К третьей неделе происходит развитие симптомов вирусного заболевания по всему растению, а нижние зараженные листья отмирают.

К окончанию эксперимента количество вируса в некоторых линиях (125/2 и 125/150/3) значительно падает. Причиной этого может быть как приобретение устойчивости к ВОГ, так и гибель инфицированных тканей. Последний факт, по-видимому, явился причиной некротизации растений линий 125/4 и 125/150/1.

Интересно наличие интерферноподобной активности в нетрансгенных растениях табака. Результаты проведенных исследований показали угнетение репродукции вируса везикулярного стоматита в культуре перевиваемых тестикул поросят на уровне 400 МЕ/мл. Эти данные можно объяснить тем, что в растениях табака присутствует ген, обладающий высокой степенью гомологии с геном β -интерферона человека. Экспрессия данного гена индуцируется в растениях при заражении вирусом табачной мозаики [14]. Возможно, экспрессия такого гена приводит к определению активности интерферона в системе *in vitro*. Этот вопрос требует дальнейшего изучения.

Выводы

Исследована динамика репродукции вируса ожога гречихи растениях табака, экспрессирующих ген интерферона альфа 2b человека. Показано, что высокий уровень накопления вируса коррелирует с низким уровнем экспрессии гена интерферона. Устойчивость к ВОГ у трансгенных растений табака достоверно не отличается от таковой у контрольных растений. Полученные данные имеют значение для дальнейшего изучения ВОГ, а также для изучения поведения трансгенов и накопления целевого белка в растении при развитии вирусной инфекции.

Литература

1. Goodbourn S., Didcock L. Interferons: cell signaling, immune modulation, antiviral responses and virus countermeasures // J. of General Virool.— 2000.— V.81.— P. 2341–2364.
2. Orshansky P., Rubinstein M., Sela I. Human interferons protect plants from virus infection // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1982.— V.79.— P. 2278–2280.

3. *Огарков В.И., Каплан И.Б., Тальянский М.Э., Атабеков И.Г.* Подавление репродукции вирусов картофеля под влиянием интерферона человека // Докл. АН СССР.— 1984.— Т.276, №3.— С. 743–745.

4. *Rosenberg N., Reichman M., Sela I.* Antiviral activity of natural and recombinant human leukocyte interferons in tobacco protoplasts // *Viol.*— 1985.— V.140.— P. 173–178.

5. *Смирнов С.П., Крашенинникова Л.В., Пухальский В.А.* Устойчивость к вирусу табачной мозаики у трансгенных растений табака, продуцирующих α -интерферон человека // Докл. АН СССР.— 1991.— Т.317, №3.— С. 732–734.

6. *Рывкин М.И., Дейнеко Е.В., Комарова М.Л., Кочетов А.В., Шумный В.К.* Оценка вирусоустойчивости трансгенных растений табака и люцерны, несущих ген β -интерферона человека // Докл. АН СССР.— 1993.— Т.331, №5.— С. 652–654.

7. *Huisman M.J., Broxterman H.J.* Human interferon does not protect cell protoplasts against infection with alfa-alfa mosaic virus // *Viol.*— 1985.— 143, №4.— P. 622–625.

8. *Edelbaum O., Stein D., Holland N. et al.* Expression of active human interferon- β in transgenic plants // *J. of Interferon Res.*— 1992.— V.12, №4.— P. 449–453.

9. *Шевчук В.К., Довгань С.В., Діденко Л.Ф. та ін.* Вірусний опік гречки // Карантин і захист рослин.— 2008.— №11.— С. 13–15.

10. *Шелудько Ю. В., Герасименко И. М., Щербак и др.* (2009) Перспективы для применения в ветеринарной медицине трансгенных растений, синтезирующих физиологически активный интерферон $\alpha 2b$ человека. Ветеринарна медицина. Збірник наукових праць / Ред. Стегній Б.Т.: Харків, ТОВ “НТМТ”.— 2009.— Т.92.— С. 528–531.

11. *Мандріка Т.Ю., Серденко О.Б., Діденко Л.Ф., и др.* Характеристика бациллоподобного вирусу плямистості айру // Мікробіологічний журнал.— 2007.— Т.69, №5.— С. 49–58.

12. *Белоцкий С.М., Спивак Н.Я.* Интерфероны: биологические и клинические эффекты.— К.: Фитосоцицентр, 2006.— 288 с.

13. *Sembdner G.* The biochemistry and the physiological and molecular actions of jasmonates // *Ann. Rev. of Plant Physiol. and Plant Mol. Biol.*— 1993.— V.44.— P. 569–589.

14. *Sela I., Grafi G., Sher N., Edelbaum O., Yagev H., Gerassi E.* Resistance Systems Related to the *N* Gene and their Comparison with Interferon. In: *Plant Resistance to Virus.* Ciba Foundation Symposium, 1987.— P. 109–112.

Резюме

Было проведено исследование динамики репродукции минус РНК-геномного фиторабдовируса — вируса ожога гречихи в растениях табака, экспрессирующих ген интерферона альфа 2b человека. Показано, что по сравнению с нетрансгенным контролем трансгенные растения табака не проявляют устойчивости к ВОГ.

Було проведено дослідження динаміки репродукції мінус РНК-геномного фіторабдовирусу — вірусу опіку гречки (ВОГ) у рослинах тютюну, які експресують ген інтерферону альфа 2b людини. Показано, що в порівнянні із нетрансгенним контролем, трансгенні рослини тютюну не проявляють стійкості до ВОГ.

Dynamics of RNA-minus genome phytorhabdovirus (burn of buckwheat virus (BBV) reproduction in tobacco plants expressing human alpha 2b interferon was studied. It was shown that transgenic as well as non-transgenic plants do not demonstrate BBV resistance.

СУПРУН С.М., ДОНЧЕНКО Г.В., ПАРХОМЕНКО Ю.М., *КУРЧЕНКО И.Н., *ХАРКЕВИЧ Е.С., *НОГИНА Т.М., КУЧМЕРОВСКАЯ Т.М.

Институт биохимии им. А. В. Палладина НАН Украины, Украина, 01601, Киев, ул. Леонтовича, 9, e-mail:sst @biochem.kiev.ua

**Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАНУ, Украина, Киев, ул. Заболотного, 154.*

БИОТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ КОФЕРМЕНТА А (СОА)

Кофермент А (СоА) является одним из важнейших коферментов осуществляющих перенос ацильных групп чрезвычайно необходимых в процессах клеточного метаболизме, особенно в биосинтезе жирных кислот. Учитывая его важную роль в обмене веществ, внимание исследователей привлекает СоА, в качестве потенциального препарата, который может обладать корригирующими при нарушениях клеточного метаболизма, вызванных различными заболеваниями (ишемическая болезнь сердца, острые нарушения мозгового кровообращения, атеросклероз, сахарный диабет и т.п.). Экспериментальными исследованиями было показано, что дисульфид СоА и его предшественники могут использоваться в лечебных целях [1]. Однако, получение кофермента А с применением химического синтеза в промышленном масштабе достаточно сложный и не эффективный процес. Не исключено, что хорошей альтернативой ему может быть биотехнологический способ получения препарата, который является более рентабельным и широко используется у высоко развитых странах. При этом наиболее эффективными с точки зрения биотехнологии получения СоА оказались штаммы *Brevibacterium* обладающие высокой биосинтетической активностью, которые начали широко использовать [2, 3]. В качестве потенциального источника СоА в последние годы большое внимание уделяется грибам, которые богаты на разнообразные биологически активные вещества, многие из которых нашли применения для получения лекарственных средств. [4–6]. В связи с эти поиск новых продуцентов сверхпродуцентов СоА, пантотеновой кислоты (ПАК) и других биологически-активных соединений остается актуальным. Преимущество грибов состоит в том, что они нетребовательны к субстрату для культивирования, устойчивы к изменениям природных условий и достаточно технологичны. Цель данного исследования — разработка биотехнологии получения СоА на основе селекционированных штаммов-продуцентов.

Материалы и методы

Нами был проведен скрининг штаммов-продуцентов СоА и его предшественников среди различных таксономических групп микромицетов и бактерий коллекции культур микроорганизмов Института микробиологии и вирусологии. Для определения СоА микромицеты выращивали глубинным способом на синтетической среде Чапека на качалках при 240 об/мин в течение 3-х суток, в то время как бактерии выращивали в течении двух суток на среде Хоттингера с 1,5% пептона и 1% дрожжевого экстракта. Селекцию штамма продуцента *Corynebacterium ammoniagenes B-6* — прово-

дили с использованием различных методов мутагенеза (обработка клеток нитрозогуанидином, 2% раствором 2-дезоксид-Д-глюкозы, ультрафиолетом в разных дозах), с последующим применением метода тотального отбора. Содержание биологически активных веществ в грибах и в препарате определяли на основании отработанных методов, приведенных в справочнике по микологии [7]. Пантотеновую кислоту, тиамин, биотин определяли микробиологическим методом, никотиновую кислоту и витамин Е — спектрофотометрическим [8]. Кофермент А определяли спектрофотометрически по модифицированному методу Garland [9] в сопряженной реакции с изолированным из печени свиньи α -кетоглутарат — дегидрогеназным комплексом. Для приготовления полиферментного препарата в виде микробиальных сухих клеток *Corynebacterium ammoniagenes* культивировали в течение 48 час при температуре 28–32 °С на среде следующего состава (%): глюкоза-1, пептон-1, K_2HPO_4 — 0,3, NaCl — 0,2, $MgSO_4$ — 0,02, дрожжевой экстракт — 0,1, pH 7,0–7,5. Накопление биомассы оценивали с помощью взвешивания или нефелометрическим методом с последующим пересчетом на абсолютно сухую массу. Полученную путем центрифугирования влажную биомассу промывали физиологическим раствором, затем обрабатывали охлажденным уксусом (в соотношении 1:10). Клетки подсушивали в эксикаторе. Сухие клетки хранили в морозильной камере при –18 °С. Инкубирование клеток (150–200 мг/мл) осуществляли согласно стандартного метода при постоянном перемешивании (140 об/мин) при температуре 30–32 °С в течение 15–17 час в реакционной среде следующего состава: ПАК-5 мкМ, АТФ-Na-15 мкМ, $MgSO_4$ 7 H₂O-10 мкМ, L-цистеин 10 мкМ в 0,1 М калий фосфатном буфере, pH 6,5–7,0. Выделение и очистку CoA-дисульфида осуществляли с использованием хроматографии на анионообменниках типа DEAE-целлюлозы.

Результаты и обсуждение

Способность микромицетов синтезировать CoA была изучена на основе отобранных ранее штаммов сверсинтетиков пантотеновой кислоты. Среди представителей микромицетов принадлежащих к роду *Fusarium*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Mycelia* селекционирован штамм *Fusarium sambucinum* ИМВ F-10011 с сверхсинтезом CoA. Отобранный штамм также обладал способностью сверхсинтеза некоторых витаминов, значительным образованием ненасыщенных жирных кислот (арахидоновой, олеиновой) и других биологически активных веществ, табл. 1.

Изучен экзо- и эндоцеллюлярный синтез CoA в процессе роста гриба-продуцента. Значительный биосинтез CoA отмечен в экспоненциальной фазе роста, максимальная скорость роста гриба (μ -02 час⁻¹). Установлено, что внесение добавок (пептона, дрожжевого экстракта, зернового экстракта) в 1,5–2 раза увеличивало биосинтез CoA. Среди коллекционных культур бактерий (*Brevibacterium*, *Micrococcus*, *Corynebacterium*) отобран штамм *Corynebacterium ammoniagenes*, синтезирующий значительные количества CoA. Проведена селекция штамма позволила отобрать 120 вариантов для

Таблица 1

Биосинтез CoA и других биологически активных веществ штаммом *Fusarium sambucinum* при культивировании на среде Чапека

Витамины, мкг/г							Хитин, %
Тиамин	Никотиновая кислота	Пантотеновая кислота	Биотин	α -токоферол	CoA	NAD	
4,0–4,5	280–360	420–600	5,6–6,1	7,8–10,0	420	400	12,9

Таблица 2

Влияние ПАК и ее производных на биосинтез CoA

№ п/п	Наименование предшественника	Содержание CoA г/л
1	D-ПАК, Са-соль	3,7
2	D-пантолактон	0
3	Бета-аланин	0
4	D- пантотениловый спирт	0
5	ФПК	8,0
6	Циклофосфо-ПАК	1,7
7	D-пантетин	2,8
8	S-сульфопантетин	1,4

выявления среди них таковых с повышенным синтезом CoA. Выявлен активный вариант, который продуцировал кофермента А на 40% больше по сравнению с исходным. Штамм *Corynebacterium ammoniagenes B-6* депонирован и хранится в коллекции промышленных микроорганизмов ВНИИ генетики (Москва, Россия), а также в коллекции культур микроорганизмов Украины (Институт микробиологии и вирусологии НАНУ) Известно, что для повышения выхода витаминов, ферментов и других биологически активных веществ, а также улучшения технологических показателей используют совместное культивирование. В наших исследованиях для совместного культивирования *Brevibacterium ammoniagenes* использован штамм *Fusarium sambucinum* как источник пантотеновой кислоты, АТР и других биологически активных веществ. Культивирование проводили на среде Чапека с внесением 1,5% пептона и 1% дрожжевого экстракта, после 24 часов культивирования к *Fusarium sambucinum* подсеивали *Corynebacterium ammoniagenes* с последующим культивированием до 48 часов. Выход CoA увеличился в 1,5 раза.

Было изучено влияние ПАК и ее производных на биосинтез CoA, табл. 2. Как видно из результатов опыта, только использование ПАК, 4-фосфопантотената кальция (ФПК) вместо ПАК способствовало повышению концентрации CoA в инкубационной среде по сравнению с ПАК. Другие производные, такие как D-пактолактон, D-пантотениловый спирт не являлись субстратами для данной полиферментной системы.

Проведенные исследования позволили разработать биотехнологический способ получения СоА на основе штамма *Corynebacterium ammoniagenes* с внесением в культуральную среду экзогенных химически синтезированных предшественников. Образцы клеток, в которых концентрация СоА была не менее 2,0–2,5 мг/мл объединяли и после инкубации клетки отделяли центрифугированием после чего определяли СоА. В результате биосинтетической реакции получали смесь, состоящую из СоА, его предшественников или продуктов их трансформации, неорганических солей. Разработанный метод позволил получить препараты СоА с содержанием кофермента до 90%. Селекционированные штаммы могут быть использованы для получения СоА в промышленных условиях, что же касается штамма *Fusarium sambucinum*, то он может найти применение для получения различных пищевых добавок.

Выводы

Таким образом нами выявлены штаммы-продуценты СоА среди различных таксономических групп микроорганизмов. Наиболее активные биосинтетики СоА найдены среди *Corynebacterium*. Получен сверхсинтетик *Corynebacterium ammoniagenes*. Проведенная селекция с использованием методов мутагенеза штамма *Corynebacterium ammoniagenes* позволила получить вариант кофермента А на 40% более активный по сравнению с исходным. Изучение влияния ПАК и ее производных на биосинтез СоА у *Corynebacterium ammoniagenes* показало, что ФПК способствовало повышению концентрации СоА в инкубационной среде в 2–3 раза. Разработан биотехнологический способ получения СоА на основе микробных клеток продуцента в сочетании с химически синтезированными предшественниками.

Литература

1. *Копелевич В.М., Цибульская М.И., Ковлер М.А., Гунар В.И.* Кофермент А. Методы получения и применения в медицине // Лек. Средства. Эк. Техн. Перспективы получения.— М.: 1989.— В.5.— С. 1–30.
2. *Копелевич В.М., Гунар В.И.* Химия природных соединений.— 1989.— №4.— С. 477–492.
3. *Поморцева Н.В.* Перспективы получения витаминов и коферментов с помощью микроорганизмов // Химико-фармацевтический журнал.— 1986.— В.8.— С. 965–974.
4. *Shimizu S., Yamada H.* 3-Eur. Congr. Biotechnol. Munchen.— 1984.— V.1.— P. 10–14.
5. *Wainwright M.* Novel use of fungi in biotechnology // Chem.— 1990.— №2.— P. 131–134.
6. *Hoobs Ch.* Medicinal mushrooms an exploration of tradition healing and culture.— Botanica press. Santa Cruz, С.А.— 1995.— 251 p.
7. *Билай В.И.* Методы экспериментальной микологии.— К.: Наукова думка, 1982.— С. 261–268.
8. *Островский Ю.М.* Экспериментальная витаминология.— Минск, Наука и техника.— 1979.— 546 с.
9. *Клинов С.В., Клинова Н.И., Цибульская М.И., Суворова Е.Е. и др.* // Биотехнология.— 1990.— №6.— С. 94–96.

Резюме

Среди различных таксономических групп микроорганизмов — митоспоровых грибов и бактерий были селекционированы штаммы продуценты CoA *Fusarium sambucinum* и *Corynebacterium ammoniagenes*. С применением методов мутагенеза получен сверхсинтетик *Corynebacterium ammoniagenes B-6*. Разработан биотехнологический способ получения CoA на основе микробных клеток-продуцента в сочетании с химически синтезированными предшественниками, что позволит получать препараты CoA с высоким его содержанием.

Серед різних таксономічних груп мікроорганізмів — мітоспорових грибів та бактерій були селекціоновані штами продуценти CoA *Fusarium sambucinum* і *Corynebacterium ammoniagenes*. З використанням методів мутагенезу одержано надсинтетик *Corynebacterium ammoniagenes B-6*. Розроблено біотехнологічний засіб одержання CoA на основі микробних клітин-продуценту в поєднанні з хімічно синтезованими попередниками, що дозволить отримувати препарати CoA з його високим вмістом.

We have selected CoA producers strains *Fusarium sambucinum* and *Corynebacterium ammoniagenes* among different taxonomic groups of microorganisms — mitospore fungi and bacteria. It was obtained CoA supersynthetic strain *Corynebacterium ammoniagenes B-6* using mutagenic methods. The biotechnological method of CoA production was developed based on microbial producer cells in cooperation with chemically synthesized precursors. This method will allow to produce CoA preparations with its high content.

ТРЕТЬЯКОВА И.Н.

Учреждение академии наук, Институт леса им.В.Н.Сукачева

Россия, 660036, Красноярск, Академгородок, e-mail: culture@rsc.krasn.ru

ЭВОЛЮЦИОННЫЕ АСПЕКТЫ РЕПРОДУКТИВНОГО ПРОЦЕССА ХВОЙНЫХ *IN VIVO* И В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

У представителей хвойных растений потенциально заложены множественные пути реализации их репродуктивного потенциала: наличие полиархегониальности, кливажа и полиэмбрионии, а также возможность асексуального возникновения зародыша (Минина, Ларионова, 1979; Третьякова, 1990). В развитии гаметофита от архегоният к *Coniferales* в филогенезе прослеживаются следующие тенденции: 1 — постепенная ликвидация заростка; 2 — акселерация генеративного цикла; 3 — акселерация гаметофитогенеза; 4 — усиление физиологической активности гаметофита; 5 — проявление апомиксиса. Последний наиболее часто встречается у прогрессивных и высокоорганизованных семейств покрытосеменных растений (Хохлов, 1970; Минина, Ларионова, 1979).

Цель данной работы — проанализировать особенность репродуктивного процесса у хвойных видов *in vivo* и в культуре *in vitro* и обсудить возмож-

ность применения эмбриологических признаков для эволюционных построений у данного класса растений.

Материал и методы

В исследованиях были использованы хвойные виды — *Pinus sibirica*, *Pinus pumila*, *Pinus sylvestris*, *Larix sibirica*, *Abies sibirica*, *Picea obovata*, *Picea ajanensis*, произрастающие в естественных древостоях и клоновых плантациях Сибири: Западного и Восточного Саяна, хребта Хамар-Дабан и Кузнецкого Алатау.

В течении вегетационного периода проводили периодический сбор образцов семян у хвойных видов для цитозембриологического анализа и ввода зародышей семян в культуру *in vitro*. Цитозембриологические исследования вели на парафинированных постоянных и временных препаратах (Паушева, 1980). Просмотр микроскопических образцов осуществляли на микроскопе МБИ-6.

Для инициации соматического эмбриогенеза из зиготических зародышей хвойных видов использовали базовые среды 1/2 MS (Murashige Scoog, 1962), MSG (Vecwar et al., 1990) и MA (неопубликованные данные), с добавлением мезоинозита (1 г/л), аскорбиновой кислоты (0,4 г/л), казеина (1 г/л), глутамина (0,5 г/л), сахарозы (30 г/л) и агара (7 г/л)). В качестве регуляторов роста использовали 2,4-Д (2 мг/л) и БАП (1 мг/л).

Для пролиферации полученной эмбриональной массы применялась базовые среды с уменьшенной в 2 раза концентрацией цитокининов. Эксперименты по вызреванию соматических зародышей выполняли на базальных средах, содержащих, АБК (60–120 мМ) и ПЭГ (5–10%) в различных вариациях

Результаты и обсуждение

Онтогенез женского гаметофита семейства сосновых (Pinaceae) зависит от продолжительности генеративного цикла. У видов с однолетним генеративным циклом (*Larix*, *Picea*, *Abies*) гаметогенез занимает 30–40 дней, у видов с двухлетним генеративным циклом (*Pinus*) до 1 года. Разница в сроках формирования гаметофита обусловлена значительной растянутостью свободной стадии развития у рода *Pinus*. Одним из признаков в эволюционной продвинутости таксонов является темп развития женских генеративных структур на период опыления (Третьякова, 1991). Этот признак можно рассматривать как начальный этап взаимодействия мужского и женского гаметофитов в семяпочке, свидетельствующий об относительной автономности развития гаметофитов или их тесном взаимодействии. У сосновых с однолетним генеративным циклом на период опыления семяпочки макроспорогенез заканчивался или развивался свободнойядерный женский гаметофит (ценоцитная стадия развития). Семяпочки у таких видов могли развиваться и формировать пустые семена при отсутствии в них мужского гаметофита. Развитие эмбриологических структур у семяпочек *Pinus sibirica* приближается к хвойным с однолетним генеративным циклом. На период опыления в семяпочках идет макроспорогенез или развивается женский гаметофит, Неопыденные

семяпочки *Pinus sibirica* могут трансформироваться в мелкие недоразвитые семена. Семяпочки *Pinus sylvestris* по развитию на период опыления отстают от семяпочек *Larix*, *Picea*, *Abies* и *Pinus sibirica*, так как имеет лишь макроспороцит. Неопыленные семяпочки *Pinus sylvestris* не развиваются.

Факты акселерации развития гаметофитов и, в целом женских шишек, периодически встречаются у деревьев *Pinus sibirica* в Западном Саяне. Такие формы деревьев формируют женские шишки и семена в течение одного вегетационного периода (вместо двух). Акселерация идет за счет сокращения свободноядерной стадии развития женского гаметофита, которая осуществляется за 30–40 дней (также как у *Larix*, *Picea*, *Abies*). Однако оплодотворение зрелых яйцеклеток у особей *Pinus sibirica* с ускоренным генеративным циклом не происходит из-за несовместимости мужских и женских гамет (Третьякова, 1990). Как правило яйцеклетки таких семяпочек подвергаются гаплоидному делению, т.е. встают на путь партеногенеза. Иногда наблюдается формирование проэмбрио, но развитие зародыша не происходит. Беззародышевые семена гетерозисных форм образуют развитый эндосперм. Физиолого-биохимические исследования аномальных особей *Pinus sibirica* показали, что вегетативные и генеративные органы их характеризуются высоким физиолого-биохимическим потенциалом, проявляющимся в углеводном, аминокислотном и гормональном обмене (Минина, Ларионова, 1979).

Имеются немногочисленные литературные данные, свидетельствующие о встречаемости апомиксиса у голосеменных растений (Минина, Ларионова, 1979). Образование семян без оплодотворения было обнаружено у ряда видов сосен *Pinus pinaster*, *Pinus nigra*, *Pinus wallichiana* (Saxton, 1909; Mehra Dogra, 1975) и *Pseudotsuga menziesii* (Ort-Ewing, 1957). Явление, близкое к апомиксису, было выявлено у *Abies pindrow*, у которой происходило слияние ядра брюшной канальцевой клетки с ядром яйцеклетки (Dogra, 1966). Сходное с апомиксисом явление — партеноспермия, или формирование семян без оплодотворения, описывалось у различных видов лиственниц, можжевельников, пихты европейской, ели обыкновенной, дуглассии и, значительно реже, у сосны обыкновенной (Минина, Ларионова, 1979). Партеноспермия могла выражаться в разрастании шишек без семян и образовании семян разной степени сформированности.

Мининой Е.Г. было высказано предположение о том, что возникновение элементов апомиксиса у хвойных происходит при нарушении семеношения дерева, особенно часто проявляющегося у аномальных форм *Pinus sibirica* с однолетним генеративным циклом, обладающих высокой физиолого-биохимической активностью тканей. Все это свидетельствует о эволюционной продвинутости таких форм (Минина, Ларионова, 1979), а также эволюционной продвинутости *Pinus sibirica* в системе рода *Pinus* (Третьякова, 1991).

Индукцию апомиксиса, как у покрытосеменных, так и голосеменных растений можно вызвать веществами гормональной природы, экстремальными температурами, облучением и другими факторами. Так, у сосны ладанной (*P. taeda*) и сосны румелийской (*P. peuce*) при опрыскивании растворами

ГК неопыленных женских шишек наблюдалось их разрастание (Stuard, Cathey, 1961). При обработке дуглассии растворами ИМК и ГК происходило образование вполне развитых семян (Stettler et al., 1969). Таким образом предпосылки для возникновения растительных организмов асексуально (минуя половой процесс) у голосеменных в природных условиях встречаются и они могут быть индуцированы обработкой фитогормонами и особенно в культуре *in vitro*.

Кроме того, хорошо известно, что для семязпочек голосеменных растений характерно наличие полиархеогониальности и полиэмбрионии (Singh, 1978). Оплодотворение двух и более яйцеклеток в пределах семязпочки хвойных и последующий кливаж клеток зиготического зародыша приводит к возникновению многозародышевости, полученной от разных “отцов” в одном мегагаметофите (у видов *Pinus* до 16) (Третьякова, 1990). Реализация этого репродуктивного потенциала широко проявляется в экспериментальных условиях культуры *in vitro*, и, прежде всего, через соматический эмбриогенез.

Соматический эмбриогенез был индуцирован у родов *Pinus*, *Picea*, *Abies* и *Larix*, не только из зиготических зародышей и семядолей прорастающих семян, а также вегетативных побегов (Lelu, 1994; Lelu-Walter et al, 2009; Klimaszewska, Cyr, 2002; Stasolla et al, 2002). Экспериментальным путем было показано, что соматический эмбриогенез — процесс многоступенчатый, включающий применение разнообразных химических соединений и многочисленных различных предобработок. Он включает: индукцию эмбриогенного каллуса (эмбриональной массы), пролиферацию эмбриогенной массы, созревание соматических зародышей, прорастание зародышей и формирование регенерантов.

Индукция эмбриогенного каллуса у представителей хвойных видов проявлялась в появлении эмбрионально-суспензорной массы (ЭМ), состоящей из эмбриональных трубок и инициалей эмбрио. Возникновению ЭМ предшествовало резкое увеличение длины соматических клеток, которые подвергались асинхронному делению и формировали на одном из полюсов маленькие эмбриональные клетки. Пролиферация ЭМ приводила к образованию отдельных клеточных конгломератов, активно продуцирующих новые эмбриональные глобулы и эмбриональные трубки, из которых при дальнейшем развитии образовывался суспензор. Процесс пролиферация ЭМ идет от 1 мес. до 2 лет. При этом периодический перенос кусочков эмбриогенного каллуса на безгормональную среду (на 1 нед.), а затем на среду с АБК, способствовал вызреванию соматических зародышей. У *Larix sibirica* соматические зародыши вызревали в течении 1–1,5 мес., у *Picea ajanensis* — 2 мес. у *Pinus sibirica* 3–4 мес. Весь процесс регенерации через соматический эмбриогенез у *Larix* и *Picea* занимал 4–6 мес., у *Pinus sibirica* 7–10 мес. Полученные соматические зародыши не отличались от зиготических зародышей и имели ярко-выраженную полярную структуру. Соматический эмбриогенез у хвойных растений повторяет путь развития половых зародышей: проэмбриогенез, ранний эмбриогенез и поздний эмбриогенез.

Соматический эмбриогенез наиболее успешно инициировался из незрелых зиготических зародышей введенных в культуру на стадии развития примордиев семядолей. При этом образование ЭМ происходило в области прилегания зародышевого корешка к суспензору зиготического зародыша. Вероятно, клетки этой зоны являются наиболее активными, и не исключено, что они представляют собой стволовые клетки, способные к неограниченному росту в культуре *in vitro*.

Успешность соматического эмбриогенеза тесно связана с генотипом донорского растения. Зародыши семян с плюсовых деревьев и гибридных семян, полученные в результате опыления клонов пыльцой, взятой с деревьев *Pinus sibirica* с однолетним генеративным циклом более активно формировали ЭМ и соматические зародыши, в то время как экспланты других деревьев не способны образовывать подобные структуры в культуре *in vitro*. У деревьев *Larix sibirica*, устойчивых к листовенничной почковой галлице получено 5 клеточных линий, которые могут неограниченно долго пролиферировать и формировать соматические зародыши и регенеранты. Не исключено, что гетерозисные деревья, обладающие высоким репродуктивным потенциалом и проявляющие признаки апомиксиса, будут наиболее перспективными при введении в культуру *in vitro* с целью получения соматических зародышей и создания банка пролиферирующего эмбриогенного каллуса при проведении генетико-селекционных исследований.

Выводы

Наличие полиархеогониальности, кливажа, полиэмбрионии и признаков апомиксиса, а также возможность клонирования через соматический эмбриогенез в культуре *in vitro* у хвойных видов свидетельствует об их высоком репродуктивном потенциале.

Периодическая встречаемость в популяциях генотипов *Pinus sibirica* с акселерацией генеративного цикла, а также выявление генотипов, потомство которых обладает высокой регенерационной способностью в культуре *in vitro* через соматический эмбриогенез, может дать материал не только для массового тиражирования улучшенных форм хвойных растений, но и для эволюционных построений.

Вероятно, что в ходе эволюции у хвойных, наряду с половым размножением, возникли типы бесполого (вегетативного) размножения, направленные на сохранение вида. Не исключено, что множественные пути реализации репродуктивного потенциала, вероятно архивированы у хвойных видов.

Литература

1. Минина Е.Г., Ларионова Н.А. Морфогенез и пол у хвойных.— М.: Наука.— 1979.— 216 с.
2. Паушева З.П. Практикум по цитологии растений.— М.: Колос.— 1980.— 34 с.
3. Третьякова И.Н. Эмбриология хвойных (Физиологические аспекты).— Новосибирск: Наука.— 1983.— 157 с.
4. Третьякова И.Н. Об эволюции гаметофита в семействе Pinaceae. Общебиологические аспекты филогении растений.— М.: Наука.— 1991.— С. 103–105.

5. Хохлов С.С. Апомиксис: классификация и распределение у покрытосеменных растений. Апомиксис и селекции.— М.: Наука.— 1970.— С. 7–21.

6. Вецвар М.Р., Нагмани Р., Ванн С.Р. Initiation of embryogenic cultures and somatic embryo development in loblolly pine (*Pinus taeda*) // Can. J. For. Res.— 1990.— Vol.20.— P. 810–817.

7. Dogra P.D. Observation on *Abies pindrow* with a discussion on the question of occurrence of apomixes in Gymnosperms // *Silvae Genet.*— 1966.— Vol.15, N1.— P. 1–20.

8. Lelu M.A., Bastien C., Klimaszewska K., Ward C., Charest P.J. An improved method for somatic plantlet production in hybrid larch (*Larix x leptoeuropaea*): Part I. Somatic embryo maturation // *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*— 1994.— Vol.36.— P. 107–115.

9. Lelu-Walter M.-A., Paques L.E. Simplified and improved somatic embryogenesis of hybrid larches (*Larix x eurolepis* and *Larix x marschlinii*). Perspectives for breeding // *Ann. For. Sci.*— 2009.— Vol.66.— P. 104.

10. Klimaszewska K., Cyr D.R. Conifer somatic embryogenesis: I. Development // *Dendrobiology.*— 2002.— Vol.48.— P. 31–39.

11. Mehra P.N., Dogra P.D. Embryogeny. of Pinaceae. I Prombryogeny // *Proc. Indian. Nat. Sci. Acad.*— 1975.— 41, N5.— P. 406–409.

12. 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.

13. Orr-Ewing A.L. Possible occurrence of viable unfertilized seeds in Douglas — fir. *Forest Sci.*— 1966.— Bd.26.— P. 73–77.

14. Saxton W.T. Partenogenesis in *Pinus pinaster* // *Bot. Gaz.*— 1909.— Vol.47, N1.— P. 192–194.

15. Stasolla C., Yeung E. Recent advances in conifer somatic embryogenesis: improving somatic embryo quality // *Plant Cell. Tiss. Organ Cult.*— 2003.— Vol.74.— P. 15–35.

16. Singh H. Embryology of gymnosperms.— Berlin: Stuegard; Gebruder Borntraeger.— 1978.— P. 187–241.

17. Stettler R.F., Bawa K.S., Livingstone G.K. Experimental induction of haploid parthenogenesis in forest tree. Induced mutations in plants.— Vienna: Intern. Atomic Energy Agency.— 1969.— P. 611–619.

18. Stuard W.N., Cathey H.M. Applied aspects of the gibberellins // *Annu. Rev. Plant Physiol.*— 1961.— Vol.12.— P. 369–394.

Резюме

Цель работы заключалась в анализе особенностей репродуктивного процесса у хвойных видов *in vivo* и в культуре *in vitro* и обсуждении возможности использования эмбриологических признаков в эволюции данного класса растений. Наличие полиархеогонии, кливажа, полиэмбрионии и признаков апомиксиса, а также возможность клонирования через соматический эмбриогенез в культуре *in vitro* свидетельствует о высоком репродуктивном потенциале хвойных. Многовариантные пути реализации репродуктивного процесса, вероятно, архивированы у хвойных.

The aim of the studying is the analysis of peculiarities of reproductive processes in coniferous species and discussion of using embryological signs in evolution. A lot of archeogonia, cleavage, polyembryony, as also cloning by somatic embryogenesis in culture *in vitro* are due to the high reproductive potential of Conifer. Possible, a lot of variants of reproductive processes are archived in coniferous species.

**ФИЛИПЕНКО Е.А., СИДОРЧУК Ю.В., ЗАГОРСКАЯ А.А., ЖАРИКОВ Т.Ю.,
ДЕЙНЕКО Е.В.**

*Институт цитологии и генетики СО РАН, Россия, г. Новосибирск, 630090,
пр-т Лаврентьева, д. 10, e-mail: filipenko@bionet.nsc.ru*

АНАЛИЗ СПЕКТИНОМИЦИН-УСТОЙЧИВЫХ КАЛЛУСНЫХ ЛИНИЙ МОРКОВИ (*DAUCUS CAROTA*), ВЫДЕЛЕННЫХ ПРИ ХЛОРОПЛАСТНОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ

Технология получения трансгенных растений включает два принципиальных этапа. Первый связан с переносом и интеграцией чужеродного гена в геном растительной клетки. На втором этапе производится отбор трансформантов (по фенотипическим признакам) на селективных средах. Одним из антибиотиков, часто используемых в качестве селективного агента при создании транспластомных растений (с трансформированным хлоропластным геномом), является спектиномицин, действие которого приводит к нарушению синтеза хлоропластных белков. В этом случае генетическая конструкция, предназначенная для встраивания в хлоропластный геном, содержит ген *aadA*, кодирующий фермент аминогликозид-3'-аденилтрансферазу, который переводит спектиномицин в функционально неактивную форму — 3'-аденилилспектиномицин (1). При отборе на селективной среде с антибиотиком нетрансформированные растения обесцвечиваются, в то время как растения, в геном которых вошел трансген, остаются зелеными.

Длительный период культивирования растительных клеток на селективной среде может сопровождаться возникновением в хлоропластном геноме мутаций, обуславливающих резистентность к антибиотику (2–4).

Растения, обладающие устойчивостью к антибиотику вследствие произошедших в геноме спонтанных мутаций, фенотипически не отличимы от истинных трансгенных растений. Поэтому в работе по получению транспластомных растений необходимо учитывать вероятность появления растений, в пластомах которых появились мутации, и проводить дополнительный молекулярный анализ с целью их выявления и элиминирования.

При биобаллистической трансформации пластома моркови (*Daucus carota* L.) нами были выделены каллусные линии, резистентные к антибиотику спектиномицину. ПЦР-анализ не выявил наличия экзогенной ДНК в их геномах. Полученные результаты свидетельствуют, что устойчивость к антибиотику у каллусных линий моркови могла быть обусловлена спонтанными мутациями, возникшими как в пластидном, так и в ядерном геномах. В связи с этим целью данной работы являлось определение типа мутаций и их локализации в геномах выделенных линий.

Материалы и методы

Материалом для исследований служили устойчивые к спектиномицину каллусные линии, выделенные в ходе экспериментов по биобаллистической обработке каллусных культур клеток моркови плазмидой, содержащей ген устойчивости к спектиномицину *aadA*, и последующем отборе на среде с

добавлением антибиотика спектиномицина (100–500 мг/л). Выделение геномной ДНК проводили с использованием набора для выделения геномной ДНК “Genelute plant genomic DNA miniprep kit” (“Sigma”, США) согласно протоколу. ПЦР анализ проводили в 20 мкл буфера, содержащего 67 мМ трис-НСl (рН 8,9), 16 мМ (NH₄)₂SO₄, 1,5 мМ MgCl₂, 0,01% Твин-20, 100 мкМ дНТФ, 1 ед. активности *Taq*-полимеразы (“СибЭнзим”, Россия). Амплификацию фрагмента хлоропластного гена *rrn16* с 991 по 1245 позиции с праймерами **rr-car-1** 5'-ACAGGTGGTGCATGGCTGACG-3' и **rr-car-2** 5'-GAG GACGGGTTTTTGGAGTTAGC-3' осуществляли после предварительной денатурации при 94 °С 3 мин в течение 34 циклов в следующем режиме: 94 °С, 10 с, отжиг праймеров 62 °С, 10 с, элонгация — 72 °С, 15 с. Для контроля качества гидролиза эндонуклеазой *Aat*II амплифицированного фрагмента длиной 254 п.н. при конструировании праймера **rr-car-1** была произведена замена нуклеотида Т (в 1009 позиции гена *rrn16*) на нуклеотид А, которая привела к появлению дополнительного рестрикционного сайта. Амплификацию фрагмента хлоропластного гена *rrn16* с 920 по 1034 позиции после предварительной денатурации при 94 °С 3 мин. В течение 34 циклов в следующем режиме: 94 °С, 10 с, отжиг праймеров 66 °С, 20 с, элонгация — 72 °С, 20 с. Для создания сайта рестрикции *Sal*GI в амплифицированном фрагменте гена *rrn16* длиной 114 н.п. при конструировании праймера **cr-m1** были произведены 2 нуклеотидные замены: Т и С вместо С и Т (в 1015 и в 1016 позициях гена *rrn16*) соответственно: 5' AACACCTTACGGCACGAGTTCGA 3'. Для контроля качества гидролиза эндонуклеазой рестрикции *Sal*GI амплифицированного фрагмента в последовательности праймера **cr-m2** также были произведены нуклеотидные замены G и С вместо С и Т (в 930 и в 932 позициях гена *rrn16*) соответственно: **cr-m2** 5' GAAGAACCTTACCAGGGTCGACA-3'. Все амплификации проводили с добавлением матрицы ДНК в количестве 20–50 нг на амплификаторе “Терцик” (“ДНК-технология”, Россия).

Амплифицированные фрагменты ДНК (200–300 нг) гидролизовали эндонуклеазами рестрикции *Aat*II (амплифицированные фрагменты ДНК с использованием праймеров rr-car1 и rr-car-2) и *Sal*GI (амплифицированные фрагменты ДНК с использованием праймеров cr-m1 и cr-m2). Реакцию гидролиза проводили в объеме 20 мкл в течение ночи при добавлении 10 ед. эндонуклеазы рестрикции на 1 мкг ДНК в температурных условиях и буферах, соответствующих ферментам. Электрофорез фрагментов ДНК проводили в 8%-ном полиакриламидном геле в 0,5 x TBE буфере.

Нуклеотидные последовательности фрагментов ДНК определяли с использованием “ABI PRISM Big Dye Terminator v3.0 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit” (“Amersham”, Великобритания) в Межинститутском центре секвенирования (ИХБиФМ, СО РАН, г. Новосибирск). Анализ первичных последовательностей ДНК проводился с помощью программы BLAST и базы данных GenBank.

Результаты и обсуждение

Известно, что одной из причин возникновения устойчивости к спектиномицину у растений при культивировании на среде с добавлением антибиотика являются мутации, локализованные в двух разных районах хлоропластного гена *rrn16* — замена G на A в позиции 1012 гена и мутации в позициях 1138–1140, в результате чего происходит утрата сайта рестрикции *AatII* (2, 5). Это позволило нам предположить, что причиной устойчивости к антибиотику у выделенных нами каллусных линий моркови могли быть аналогичные мутации.

На основании данных о первичной нуклеотидной последовательности гена *rrn16 D.carota* (6) были сконструированы праймеры, специфичные к двум разным участкам этого гена, что позволило провести поиск мутаций.

ПДРФ анализ позволил выявить наличие мутаций в позиции 1012 гена *rrn16* у 6-ти из 10-ти проанализированных линий (рис. 1). У линий 2, 3, 5, 6, 7, 10 возникновение мутации в позиции 1012 приводило к изменению нуклеотидной последовательности, узнаваемой ферментом *SalGI*. В результате образовывалось два фрагмента — длиной 96 н.п. и 18 н.п. (на рис. 1 короткий фрагмент не виден). Гидролиз эндонуклеазой рестрикции *SalGI* амплифицированного фрагмента ДНК длиной 114 н.п. каллусных линий 4, 8, 9, не имеющих мутаций в позиции 1012 гена, приводил к образованию трех фрагментов — длиной 76 н.п., 20 н.п., 18 н.п. (короткие фрагменты не видны).

Гидролиз эндонуклеазой рестрикции *AatII* амплифицированных фрагментов гена длиной 254 н.п. каллусной линии 4, также как и контрольной линии, приводил к образованию трех фрагментов — длиной 104 н.п., 128 н.п. и 22 н.п. (на рис. 2 не виден). В то же время при гидролизе данным ферментом амплифицированных фрагментов мутантных каллусных линий 1, 8 и 9 образовывалось два фрагмента — длиной 232 н.п. и 22 н.п. (рис. 2).

Для выявления типа мутационных изменений, найденных в двух исследуемых районах гена *rrn16*, и точного определения нуклеотидных позиций мутаций в районе гена 1138-1140 (составляющий сайт *AatII*), были определены первичные нуклеотидные последовательности (полные нуклеотидные последовательности не приведены). Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей гена *rrn16* мутантных каллусных линий и нуклеотидной последовательности каллусной линии, не обладающей устойчивостью к спектиномицину, показал, что у трех исследуемых линий (1, 8, 9) произошла транзиция A1138G. У шести линий произошла трансверсия: у линий 2, 3, 10 — G1012T, а у линий 5, 6, 7 — G1012C.

У линии 4 не было найдено мутаций ни в одном из двух анализируемых районов гена. Известно, что резистентность к антибиотикам обусловлена изменением структуры прокариотического рибосомального комплекса вследствие мутаций в генах, кодирующих не только РНК-компоненты, но и белки рибосом, например, мутацией в гене *rpsE* рибосомного белка S5 (7). Однако в настоящее время еще не определена первичная нуклеотидная последовательность этого гена, локализованного в ядерном геноме, у *D. ca-*

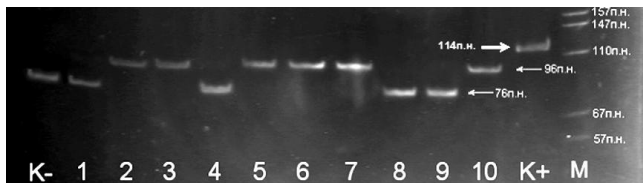


Рис. 1. Электрофорез в 8%-ном полиакриламидном геле амплифицированных фрагментов ДНК, гидролизованых эндонуклеазой рестрикции *SalGI*. В качестве матрицы для ПЦР использовали: 1–10 — ДНК каллусных линий, устойчивых к спектиномицину; “К-” — ДНК контрольного каллуса, не подвергнувшегося биобаллистической обработке, “К+” — ДНК каллуса моркови без последующей обработки эндонуклеазой рестрикции *SalGI*. М — ДНК плазмиды pBluscriptII SK(+), гидролизованная эндонуклеазой рестрикции *MspI*. Короткие фрагменты длиной 20 н.п. и 18 н.п. находятся вне поля рисунка

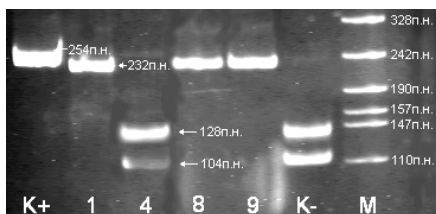


Рис. 2. Электрофорез в 8% полиакриламидном геле амплифицированных фрагментов ДНК, гидролизованых эндонуклеазой рестрикции *AatII*. В качестве матрицы для ПЦР использовали: 1, 4, 8, 9 — ДНК каллусных линий, устойчивых к спектиномицину, “К-” — ДНК контрольного каллуса, не подвергнувшегося биобаллистической обработке; “К+” — ДНК каллуса моркови без последующей обработки эндонуклеазой рестрикции *AatII*. М — ДНК плазмиды pBluscriptII SK(+), гидролизованная эндонуклеазой рестрикции *MspI*. Короткий фрагмент длиной 22 н.п. находится вне поля рисунка

rota. Это значительно усложняет поиск района, в котором потенциально могла произойти мутация, и затрудняет проведение молекулярного анализа.

Сравнительный анализ результатов, полученных в нашем исследовании, для *D.carota*, с известными данными для спектиномицин-устойчивых растений *Lesquerella fendleri* (4) и *Nicotiana* (5) показал, что во всех случаях произошли нуклеотидные замены в одних и тех же сайтах гена *rrn16*, кодирующего 16S рРНК. Необходимо отметить, что найденные нуклеотидные мутации локализованы в небольшом участке гена *rrn16* с 1012 по 1140 позиции, ответственном за образование спирали h34 на 3'конце 16S рРНК, содержащей сайт связывания спектиномицина. (4, 5, 8). Известно, что 16S рРНК играет важную роль в процессе трансляции хлоропластных белков. В случае возникновения мутаций в h34 антибиотик утрачивает способность связываться с рибосомой, что позволяет беспрепятственно синтезироваться хлоропластным белкам (8). Тип мутаций (нуклеотидные замены) и их лока-

лизация в гене *rrn16* объясняются высокой эволюционной консервативностью гена, кодирующего функционально значимый компонент пластидного трансляционного аппарата.

Выводы

1. Установлено, что мутации, являющиеся причиной резистентности к спектиномицину 9 из 10 каллусных линий моркови *Daucus carota*, локализируются в двух разных сайтах — 1012 и 1138-1140 — хлоропластного гена *rrn16*.

2. Показано, что произошедшие мутации представляют собой точковые нуклеотидные замены: у шести линий это трансверсия G1012T или G1012C, а у трех линий — транзиция A1138G. У одной линии причина возникновения устойчивости к спектиномицину не выяснена.

Литература

1. Shaw K.J., Rather P.N., Hare R.S., Miller G.H. Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the amino glycoside-modifying enzymes // Microbiol. Res.— 1993.— V.57.— P. 138–163.

2. Svab Z., Maliga P. Mutation proximal to the tRNA binding region of the *Nicotiana* plastid 16S rRNA confers resistance to spectinomycin // Mol. Gen. Genet.— 1991.— V.228.— P. 316–319.

3. Sidorov V.A., Kasten D., Pang S.Z., Hajdukiewicz P.T., Staub J.M., Nehra N.S. Technical advance: stable chloroplast transformation in potato: use of green fluorescent protein as a plastid marker // Plant J.— 1999.— V.9.— P. 209–216.

4. Skarjinskaia M., Svab Z., Maliga P. Plastid transformation in *Lesquerella fendleri*, an oilseed *Brassicaceae* // Transgenic Res.— 2003.— V.12.— P. 115–122.

5. Fromm H., Edelman M., Aviv D., Galun E. The molecular basis for rDNA-dependent spectinomycin resistance in *Nicotiana* chloroplasts // EMBO J.— 1983.— V.6.— P. 3233–3237.

6. www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/ORGANELLES/plastids.html.

7. Ramakrishnan V., White S.W. The structure of ribosomal protein S5 reveals sites of interaction with 16S rRNA // Nature.— 1992.— V.358.— P. 768–771.

8. Kubarenko A., Sergiev P., Wintermeyer W., Dontsova O., Rodnina M.V. Involvement of helix 34 of 16S rRNA in decoding and translocation on the ribosome // J. Biol. Chem. 2006.— V.281.— P. 35235–35244.

Резюме

Проведен анализ 10 устойчивых к спектиномицину каллусных линий моркови, полученных в ходе экспериментов по биобаллистической обработке каллусных клеток моркови (*Daucus carota* L.) плазмидой, содержащей ген *aadA* (аминогликозид-3'-аденилтрансферазы), и последующем их отборе на селективной среде со спектиномицином (100–500 мг/л). Показано, что данная резистентность обусловлена спонтанными мутациями, произошедшими в двух разных сайтах хлоропластного гена *rrn16*, кодирующего 16S рРНК. У шести линий произошла трансверсия G1012T или G1012C, в то время как у трех линий — транзиция A1138G. У одной линии причина возникновения устойчивости к спектиномицину не выяснена.

By biobalistic treatment of carrot calli (*Daucus carota* L) with the plasmid contained gene *aadA* (aminoglycoside-3'adenyltransferase) following selection on medium with spectinomycin (100–500 mg/l) 10 spectinomycin-resistant callus lines were obtained and analyzed. The resistance to antibiotic was conferred by spontaneous mutations localized at two different sites of chloroplast gene *rrn16* coding 16S ribosomal RNA. In 6 lines the translocation — G1012T or G1012C — was occurred whereas in 3 lines — transition A1138G was occurred. In one line the reason of spectinomycin-resistance was not ascertained.

**ФОМЕНКО Т.И., КУЗОВКОВА (ЛЕНЕЦ) А.А., БЕРДИЧЕВЕЦ Л.Г.,
РЕШЕТНИКОВ В.Н.**

ГНУ “Центральный ботанический сад НАН Беларуси”,
Беларусь, 220012, Минск, ул. Сурганова, 2В, e-mail: fioraia@nm.ru

ЭФФЕКТ РАЗНОУРОВНЕВОЙ ЭКСПРЕССИИ БАКТЕРИАЛЬНОЙ β-1,4-ГЛЮКАНАЗЫ В ЛИСТОВЫХ ТКАНЯХ *NICOTIANA TABACUM* НА КАЛЛУСОГЕННУЮ АКТИВНОСТЬ И МОРФОГЕННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ

Благодаря использованию растений-мутантов и трансгенных растений, в последние 20 лет значительно продвинулось понимание механизмов различных физиологических процессов растений, например, фотосинтеза и индуцированной резистентности к патогенам [1]. Вместе с тем, на трансгенных растениях удобно исследовать и проблему влияния чужеродного гена как на генотип и фенотип растения в целом, так и на изменение экспрессии отдельных растительных генов. Подобные работы единичны и поэтому весьма актуальны. Трансгенные растения *Nicotiana tabacum*, экспрессирующие бактериальный ген *cel7*, явились удобной моделью не только для изучения механизмов устойчивости растений к грибам [2], но и влияния на трансген гетерологичного окружения. Целью наших исследований был анализ экспрессии бактериальной β-1,4-глюканазы в листовых тканях табака, а также оценка ее влияния на фитогормональный статус растения и, как следствие, на их каллусогенную активность и морфогенный потенциал. Каллусная ткань растений представляет собой совокупность недифференцированных клеток, которые в определенных условиях могут дать начало клонам дифференцированных клеток. Это означает, что клетки каллусной ткани являются носителями определенных эпигенетических изменений в геноме, отличных от таковых в дифференцированных клетках, и экспрессия трансгена в таких условиях может модифицироваться.

Материалы и методы

Объектами исследований являлись 3 линии трансгенных растений *Nicotiana tabacum*, экспрессирующие бактериальный модифицированный ген *cel7* из анаэробной грамположительной термофильной бактерии *Clostridium thermocellum*. Ген кодирует фермент β-1,4-эндоглюканазу. В растениях ре2 ген *cel7* контролируется слабым конститутивным промотором Tr2' гена нопалинсинтазы и сильным конститутивным промотором 35S вируса мозаики цветной капусты, а также последовательностью, кодирующей сигнальный пептид экстенсина моркови. В линии ре3 ген *cel7* обладает слабым конститутивным промотором Tr2' гена нопалинсинтазы и последовательностью, кодирующей сигнальный пептид экстенсина моркови. Растения ре4 несут ген *cel7* под слабым конститутивным промотором Tr2' гена нопалинсинтазы. Данные растения были получены к.б.н. Василевко В.Т. под руководством проф. Пирузян Э.С. на базе Института молекулярной генетики РАН (г. Москва) [2]. Растения *in vitro* выращивали на 1/2 среде Мурасиге — Скуга (МС) при температуре 22 °С, освещенности 4 тыс.лк. Световой день —

16 ч. Для анализов использовали листья 40-дневных растений. Каллусообразование из листовых эксплантов инициировали на средах МСА (1 мг/л ИУК и 0,1 мг/л БАП), МСВ (3 мг/л ИУК и 0,1 мг/л БАП) и RМКУ (1 мг/л α НУК, 1 мг/л кинетина), основу которых составляла среда МС. Активно растущие каллусы переносили на среду для индуцирования органогенеза — среда МС с 0,1 мг/л ИУК и вариациями БАП (2 мг/л — среда МС1, 1 мг/л БАП — среда МСII). Культивирование проводили в течение 4-х недель в термостате при 24,5 °С. Частоту регенерации оценивали каждую неделю. Экспрессию в растительных тканях бактериального гена *cel7* тестировали по уровню активности его белкового продукта методом выявления в полиакриламидном геле изоформ глюканаз по Schwarz et al. [3] с нашими модификациями.

Результаты и обсуждение

Наши наблюдения и проведенный анализ морфометрических параметров растений-рекомбинантов показали, что трансгенные растения отличались замедленным в сравнении с контролем ростом. Очевидно, что такие морфо-физиологические изменения были опосредованы активной экспрессией трансгена в геноме табака. Действительно, в листьях табака ре2 и ре3 обнаружены глюканазы, термостабильные при +80 °С и проявляющие максимальную активность при +60 °С, что характерно исключительно для термостабильного бактериального модифицированного фермента. При этом активность глюканазы на мг внесенного в гель белка в линии ре3 была существенно выше, чем у рекомбинантов ре2. Контрольные растения, а также линия ре4 не проявляли глюканазную активность при данных условиях тестирования даже при 20-кратном увеличении концентрации белка в пробе. Понятно, что контрольные растения табака не должны обладать бактериальной термостабильной глюканазной активностью, а растительные глюканазы при данной температуре полностью ингибируются. Одной из вероятных причин отсутствия в растениях линии ре4 активности β -1,4-глюканазы может быть замолкание трансгена. Данный феномен отмечен с конца 80-х — начала 90-х годов, при создании первых трансгенных растений. Позже было установлено, что феномен замолкания генов, хотя и может наследоваться при половом размножении и последующем развитии семени, является обратимым и может находиться под контролем факторов развития [4].

Известно [5], что продуктами гидролиза глюканаз являются олигосахарины, которые в концентрациях 10^{-6} М способны имитировать действие ауксинов, в частности, увеличивать активность целлюлаз, стимулировать растяжение клеточной стенки и удлинение растения, индуцировать ризогенез. Возможные изменения в эндогенном балансе трансгенных растений, экспрессирующих ген бактериальной β -1,4-глюканазы, нами были проанализированы с помощью физиологического теста. Листовые экспланты контрольных и 3-х линий рекомбинантов культивировали на среде МС, не содержащей гормонов. После 4 недель культивирования на листовых эксплантах всех типов растений наблюдалось образование корней. При этом, частота ризогенеза в контроле (66,7%) была в 2 раза выше, чем у линии ре2 (33,3%), и сравнима с таковой у линии ре4. В то же время линия ре3 харак-

теризовалась более интенсивной инициацией ризогенеза (на 73,3%), чем контроль. Полученные данные являются неоднозначными. Можно предположить, что у линии ре3, отличающейся самой высокой глюконазой активностью, эндогенный баланс несколько сдвинут в сторону ауксинов, и наблюдаемое усиленное корнеобразование может быть вызвано стимулирующим эффектом олигосахаридов, продуктов гидролиза бактериальной глюконазы. Линия ре2, по-видимому, обладает особым фитогормональным статусом, определяющим существенное снижение ризогенеза по сравнению с контролем и линией ре3, при том, что характеризуется довольно высокой бактериальной глюконазой активностью. Линия ре4, которая не проявляет бактериальной активности β -1,4-глюконазы, возможно, вследствие замолкания гена, имеет тот же фитогормональный фон, что и контрольные растения.

Обратимость замолкания трансгена была выявлена нами при анализе экспрессии трансгена *cel7* в дедифференцированной (каллусной) ткани, полученной из листовых дисков от растений линии ре4. В отличие от листовой ткани, в каллусах линии ре4 (при 20-кратном концентрировании белка) была обнаружена активность термостабильных бактериальных глюконаз. Следует отметить, что каллусная ткань линий ре2 и ре3 сохраняла данную активность. Что касается каллусогенной активности листовых эксплантов трансгенных растений при культивировании на разных селективных средах, то у линий ре3 и ре4 на средах RMKU и MCA она была сравнима с таковой контрольных, тогда как прирост каллусной массы на листовых дисках ре2 был достоверно ниже. Добавление в среду культивирования MCB 3 мг/л ИУК (против 1 мг/л ИУК в MCA и 1 мг/л α НУК RMKU) способствовало увеличению каллусогенной активности как в контрольном варианте, так и у линии ре3. В то же время у линий ре2 и ре4 наблюдалась более низкая, чем в контроле каллусогенная активность. Таким образом, особый фитогормональный статус рекомбинантов ре3 никак не сказался на их каллусогенной активности по отношению к контролю, даже при увеличении в 3 раза содержания ауксинов в среде. При этом линия ре2 при всех исследуемых концентрациях экзогенных ауксинов демонстрировала ингибирование инициации каллусообразования, что косвенно может говорить об очень низком содержании в клетках ре2 эндогенных ауксинов, который даже в купе с экзогенными фитогормонами был недостаточен для нормального каллусообразования. Линия ре4 с нестабильной экспрессией гена *cel7* характеризовалась такой же нестабильной каллусогенной активностью на средах с разной концентрацией ауксинов.

Интересно, что активность бактериальной глюконазы, индуцированная в трансформантах ре4 при каллусогенезе, сохранялась, но на низком уровне, и в редифференцированных клетках адвентивных побегов, образованных при переносе каллуса со среды RMKU на морфогенные среды MCI и MCI1. Адвентивные побеги ре2 и ре3 также проявляли данную активность. Что касается уровня морфогенного потенциала исследуемых трансгенных растений табака, то после недели культивирования во всех вариантах, включая контроль, наблюдалось нарастание каллусной массы без инициации побегообразования, что связано с накоплением в клетках ауксина при наращивании

каллуса. Через 2 недели культивирования на каллусных тканях контроля и трансформантов отмечена регенерация побегов, но частота регенерации была не одинаковой и зависела как от типа растения, так и от среды культивирования. Так, при культивировании каллусных тканей на среде МС1 только у линии ре3 частота регенерации не отличалась от контрольного варианта и составляла 14,3%, тогда как у остальных линий трансгенных растений морфогенная активность была значительно выше (до 33,4%). Подобная зависимость наблюдалась и через 3 недели культивирования на фоне общего увеличения морфогенной активности.

Через 4 недели культивирования на среде МС1 частота регенерации линии увеличилась до 95%, и у линий ре2 и ре3 она была выше, а у линии ре4 ниже, чем в контроле. Данный факт подтверждает особый фитогормональный статус трансгенных растений табака. Об этом факте говорит и изменение морфогенной активности каллусных тканей трансформантов при увеличении в среде культивирования концентрации БАП до 2 мг/л. Увеличение содержания в среде экзогенного цитокинина повлияло на морфогенную активность как контрольного, так и трансгенных растений табака, экспрессирующих ген бактериальной β -1,4-глюканазы. Частота регенерации в контроле через 2 недели культивирования на среде МСII была в 1,5 раза выше, чем на среде МС1. У трансформантов наблюдали обратную зависимость. Морфогенная активность у линии ре2 в течение всего периода культивирования на среде МСII была ниже, чем на среде МС1. У линии ре4 на начальном этапе культивирования частота регенерации на среде МСII была выше, чем на среде МС1, и выше, чем в контроле, но через 4 недели культивирования наблюдалась обратная зависимость. Морфогенная активность каллусной ткани линии ре3 на среде МСII через две недели культивирования была ниже, чем на среде МС1. При дальнейшем культивировании на среде МСII частота регенерации у этой линии постепенно увеличивалась и достигала 100%, как и в контрольном варианте. Таким образом, на среде с более высоким содержанием цитокинина у всех исследуемых трансформантов отмечена общая тенденция снижения морфогенной активности каллусов.

Выводы

В ходе тестирования активности бактериального гена *cel7* в гетерологичном окружении обнаружен феномен эпигенетической регуляции экспрессии трансгена в одной из линий трансгенных растений табака, в линии ре4. Какие именно эпигенетические изменения произошли сначала в геноме листовых, а потом каллусных клеток табака, мы можем только предполагать. Возможно, репрессия гена *cel7* в растениях табака обусловлена присутствием множественных копий трансгена и гомологичных ему последовательностей в растительных генах, которые могут взаимодействовать между собой, образуя гибридную ДНК, и таким образом корепрессировать друг друга. Другой способ репрессии генов определяется хроматиновым состоянием генных локусов, в которые встраивается трансген, и их позиции в хромосоме и/или ядре. В этом огромная роль принадлежит процессам модификации гистонов. Существует и пост-транскрипционная репрессия генов [6].

Разноуровневая экспрессия бактериальной β -1,4-глюканазы в листовых тканях табака сказалась на фитогормональном статусе этих тканей и далее, как следствие, отразилась на их каллусогенной активности и морфогенном потенциале. Особым фитогормональным фоном обладают все исследуемые линии трансформантов. У линии ре3 фитогормональный баланс сдвинут в ауксиновую сторону, что объясняет усиленное корнеобразование у этих растений. При этом каллусогенная активность не отличалась от контрольной. Измененный фитогормональный статус трансформантов ре2 (вероятно, с низким содержанием эндогенных ауксинов) привел к ингибированию ризогенеза и каллусообразования. Линия ре4 с нестабильной экспрессией гена *cel7* характеризовалась такой же нестабильной каллусогенной активностью на средах с разной концентрацией ауксинов и уровнем ризогенеза, характерным для контроля. Частота регенерации адвентивных побегов на каллусных тканях трансформантов на морфогенных средах была не одинаковой и зависела как от типа растения, так и от среды культивирования. Морфогенная активность линии ре3 на среде с 1 мг/л цитокинина была сравнима с контролем, а линий ре2 и ре4 значительно выше. Увеличение содержания в среде экзогенного цитокинина повлияло на морфогенную активность растений, увеличив частоту регенерации в контроле и уменьшив — в трансгенных растениях.

Литература

1. Бурьянов Я.И. Успехи и перспективы генно-инженерной биотехнологии растений // Физиология растений.— 1999.— Т.46, №6.— С. 930–944.
2. Василевко В.Т. Модель переноса гена бактериальной полиглюкангидролазы (β -1,4-глюканаза) в растения табака как способ защиты растений от фитопатогенов / Диссерт. на соискан. уч. степ. канд. био. наук.— Минск.— 2002.— 84 с.
3. Schwarz W.H., Bronnenmeier K., Grabnitz F., Staudenbauer W.L. Activity staining of cellulases in polyacrylamide gels containing mixed linkage β -glucans // Analytical biochemistry.— 1987.— V.164.— P. 72–77.
4. Flavell R.B. Inactivation of gene expression in plants as a consequence of specific sequence duplication // PNAS USA.— 1994.— V.91.— P. 3490–3496.
5. Fry S.C. Cellulases, hemicelluloses and auxin-stimulated growth: a possible relationship // Physiol.Plantar.— 1989.— V. 75.— P. 532–536.
6. Назаренко С.А. Эпигенетическая регуляция активности генов и ее эволюция // Из книги: Эволюционная биология. Материалы II Международной конференции “Проблема вида и видообразование”.— Томск: Томский государственный университет.— 2002.— Т.2.— С. 82–93.

Резюме

Исследовано влияние гетерологичного окружения на экспрессию в растениях трансгена, кодирующего бактериальную β -1,4-глюканазу. Дана оценка каллусогенной активности и морфогенного потенциал листовых тканей табака с измененным фитогормональным статусом.

The influence of heterological environment on the expression of the transgene coding bacterial β -1,4-gluconase in plants is investigated. The estimation of callusogenic activity and morphogenic potential of tobacco leaf tissues with the changed phytohormonal status is given.

**ЧМЕЛЕВА С.И., ТЕПЛИЦКАЯ Л.М., ЮРКОВА И.Н., ПАНОВ Д.А.,
БУГАРА И.А., ОМЕЛЬЧЕНКО А.В., ТАЙКОВА В.П.**

*Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского,
Украина, 95007, Симферополь, проспект Академика Вернадского, 4,
e-mail: nanosilver@rambler.ru*

ПОЛУЧЕНИЕ И ОПТИМИЗАЦИЯ КАЛЛУСНЫХ КУЛЬТУР ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ И ИХ БИОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

Высшие растения синтезируют широкий спектр биологически активных вторичных метаболитов. Значительную часть продуктов вторичного метаболизма, имеющих фармакологическую ценность, получают из дикорастущего лекарственного сырья или интродуцированных растений [1, 2]. Традиционный подход требует значительных земельных ресурсов и затрат на выращивание, переработку сырья, является недостаточно эффективным. Одним из приоритетных направлений в настоящее время является разработка биотехнологических основ получения клеточных культур лекарственных растений, которые могут служить в качестве сырья, содержащего фармакологически ценные вторичные метаболиты (гликозиды, фенольные соединения, алкалоиды, сантонины). Исследования по получению клеточных культур — продуцентов вторичных метаболитов проводятся во многих странах мира. В Украине такие технологии разрабатываются на уровне лабораторных и, частично, промышленных регламентов.

Целью исследований является: оптимизация условий получения клеточных культур лекарственных растений и выявление закономерностей накопления в них ценных продуктов фармакологического назначения.

Материал и методы

Материалом исследования были ткани и органы следующих видов: Гинкго двулопастный — *Ginkgo biloba* L., Тисс ягодный — *Taxus baccata* L., Олеандр обыкновенный — *Nerium oleander* L.

В качестве эксплантов были взяты сегменты вегетативных органов (листовой пластинки, черешки, побеги в зоне прикрепления листьев, изолированные семязпочки).

При выполнении работы использовали методы, общепринятые в исследованиях по культуре изолированных тканей растений [3, 4].

Для культивирования эксплантов применялись модифицированные по содержанию фитогормонов (2,4-Д, ИУК, НУК, БАП) питательные среды Мурасиге и Скуга, Гамборга. Экспланты культивировали при освещенности 4–5 тыс. люкс, температуре 20–24 °С и относительной влажности воздуха 60–70%. Частоту каллусообразования оценивали по количеству эксплантов, давших каллус, от общего числа эксплантированных. Полученный каллус субкультивировали на модифицированные питательные среды Мурасиге и Скуга (МС) и Гамборга, дополненные 2,4-Д — 2,0 и 2,5 мг/л, БАП — 0,3 и 0,4 мг/л.

Для химического анализа на содержание тритерпеновых гликозидов каллусные культуры, находящиеся в стационарной фазе роста, извлекали из культуральных пробирок и высушивали при комнатной температуре. Воздушно-сухую массу тщательно измельчали и экстрагировали 80% изопропиловым спиртом. Для определения тритерпеновых гликозидов использовали тонкослойную хроматографию (ТСХ) на пластинках "Silufol" [5], в нейтральной системе растворителей хлороформ-метанол-вода (100:40:7). Детектирование фракций тритерпеновых гликозидов на хроматограммах осуществляли 10% спиртовым раствором фосфорновольфрамовой кислоты с добавлением 2% *para*-оксibenзальдегида с последующим нагреванием хроматограмм при 100–120 °С. В качестве контроля использовали водно-спиртовые экстракты из органов интактных растений.

Результаты и обсуждение

Вторичные метаболиты *G. biloba* являются очень мощными и действенными лекарственными средствами, занимающими в современной медицине одно из самых ведущих мест.

Из литературы известно, что листья, семена и древесина гинкго выделяют вещества разных химических групп с различной фармакологической и терапевтической активностью [6]. Листья гинкго содержат флавоноловые гликозиды — производные кемпферола и кверцетина, мирицетин, бифлавоноиды и их гликозиды (бисмозиды): сиядопитизин (5%), билобетин (5%), гинкгетин (20%), изогинкгетин (18%), аментофлаван (1%), а также антоцианидин.

В результате проведенных исследований по введению тканей *G. biloba* в культуру *in vitro* было показано, что направленность процессов развития тканей зависит от типа экспланта, его физиологических особенностей, морфогенетических потенций и условий культивирования. При введении в культуру различных типов эксплантов (сегменты молодой листовой пластинки, черешки листьев, семяпочки) у *G. biloba* образование каллуса происходило у всех типов эксплантов. Максимальная частота каллусообразования наблюдалась на сегментах молодых листовых пластинок до 98,6%. Показатель частоты каллусообразования при использовании в качестве эксплантов фрагментов черешков листа был несколько ниже (от 9,1% до 85,4%). И довольно низкая частота каллусообразования наблюдалась у эксплантов — изолированных семяпочек (16,6–46,6%).

Решающее значение для индукции каллусогенеза в культуре тканей *G. biloba* играет наличие в культуральной среде веществ как с цитокининовой активностью, так и ауксиновых ростовых факторов. Образование каллуса происходило только на средах, дополненных экзогенными стимуляторами роста, обычно на 15–25 день культивирования. Максимальное образование каллуса наблюдалось на питательной среде МС, дополненной 1,0 мг/л ИУК, 2,5 мг/л 2,4-Д, 0,4 мг/л 6-БАП у всех типов эксплантов. Максимальная частота каллусообразования у сегментов молодой листовой пластинки составила 98,6%, черешков листьев 86,4%, у семяпочек 46,6%. При увеличении концентрации 6-БАП до 0,5–0,6 мг/л, а также увеличении кон-

центраций ИУК (1,5 мг/л) и 2,4-Д (3,0 мг/л) показатель частоты каллусообразования снижался у всех эксплантов.

Химический анализ каллусных культур, полученных из сегментов молодой пластинки *G. biloba* показал, что каллус содержит фенольные соединения, характерные для интактного растения [7]. Были выявлены десять фракций фенольных соединений, из которых шесть фракций анакардовой кислоты и четыре фракции билобола.

Поскольку исследований по химическому анализу каллусных культур гинкго двулопастного на содержание фенольных соединений ранее не проводилось, настоящая работа является первым экспериментальным доказательством получения каллусных культур данного вида, содержащих фенольные соединения, что открывает возможности для дальнейших исследований, направленных на селективный отбор и получение каллусных и суспензионных культур, обладающих повышенной продуктивностью отдельных фракций фенольных соединений и биологической активностью, а каллусная культура может быть использована как источник их получения.

Все органы *T. baccata* содержат дитерпеноиды, главными среди них являются таксол, лигнаны, таксирезинол и его производные, стероиды, цианогенные соединения; в хвое, кроме того, содержатся сесквитерпеноиды, алкалоиды, главным среди них является эфедрин, флавоноиды, гинкгетин, секвойяфлавоны, антоцианы [8, 9]. Из биомассы игл *T. baccata* был получен алкалоид баккатин, который послужил основой для химического синтеза второго таксанового производного — доцетаксела. В настоящее время паклитаксел и его полусинтетический аналог доцетаксел назначаются для лечения рака различных органов.

Исходя из этого, возникает необходимость поиска альтернативного способа получения таксола. Таким способом может оказаться создание технологий получения культуры клеток тиса, синтезирующих таксол в достаточном количестве, что в перспективе открывает возможность селекции наиболее продуктивных клеточных линий.

Максимальная частота каллусообразования у *T. baccata* наблюдалась на сегментах летних побегов на питательной среде Гамборга В₅ (85,0%). Показатель частоты каллусообразования при использовании в качестве эксплантов сегментов зимних побегов был несколько ниже как на среде В₅ (75,3%), так и на питательной среде МС (60,5%). Несколько ниже была частота каллусогенеза у эксплантов молодых верхушечных листьев: 56,3% (В₅) и 51,3% (МС).

Образование каллуса наблюдали у зимних побегов на 20–25 день, а у летних — на 10–15 день. Максимальное образование каллуса наблюдалось на средах МС и Гамборга, содержащих 2,0 мг/л 2,4-Д, 4,0 мг/л НУК, 1,0 мг/л 6-БАП. При уменьшении концентрации НУК до 1,0–2,0 мг/л показатель на среде Гамборга частоты каллусообразования у всех изученных эксплантов снижался.

Более высокие показатели частоты каллусогенеза у всех эксплантов наблюдались на всех вариантах питательной среды Гамборга. Поэтому

оптимальной питательной средой для получения первичных каллусных культур *T. baccata* нами была определена питательная среда Гамборга В₅, дополненная 4,0 мг/л НУК, 2,0 мг/л 2,4-Д, 1,0 мг/л 6-БАП и активированным углем (1 г/л).

Исследование влияния фитогормонов в питательных средах для пассирования каллусной культуры *T. baccata*, полученной из разных типов эксплантов, показало, что уменьшение концентрации НУК и добавление в среду кинетина (0,5 мг/л) повышает интенсивность прироста биомассы до 50–80%. При этом каллусная культура, полученная из фрагментов летних побегов, отличается активным ростом в сравнении с каллусной культурой из зимних побегов и сегментов молодых листьев.

В качестве инициальных эксплантов для получения каллусных тканей олеандра обыкновенного *N. oleander*, использовали сегменты зрелых листьев и стебля в зоне прикрепления листьев. Проведенные исследования показали, что состав питательной среды оказывал значительное влияние на индукцию каллусообразования в культуре тканей *N. oleander in vitro*.

Максимальная частота каллусообразования (94,0–95,0%) наблюдалась на модифицированной питательной среде МС, дополненной 0,5 мг/л ИУК, 0,2 мг/л 2,4-Д, 0,5 мг/л кинетина и 0,5 мг/л БАП. При культивировании эксплантов на питательной среде МС, содержащей 2,0 мг/л 2,4-Д, 0,5 мг/л кинетина и 0,5 мг/л 6-БАП частота индукции каллусообразования составила 81,0–86,0%. На других модификациях питательных сред частота каллусообразования была достоверно ниже и не превышала 61%.

При введении эксплантов в условиях *in vitro* первые признаки каллусогенеза визуально обнаруживались на 10–14 сутки культивирования, независимо от состава питательной среды и типа экспланта.

Исследование состава и содержания гликозидов в интактных растениях олеандра обыкновенного, выявило 9 основных фракций сердечных гликозидов, из которых — пять фракций гитоксигенина, две фракции дигитоксигенина и две фракции дигоксигенина. При этом в стеблях обнаружено четыре фракции, из них три гитоксигенина (А) и одна дигитоксигенина (В), а в листьях три фракции дигоксигенина (С).

Химический анализ каллусных культур индуцированных из эксплантов листовых сегментов и стеблей показал, что количество выявленных фракций сердечных гликозидов зависело от питательной среды и не зависело от типа экспланта. Максимальное количество фракций сердечных гликозидов было обнаружено в каллусных культурах, пассируемых на среде МС, содержащей 2 мг/л 2,4-Д, 0,5 мг/л ИУК, 0,5 мг/л кинетин, 0,5 мг/л 6-БАП.

Выводы

Таким образом, проведенные исследования позволили оптимизировать условия получения первичных каллусных культур *G. biloba*, *T. baccata*, *N. oleander* и их субкультивирования. Исследованы ростовые параметры каллусных культур и выделены штаммы с повышенным ростовым индексом, содержащие биологически активные вещества.

Литература

1. Кунах В.Р. Биотехнологія лікарські рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи.— К.: Логос, 2005.— 730 с.
2. Носов А.М. Регуляция синтеза вторичных соединений в культуре клеток растений // Биология культивируемых клеток и биотехнология растений.— М.: Наука, 1991.— С. 5–20.
3. Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений.— К.: Наукова думка, 1980.— 488 с.
4. Культура клеток растений: [Сб. ст.] / АН СССР, Ин-т физиологии растений им. К.А. Тимирязева / Отв. ред. Р.Г. Бутенко.— М.: Наука, 1981.— 168 с.
5. Шаришнова М. Тонкослойная хроматография в фармации и клинической биохимии.— М.: Мир, 1980.— 621 с.
6. Запрометов М.Н. Фенольные соединения: Распространение, метаболизм и функции.— М.: Наука, 1989.— 254 с.
7. Скиба А.А., Чмелева С.И. Каллусные культуры гинкго двулопастного (*Ginkgo biloba* L.) — продуценты важных биологически активных веществ // Биология від молекули до ноосфери: матеріали II Міжнар. конф. (Харків, 19–21 лист. 2007 р.).— Х.: Планета-Принт, 2007.— С. 416.
8. Машковский М.Д. Лекарственные средства.— М.: Новая волна, 2008.— Т.2.— 1206 с.
9. Пасишниченко В.А. Новый альтернативный путь биосинтеза изопреноидов у бактерий и растений // Биохимия.— 1998.— Т.63, №2.— С. 171–182.

Резюме

Проведенные исследования позволили оптимизировать условия получения первичных каллусных культур *G. biloba*, *T. baccata*, *N. oleander* и их субкультивирования. Исследованы ростовые параметры каллусных культур и выделены штаммы с повышенным ростовым индексом, содержащие биологически активные вещества.

Проведені дослідження дозволили оптимізувати умови отримання первинних каллюсних культур *G. biloba*, *T. baccata*, *N. oleander* та їх субкультивування. Досліджено ростові параметри каллюсних культур і виділено штами з підвищеним ростовим індексом, які містять біологічно активні речовини.

Our studies have allowed to optimize the conditions for receiving primary callus cultures of *G. biloba*, *T. baccata*, *N. oleander* and subculturing. The growth parameters of callus cultures were investigated and isolated strains with increased index containing biologically active substances.

ЧУРИКОВА О.А.

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Россия,
119991, Москва, ГСП-1, Ленинские горы,
e-mail: ochurikova@yandex.ru, vvmur@hotmail.ru

ПОДДЕРЖАНИЕ И ВОЗОБНОВЛЕНИЕ КОЛЛЕКЦИИ СОРТОВОЙ СИРЕНИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРИЕМОВ

Сокращение биологического разнообразия — одна из основных глобальных экологических проблем, стоящих перед человечеством на современном этапе. Постоянно существующая в мире угроза генетическим ресур-

сам растений, вызываемая неблагоприятным воздействием экологических факторов, антропогенной деятельностью и негарантированность результатов традиционных приемов обусловили необходимость разработки альтернативных путей сохранения и восстановления редких и ценных видов и сортов растений [1].

Клональное микроразмножение является одним из приоритетных направлений биотехнологии, успешно развивающихся в настоящее время и открывающих новые возможности сохранения генофонда растений в условиях *in vitro*. Растения, полученные этим методом *in vitro*, имеют очевидные преимущества по сравнению с традиционно размноженными растениями (скорость и энергия роста, высокие показатели цветения и др.). Значение его для ускоренного внедрения в производство ценного сорта или уникального по своим качествам генотипа обусловлено чрезвычайной быстротой размножения новых растений из малого количества исходного материала. Основой для разработки биотехнологических приемов размножения и культивирования растений является изучение их биологических особенностей в природных условиях и в коллекциях ботанических садов.

Сирень — наиболее популярное и любимое красивоцветущее древесное растение нашей климатической зоны. Сортная сирень сосредоточена, в основном, в коллекциях ботанических садов и крупных интродукционных центрах, где, как правило, представлена малым количеством взрослых экземпляров.

В ботаническом саду Московского университета на Ленинских горах в начале 50-х годов XX века были высажены лучшие сорта сирени зарубежной селекции. В 1974 году началось создание научной коллекции сортной сирени, гордостью которой является собрание сортов выдающегося селекционера Л.А. Колесникова. В ней имеются также сорта, выведенные им совместно с В.Д. Мироновичем, сорта других отечественных селекционеров: Н.К. Вехова, Н.Л. Михайлова, Н.В. Смолинского, В.Ф. Бибиковой, Л.И. Рубцовой, В.Г. Жоголевой, Н.А. Ляпуновой, А.Ф. Мельник, В.Г. Рубаник и Б. Дягилева [2]. Коллекция сирени ботанического сада МГУ создавалась в первую очередь для дальнейшего развертывания научных исследований с этой культурой; для расширения селекционной работы, отработки агротехнических мероприятий и отбора наиболее устойчивых сортов, пригодных для практики озеленения в условиях московского мегаполиса и т.д.

Из коллекции нами были отобраны растения 15 высокодекоративных сортов сирени обыкновенной отечественной селекции для дальнейшего изучения возможности их размножения с использованием биотехнологических методов. Цель исследований заключалась в совершенствовании технологии размножения интродуцированных сортов *Syringa vulgaris* L., изучении влияния генотипических особенностей, гормонального состава питательных сред, условий культивирования на развитие и рост микропобегов сирени, а также возможности поддержания их культуры в условиях минимального роста *in vitro*.

Материалы и методы

Для индукции культуры в качестве эксплантов брали апикальные и латеральные почки зрелых и молодых побегов сирени с небольшим участком стебля и фрагменты стебля длиной 1–1,5 см с двумя пазушными почками в период активного роста. В качестве стерилизаторов использовали 7% раствор гипохлорита кальция (15–20 мин) в сочетании с обработкой 70% этанолом (1–2 мин). После стерилизации почки промывали 3 раза в стерильной дистиллированной воде. Для индукции морфогенеза *in vitro* использовали питательную среду с основой по Мурасиге и Скугу (MS) [4] с добавлением 30 г сахарозы и 0,5–1,5 мг/л 6-бензиламинопурина (6-БАП). Для размножения использовали среды: а) MS с 20 г/л сахарозы и 1,5 мг/л 6-БАП б) MS с 20 г/л сахарозы, 1,5 дозой макроэлементов и добавлением 0,1 мг/л тидиазурона (TDZ). Укоренение полученных микропобегов проводили на среде 1/2 MS или MS с 1 мг/л индолилуксусной кислоты (ИУК). Адаптацию укорененных *in vitro* растений проводили в микропарничках в условиях повышенной влажности и освещенности в течение 1–1,5 мес.

Результаты и обсуждение

У эксплантов сирени в культуре *in vitro* наблюдалась реализация организменного потенциала зачатков пазушных почек, а также активизация деятельности клеток пазушной меристемы. Морфолого-анатомический анализ эксплантов показал, что образующиеся побеги являются по происхождению аксиллярными. Изучение влияния состава питательной среды и типа добавляемого цитокинина на регенерационную способность сирени показало, что максимальный коэффициент размножения достигался при использовании среды с 1,5 дозой макросолей и 0,1 мг/л TDZ. Тидиазурон оказывал стимулирующее влияние на процесс формирования дополнительных пазушных почек и, впоследствии, побегов. На этапе размножения наиболее отчетливо проявлялись сортовые особенности, что находило свое отражение в различном числе дополнительно закладывающихся почек и развивающихся из них, впоследствии, побегов. На среде MS с одной дозой макросолей и 1,5 мг/л 6-ВАР также наблюдался геммогенез. Спустя 35–40 дней практически у всех сортов, высаженных на среду для размножения, начиналось эндогенное заложение адвентивных корней на осях развивающихся микропобегов, чего не было отмечено на средах других модификаций. Таким образом, данная среда может быть универсальной как для индукции геммогенеза, так и для ризогенеза. Ранее при изучении процесса укоренения сирени нами были показаны преимущества ИУК (0,1 мг/л) по сравнению с другими гормонами [3]. Однако использование среды MS, содержащей 1,5 мг/л 6-БАП, для индукции гемморизогенеза позволяет сократить расходы и повысить экономическую эффективность метода микрореклонального размножения.

На этапах укоренения и адаптации полученных микропобегов к условиям *in vivo* использование сфагнума положительно сказывалось на подготовке листового аппарата растений к условиям пониженной влажности воздуха. Впоследствии растения легче адаптировались к условиям теплицы.

Лучшим субстратом для адаптации регенерантов является автоклавированная почвенная смесь: торф: дерновая земля: песок в соотношении 1:1:2. Такая технология с сокращенным циклом с 3-х до 2-х стадий за счет исключения этапа укоренения на питательной среде позволяет уменьшить период адаптации полученных регенерантов к условиям *in vivo*.

Этап собственно микроразмножения является ключевым и наиболее важным для биотехнологического цикла культивирования растений. При этом необходимо соблюдение условий культивирования и факторов, влияющих на реализацию морфогенетического потенциала эксплантов, в частности, температурного режима. В ходе эксперимента было выявлено, что сорта П.П. Кончаловский, Великая Победа, Минчанка оказались наиболее устойчивыми к воздействию более высоких по сравнению с оптимальными температур (выше 24 °С). Они могли культивироваться в таких условиях без пересаживания на свежую питательную среду в течение 6 месяцев, сохраняя при этом жизнеспособность и высокую регенерационную активность.

Периодическое субкультивирование полученных растений трудоемко и значительно удорожает содержание коллекции. В настоящее время интенсивно изучается возможность снижения температуры культивирования, за счет которого достигается удлинение периода между пересадками (пассажами) до 12–14 мес. Сохранение растений-регенерантов при пониженных температурах не имеет негативных последствий и даже способствует их более интенсивному росту после переноса в нормальные условия. Создание банка культур для длительного хранения редких и полезных растений является важнейшим достижением биотехнологии. Многообразие возможностей, предоставляемых современной биотехнологией растений, позволяет успешно использовать ее новые подходы для решения многих практических и теоретических проблем биологии.

Выводы

1. Оптимальными средами для регенерации сирени обыкновенной следует считать две модификации основной питательной среды Мурашиге и Скуга, содержащие полуторную дозу макросолей с добавлением 1,5 мг/л 6-БАП или 0,1 мг/л TDZ.

2. На основании изучения морфогенетических процессов в эксплантах сирени показана возможность получения растений-регенерантов через прямой органогенез, минуя стадию каллусообразования.

3. Особенности и интенсивность морфогенеза у изученных сортов сирени обыкновенной обусловлены, главным образом, генотипом растений, определяющим потенциальную способность к регенерации.

4. Разработка методов поддержания и сохранения коллекции видов и сортов растений в условиях *in vitro* путем минимализации их ростовых процессов является перспективным современным направлением исследований.

Литература

1. Кутас Е.Н. Клональное микроразмножение — альтернативный путь сохранения биоразнообразия растений // Биотехнология как инструмент сохранения

биоразнообразия растительного мира / Под ред. А.С. Демидова; отд. биол. наук РАН, Сов. Бот. садов России.— Белгород: Изд-во БелГУ.— 2008.— 332 с.

2. Ботанический сад Московского университета. 1706–2006. Первое научное ботаническое учреждение России / Под ред. В.С. Новикова, М.Г. Пименова, К.В. Киселевой, В.Е. Гохмана, А.Ю. Паршина.— Москва: Товарищество научных изданий КМК.— 2006.— 280 с.

3. Молканова О.И., Чурикова О.А., Коновалова Л.Н., Окунева И.Б. Клональное микроразмножение интродуцированных сортов *Syringa vulgaris* L. // Вестн. Моск. ун-та. Сер.16. Биология.— 2002, №4.— С. 8–14.

4. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // *Physiol. Plant.*—1962.— Vol.15, №2.— P. 473–497.

Резюме

В последние годы для сохранения биоразнообразия растений успешно используются методы культуры *in vitro*. Усовершенствована технология ускоренного размножения сортов сирени обыкновенной. Показана возможность получения регенерантов посредством прямого органогенеза, отмечены особенности морфогенеза *in vitro*.

В останні роки для збереження біорозмаїття рослин успішно використовуються методи культури *in vitro*. Удосконалена технологія прискореного розмноження сортів бузку звичайної. Показана можливість одержання регенерантів за допомогою прямого органогенезу, відзначені особливості морфогенезу *in vitro*.

In vitro techniques have found increasing use in protection of plant biodiversity in recent years. Technology of express propagation of *Syringa vulgaris* L. cultivars *in vitro* is improved. The possibility of obtaining the regenerants via direct organogenesis is showed, the peculiarities of morphogenesis *in vitro* being revealed.

**ШЕЛУДЬКО Ю.В.¹, САХНО Л.А.¹, ГЕРАСИМЕНКО И.М.¹,
СИНДАРОВСКАЯ Я.Р.¹, КЛОЧКО В.В.², ОСТАПЧУК А.Н.²,
ГОЛДЕНКОВА-ПАВЛОВА И.В.³**

¹Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины,
ул. Заболотного, 148, г. Киев, 03680, Украина; e-mail: ysheludko@ukr.net

²Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины,
ул. Заболотного, 152, г. Киев, 03680, Украина

³Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, ул. Губкина, 3, г. Москва,
119991, Россия

ГЕТЕРОЛОГИЧЕСКАЯ ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ АЦИЛ-ЛИПИДНЫХ ДЕСАТУРАЗ ЦИАНОБАКТЕРИЙ В РАСТЕНИЯХ

Изучение механизмов устойчивости растений к неблагоприятным факторам окружающей среды и создание новых устойчивых форм методами генетической инженерии является актуальной задачей биотехнологии в усло-

виях глобальных климатических изменений и увеличивающегося загрязнения окружающей среды. Одним из механизмов адаптации растений к холоду является увеличение степени ненасыщенности остатков жирных кислот в клеточных мембранах, обеспечивающее необходимую текучесть мембран при пониженных температурах. Катализируют реакции десатуразы жирных кислот [1–3].

С целью исследования механизмов функционирования белково-липидных мембранных систем в условиях холодового стресса и получения растений с новыми признаками мы сконструировали ряд генетических экспрессионных векторов, несущих гетерологические гены ацил-липидных десатураз *desC* ($\Delta 9$) *Synechococcus vulcanus* и *desA* ($\Delta 12$) *Synechocystis* sp. PCC 6803 (нативные или слитые с репортерным геном термостабильной лишайницы из *Clostridium thermocellum* [4]). Проведена генетическая трансформация модельного объекта (*Nicotiana tabacum*) и ценного сельскохозяйственного вида (*Brassica napus*), и доказано присутствие трансгена в полученных растениях. Анализ активности термостабильной лишайницы позволил отобрать линии, в которых происходит экспрессия целевых генов. Для ряда полученных линий трансгенных растений показано изменения спектра жирных кислот мембранных липидов и повышенную устойчивость к холодовому стрессу.

Материалы и методы

Нативные и гибридные гены ацил-липидных десатураз *desC* *S. vulcanus* и *desA* *Synechocystis* sp. PCC 6803 были помещены под контроль промотора 35S РНК ВМЦК в генетические конструкции pBISN-*desC*, pBISN-*desA*, pBISN-*desC-licBM3* и pBISN-*desA-licBM3*, содержащие ген *npfII* в качестве селективного [5, 6]. Ген *desC* под контролем промотора 35S РНК ВМЦК и терминатора нопалинсинтазы был помещен в генетическую конструкцию pCB141, содержащую селективный ген *bar* под контролем промотора нопалинсинтазы и терминатора октопинсинтазы на основе вектора pICH5290 [7]. Для генетической трансформации были использованы асептические растения *Nicotiana tabacum* сорта Wisconsin и рапса (*Brassica napus*) сортов Магнат и Обрий, которые выращивали *in vitro* на агаризованной среде MS [8]. Для трансформации использовали *Agrobacterium tumefaciens* GV3101.

Листовые экспланты растений табака и рапса кокультивировали с суспензией агробактерий. Экспланты табака помещали на среду MS для регенерации, содержащую 1 мг/л бензиламинопурина (БАП) и 0,1 мг/л нафтилуксусной кислоты (НУК) [9]. Экспланты рапса культивировали на среде MS для каллусогенеза, содержащей 2 мг/л 2,4-D, 1 мг/л НУК, 0,1 мг/л кинетин и 0,1 мг/л БАП, затем переносили на среду MS для регенерации, содержащую 2 мг/л БАП, 1 мг/л зеатина, 1 мг/л НУК, 1 мг/л гибберелловой кислоты, 1 мг/л абсцизовой кислоты [10]. Для отбора растений-трансформантов в питательные среды добавляли канамицин (100 мг/л) при трансформации с использованием генетических конструкций pBISN-*desC*, pBISN-*desA*, pBISN-*desC-licBM3* и pBISN-*desA-licBM3*, или фосфинотрицин (5 мг/л) при трансформации с использованием генетической конструкции pCB141.

Присутствие трансгена и анализ активности термостабильной лихеназы в клетках отобранных линий растений проводили в соответствии с описанными протоколами [11]. Выделение жирных кислот и образование их метиловых эфиров для проведения газо-хроматографических анализов проводили по методике [12]. Определение метиловых эфиров жирных кислот проводили на газовой хромато-масс-спектрометрической системе Agilent 6890N/5973inert с капиллярной колонкой DB-FFAP (30 м × 0,25 мм × 0,25 мкм) (J&W Scientific). Температурная программа от 150 °С до 220 °С с градиентом 2 °С/мин, температура испарителя — 250 °С. В качестве газоносителя использовали гелий со скоростью потока 1 мл/мин. Идентификацию проводили при помощи библиотеки масс-спектров NIST 02 и стандартной смеси метиловых эфиров жирных кислот бактерий (Supelco).

Контрольные и опытные растения подвергали воздействию низких температур: помещали в камеру при 0 °С, после чего опускали температуру до –5 °С и выдерживали 30 минут. Экстрагировали листовую ткань. Содержание малонового диальдегида и перекиси водорода в экстрактах контрольных и трансгенных растений в нормальных и стрессовых условиях измеряли с использованием методов [13].

Результаты и обсуждение

Генетическая трансформация растений табака была проведена методом культивирования с линиями *Agrobacterium tumefaciens* GV3101, несущими генетические вектора pBISN-*desC*, pBISN-*desA*, pBISN-*desC-licBM3* и pBISN-*desA-licBM3*, содержащие нативные и гибридные гены ацил-липидных десатураз *desC S. vulcanus* и *desA Synechocystis* sp. PCC 6803, слитые в одной рамке считывания с геном термостабильной лихеназы *Clostridium thermocellum*, под контролем промотора 35S РНК ВМЦК. После регенерации устойчивых растений на питательной среде, содержащей канамицин, присутствие в них перенесенных генов было доказано методом мультиплексной ПЦР [11].

В растениях табака, трансформированных гибридными генами десатураз, активность репортерного белка была обнаружена в 11 из 19 растений с геном *desC-licBM3* и в 2 из 5 растений с геном *desA-licBM3* [11]. Растения табака двух линий, экспрессирующие гибридный ген *desA-licBM3*, были повторно трансформированы векторной конструкцией pCB141, несущей нативный ген *desC* под контролем 35S промотора ВМЦК. После селекции на среде с фосфинотрицином были отобраны 20 растений, у которых было показано присутствие обоих целевых генов. Шесть из них были использованы для проверки активности термостабильной лихеназы в составе гибридного белка, которая была показана во всех случаях. Кроме того было отобрано 5 растений, несущих нативный ген *desC* — D9-десатураза; 5 растений с нативным геном *desA* — D12-десатураза [11]. Активность лихеназы была зарегистрирована в двух линиях рапса (сорт Обрий), которые были регенерированы на селективной среде, содержащей фосфинотрицин, после трансформации одновременно двумя конструкциями: pBISN-*desC-licBM3* и

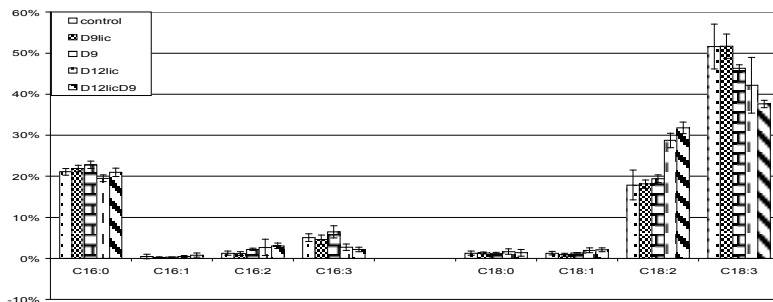


Рис. Соотношение жирных кислот в мембранах трансгенных линий *N. tabacum*. В качестве контроля использованы нетрансгенные растения табака

рСВ133 (ген устойчивости к раундапу и селективный ген устойчивости к фосфинотрицину).

Методом газовой хроматографии-масс-спектрометрии анализировали соотношение жирных кислот в экстрактах липидов клеточных мембран трансгенных растений табака. Было проанализировано 19 линий растений. Наибольшие отличия от контроля наблюдали у растений, содержащих ген *desA-licBM3* и у двойных трансформантов, которые содержали гены *desA-licBM3* и *desC* (рис.). Соотношение ненасыщенных жирных кислот в клеточных мембранах растений данных линий было смещено в сторону накопления дву ненасыщенной линолевой кислоты, которая, считается, обуславливает устойчивость клеток к воздействию холода [1, 2].

Для оценки устойчивости растений к холоду определяют показатели окислительного повреждения клетки и измеряют уровень специфических метаболитов, содержание которых связано со стрессовым разобщением мембранных электронтранспортных цепей и появлением в клетке реакционно-активных форм кислорода. Одной из таких форм является пероксид водорода. Вместе с супероксид-анионом и гидроксил-радикалом, это вещество принимает участие в реакциях перекисного окисления липидов — одной из первых мишеней холодового стресса. Поэтому в ходе нашей работы мы исследовали содержание пероксида водорода и накопление основного продукта окисления липидов (малонового диальдегида) в растениях контрольных и трансгенных линий в нормальных условиях и условиях холодового стресса. Обнаружено отличие между содержанием обоих веществ в ряде трансгенных линий растений и контрольных линий. Показано, что некоторые трансгенные растения, которые экспрессируют гены десатураз $\Delta 9$ и $\Delta 12$, в условиях холодового стресса накапливают пероксид водорода и малоновый диальдегид в тех же количествах, что и контрольные растения, которые не подвергались холодовой обработке.

Выводы

Проведена генетическая трансформация *Nicotiana tabacum* и *Brassica napus* генами ацил-липидных десатураз *desC* ($\Delta 9$) *Synechococcus vulcanus* и

desA (D12) *Synechocystis* sp. PCC 6803 (нативные или слитые с репортерным геном термостабильной лихеназы из *Clostridium thermocellum*) и доказаны присутствие и экспрессия трансгена в полученных растениях. Для ряда полученных линий трансгенных растений табака показаны изменения спектра жирных кислот мембранных липидов в сторону накопления двуненасыщенной линолевой кислоты и повышенная устойчивость к холодовому стрессу.

Работа выполнялась в рамках совместного российско-украинского проекта "Изучение механизмов устойчивости высших растений к абиотическим стрессам благодаря гетерологической экспрессии генов цианобактерий", грант РФФИ 2008–2009 №08-04-90410_укр (тема №П-16-09, номер гос. регистрации УНТЦ 0108U003265).

Литература

1. Лось Д.А. Структура, регуляция экспрессии и функционирование десатураз жирных кислот // Успехи биологической химии.— 2001.— **41**: 163–198.
2. Los D.A., Murata N. Membrane fluidity and its roles in the perception of environmental signals // Biochimica et Biophysica Acta.— 2004.— **1666**: 142–157.
3. Guschina I.A., Harwood J.L. Mechanisms of temperature adaptation in poikilotherms // FEBS Letters.— 2006.— **580**: 5477–5483.
4. Голденкова И.В., Мусийчук К.А., Пирюзян Э.С. Репортерная система, основанная на термостабильности лихеназы *Clostridium thermocellum*, для изучения регуляции экспрессии генов в клетках про- и эукариотических организмов // Молекулярная биология.— 2002.— **36**(4): 868–876.
5. Маали Р., Шимишлашвили Х.Р., Пчёлкин В.П., Цыдендамбаев В.Д., Носов А.М., Лось Д.А., Голденкова-Павлова И.В. Сравнительное изучение экспрессии нативного и гибридного гена ацил-липидной Δ^9 -десатуразы в бактериях *Escherichia coli* // Генетика.— 2007.— **43**(2): 1–7.
6. Maali A.R., Goldenkova-Pavlova I.V., Pchelkin V.P., Tsydendambaev V.D., Los D.A., Nosov A.M. Acyl-lipid D12-desaturase of the cyanobacterium increases the unsaturation degree in transgenic potato (*Solanum tuberosum* L.) // Biologija.— 2007.— **53**: 4–7.
7. Marillonnet S., Thoeringer C., Kandzia R., Klimyuk V., Gleba Y. Systemic *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transfection of viral replicons for efficient transient expression in plants // Nat. Biotechnol.— 2005.— **23**: 718–723.
8. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant.— 1962.— **15**: 473–497.
9. Horsch R.B., Fraley R.T., Rogers S.G., Sanders P.R., Lloyd A., Hoffmann N. Inheritance of functional foreign genes in plants // Science.— 1984.— **223**: 496–498.
10. Сахно Л.А., Гочева Е.А., Комарницкий И.К., Кучук Н.В. Стабильная экспрессия беспромоторного гена *bar* в трансформированных растениях // Цитология и генетика.— 2008.— **42**(1): 16–22.
11. Герасименко И.М., Сахно Л.А., Головач И.С., Кищенко Е.М., Синдаровская Я.Р., Шимишлашвили Х.Р., Шелудько Ю.В., Голденкова-Павлова И.В. Получение растений, несущих гены ацил-липидных десатураз цианобактерий // Информационный Вестник ВОГиС.— 2010.— **14**(1): (в печати).
12. Garces R., Mancha M. One-step lipid extraction and fatty acid methyl esters preparation from fresh plant tissues // Analytical Biochemistry.— 1993.— **211**: 139–143.

13. Дёмин И.Н., Дерябин А.Н., Синькевич М.С., Трунова Т.И. Введение гена *desA* D12-ацил-липидной десатуразы цианобактерии повышает устойчивость растений картофеля к окислительному стрессу, вызванному гипотермией (2008) Физиология растений.— 55: 710–720.

Резюме

Были сконструированы вектора для *Agrobacterium*-опосредованной трансформации растений генами десатураз цианобактерий, участвующими в процессах адаптации организма к холодному стрессу, слитыми с репортерным геном термостабильной лихеназы *Clostridium thermocellum*, и проведена генетическая трансформация растений табака и рапса. У полученных растений исследовали изменения спектра жирных кислот мембранных липидов и резистентность мембран к холодному стрессу.

Було сконструйовано вектори для *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації рослин генами десатураз ціанобактерій, що беруть участь у процесах адаптації організму до холодного стресу, злитими з репортерним геном термостабільної ліхенази з *Clostridium thermocellum*, і проведено генетичну трансформацію рослин тютюну і рапсу. Для отриманих рослин досліджено зміни спектру жирних кислот мембраних ліпідів і резистентність до холодного стресу.

Plasmid constructs for *Agrobacterium*-mediated transformation of plant nuclear genome with cyanobacterium desaturase genes responsible for cold stress adaptation fused with reporter *Clostridium thermocellum* lichenase gene were built up and used to obtain transgenic plants of tobacco and rape. Lipid fatty acid spectrum change and cold stress tolerance was studied for obtained transgenic plants.

ЩЕРБАК Н.Л., САХНО Л.А., КОМАРНИЦКИЙ И.К.

*Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины
Украина, 03068, Киев, ул. Академика Заболотного, 148
e-mail: natasha@iicb.kiev.ua*

ИЗУЧЕНИЕ *LOX*-ОПОСРЕДОВАННОЙ ЭКСПРЕССИИ В ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЯХ

В наше время трансгеноз (перенос и реализация генетической информации) является направлением исследований, которые дают ответ на многочисленные фундаментальные вопросы. При изучении функционирования чужеродных генов в трансгенных растениях были охарактеризованы и исследованы механизмы регуляции экспрессии, идентифицированы новые промоторные и энхансерные последовательности. Методы геной инженерии, в частности *gene tagging*, также позволяют определять последовательности, регуляторный потенциал которых проявляется только в определенном генетическом окружении, критические (от англ. *cryptic*) промоторы. Критические регуляторные элементы обнаружены у разных организмов, как в

непосредственной близости возле кодирующего участка генов, так и в не-транскрипционных последовательностях генома [1–3]. В геноме табака выявили криптический промотор, который обеспечивал экспрессию гена в покровных тканях семян [4], а также конститутивный криптический промотор *tCUP* [5], активность которого подтвердилась при трансформации растений табака и арабидопсиса [6].

Мы в нашей работе также столкнулись с ситуацией, когда экспрессия гена происходила под влиянием последовательности, которая не имеет традиционной для промоторов структуры и обеспечивает экспрессию только в определенном окружении. Но, в отличие от криптических промоторов, эта последовательность не является геномной ДНК растений. В наших экспериментах в трансгенных растениях табака экспрессия беспромоторного гена *bar* происходила под влиянием *lox*-сайта бактериофага P1, размещенного в генетических конструкциях непосредственно возле правого бордера Т-ДНК (*RB-lox-bar*-). Для трансформации были использованы вектора, которые содержат *lox*-сайт и ген *bar* без промотора возле правого бордера Т-ДНК, а также ген *nptII* под контролем *pos* промотора. Трансгенные растения были отобраны по устойчивости к антибиотику канамицину. При тестировании этих растений на селективной среде, которая содержит фосфинотрицин, было установлено, что большинство трансформированных растений (около 80%) устойчивы к этому гербициду [7]. Такой результат был довольно неожиданным, но дальнейшие эксперименты подтвердили, что размещение *lox*-сайта в генетических конструкциях возле *RB* обуславливает стабильную экспрессию следующего за ним беспромоторного гена *bar*. О наличии экспрессии свидетельствовала устойчивость трансгенных растений к гербициду фосфинотрицину, а также наличие соответствующей мРНК в тотальной РНК растений. *Lox*-опосредованная экспрессия зависит от способа внесения Т-ДНК в растительный геном и происходит только в трансгенных растениях, полученных методом агробактериальной трансформации. Возможность *lox*-опосредованной экспрессии была показана на многих растительных видах. С помощью вышеупомянутых векторов были получены устойчивые к фосфинотрицину трансгенные растения таких сельскохозяйственно ценных видов, как рапс [8], картофель и свекла (неопубликованные данные).

Целью наших дальнейших исследований было изучить возможность *lox*-опосредованной экспрессии при размещении *lox* сайта возле левого бордера, а также провести контрольный эксперимент с вектором, в котором последовательность *lox*-сайта заменена на АТ богатую последовательность ДНК.

Материалы и методы

Плазмиды и бактериальный штамм. Векторные конструкции pICH3737 и pICBV19 были любезно предоставлена компанией Icon Genetics GmbH (г. Халле, Германия). Вектор pCB108 является производным вектора

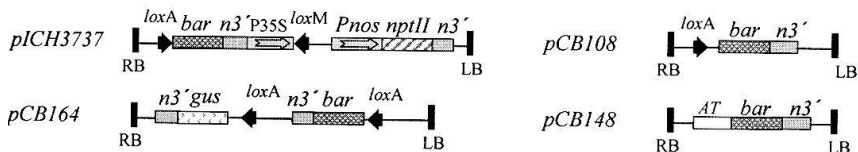


Рис. Схема Т-ДНК плазмидных векторов

pICH3737 и получен в результате делеции *XhoI/EheI* фрагмента этого вектора. Из вектора pCB108 *loxA* сайт вырезали рестриктазами *BamHI/Ecl136II* и проводили инсерцию AT богатой последовательности, которая была амплифицирована из межгенного спейсера *psbA-petB* хлоропластной ДНК табака. Вектор pCB164 является производным вектора pICBV19, и содержит *loxA* сайт между левым бордером и кодирующей последовательностью *bar* гена. Плазмидные вектора были использованы для трансформации *Agrobacterium tumefaciens* (штамм GV3101). Культивирование агробактерии проводили как описано в [7].

Агробактериальная трансформация растений. Для генетической трансформации табака использовали листья асептических растений сорта Dubec и Wisconsin. Трансформацию проводили методом сокультивации листовых дисков табака с агробактерией на жидкой среде MS в течении суток, после чего экспланты переносили на агаризованную среду MS, содержащую 1,0 мг/л ВАР, 0,1 мг/л NAA, а также фосфинотрицин 5 мг/л и цефотаксим 600 мг/л. Укоренение растений проводили на среде MS, содержащей фосфинотрицин 5 мг/л, цефотаксим 200 мг/л.

Анализ трансгенных растений с помощью ПЦР проводили как описано в [7].

Результаты и обсуждение

Для определения возможности *lox* опосредованной экспрессии при размещении *lox* сайта возле левого бордера был сконструирован вектор pCB164. В векторе pCB148 *lox* сайт возле правого бордера был заменен на AT богатую последовательность межгенного спейсера хлоропластной ДНК. Идея создания этого вектора возникла, поскольку последовательность *lox* сайта является AT богатой, и нам было интересно сравнить влияние на экспрессию трансгена *lox* сайта и произвольно выбранной AT богатой последовательности, размещенной в векторе аналогичным образом. Вектор pCB108 содержит *lox* сайт возле правого бордера и не содержит других селективных генов, а также других промоторов, которые могут быть энхансерами для *lox* опосредованной экспрессии. На наш взгляд, эта конструкция интересна тем, что дает возможность получать устойчивые к гербициду растения, привнося в геном минимум чужеродной генетической информации.

В результате экспериментов по трансформации растений табака были получены трансгенные растения, устойчивые к гербициду фосфинотрицину,

Эффективность регенерации растений табака на селективной среде, после трансформации конструкциями, содержащими *lox* сайт вблизи от бордеров Т-ДНК

Конструкция	Количество эксплантов	Эффективность регенерации, %
pICH3737/RB- <i>lox-bar</i> /	20	77±2,79
pCB108/RB- <i>lox-bar</i> /	20	18±3,80
pCB164/LB- <i>lox-bar</i> /	20	28±2,79
pCB148/RB-AT- <i>bar</i> /	20	0±0,00

* Эффективность регенерации оценивали как соотношение количества эксплантов, дающих зеленые побеги на селективной среде, к общему количеству эксплантов в эксперименте. Эффективность регенерации представлена как средняя величина, полученная по результатам трех независимых экспериментов по трансформации.

со всеми вышеупомянутыми конструкциями, кроме вектора pCB148. После сокультивации с агробактерией, экспланты переносили на среду для регенерации, содержащую селективный агент фосфинотрицин в концентрации 5 мг/л. Количество эксплантов, активно регенерирующих на селективной среде, значительно варьировало для каждой конструкции. Тогда как отобранные на селективной среде растения практически все укоренились, и методом ПЦР была подтверждена их трансгенная природа. Учитывая эти данные, мы посчитали, что вполне корректно и при этом более информативно для оценки *lox* опосредованной экспрессии, сравнить частоту регенерации растений на селективной среде. Данные представлены в таблице.

Трансгенные растения табака pCB108 были высажены в грунт в условиях теплицы. Обработка тепличных растений гербицидом BASTA (действующее вещество — фосфинотрицин) подтвердила устойчивость этих растений к гербициду. В результате самоопыления были получены семена трансгенных растений, проростки которых при анализе *in vitro* на устойчивость к фосфинотрицину показали расщепление 3:1 по этому признаку.

Выводы

Были получены трансгенные растения табака, в которых экспрессия беспромоторного гена *bar* происходила под влиянием *lox* сайта вблизи от левого бордера Т-ДНК. Также была показана возможность *lox* опосредованной экспрессии гена *bar* у растений, трансформированных вектором pCB108, не содержащим дополнительных селективных генов и каких-либо промоторов. И хотя эффективность трансформации по сравнению с исходной плазмидой pICH3737 была значительно ниже, экспрессия *bar* гена в полученных трансгенных растениях была стабильной и сохранялась в поколении T1.

Литература

1. Karoun A.M., Kaufman T.C. A functional analysis of 5' intronic and promoter regions of the homeotic gene proboscipedia in *Drosophila melanogaster* // *Development*. — 1995, Jul; 121(7): 2127–41.

2. *Irniger S., Egli C.M., Kuenzler M., Braus G.H.* The yeast actin intron contains a cryptic promoter that can be switched on by preventing transcriptional interference // *Nucleic Acids Res.*— 1992, Sep. 25; 20(18): 4733–9.

3. *Palmer C.N., Hsu M.H., Muerhoff A.S. et al.* Interaction of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha with the retinoid X receptor alpha unmasks a cryptic peroxisome proliferator response element that overlaps an ARP-1-binding site in the CYP4A6 promoter. *J. Biol Chem.*— 1994, Jul 8; 269(27): 18083–9.

4. *Fobert P.R., Labbe H., Cosmopolous J., Gottlob-McHugh S., Ouellet T., Hattori J., Iyer V.N., Miki B.L.* T-DNA tagging of a seed coat-specific cryptic promoter in tobacco. *Plant J.*— 1994.— 6: 567–577.

5. *Foster P.R., Hattori J., Labbe H., Ouellet T., Fobert P.R., James L.E., Iyer V.N., Miki B.L.* A tobacco cryptic constitutive promoter, *tCUP*, revealed by T-DNA tagging. *Plant. Mol. Biol.*— 1999.— 41: 45–55.

6. *Wu K, Malik K, Tian L, Hu M. et al.* Enhancers and core promoter elements are essential for the activity of a cryptic gene activation sequence from tobacco, *tCUP*. *Mol Genet Genomics.*— 2001, Jul; 265(5): 763–770.

7. *Щербак Н.Л., Белокурова В.Б., Гецко И.О. и др.* Изучение влияния *lox*-сайтов Cre *lox* системы рекомбинации на экспрессию беспромоторного *bar* гена в трансгенных растениях // *Цитология и генетика.*— 2006.— 1.— С. 3–9.

8. *Сахно Л.А., Гочева Е.А., Комарницкий И.К., Кучук Н.В.* Стабильная экспрессия беспромоторного гена *bar* в трансформированных растениях рапса // *Цитология и генетика.*— 2008.— Т.42, №1.— С. 21–28.

Резюме

Последовательность *lox* сайта бактериофага P1 была использована нами в векторах для трансформации растений и изучено её влияние на экспрессию беспромоторного *bar* гена при размещении *lox* сайта возле правого (RB) или левого (LB) бордеров T-ДНК, вблизи от сайта инициации транскрипции. *Lox* опосредованная экспрессия *bar* гена, распознаваемая по устойчивости трансгенных растений к гербициду фосфинотрицину, наблюдалась у растений, полученных в результате трансформации векторами обоих типов.

Послідовність *lox* сайту бактеріофагу P1 була використана у векторах для трансформації рослин та вивчено її вплив на експресію безпромоторного *bar* гену при розміщенні *lox* сайту біля правого (RB) або лівого (LB) бордеру T-ДНК. *Lox* опосередкована експресія *bar* гену, що розпізнавалася завдяки стійкості трансгенних рослин до гербициду фосфінотрицину, спостерігалась у рослин, які були трансформовані конструкціями обох типів.

Lox sites of the Cre/*lox* recombination system from bacteriophage P1 were analyzed for their ability to influence of *bar* gene expression in transgenic plants when inserted upstream from a gene coding sequence adjacent to the right border and left border of T-DNA. *Lox*-mediated expression of *bar*-gene, recognized by resistance to PPT of transgenic plants, was permanent and occurred in plants obtained via *Agrobacterium*-mediated transformation with both type of vectors: containing *lox* site near RB and LB of T-DNA.

**BORISJUK N.V¹., ANDRIANOV V¹., POGREBNIYAK N¹., BRINKER A².,
DIXON J²., FLYNN J¹., MATYSZCZUK P¹., ANDRYSZAK K¹., LAURELLI M¹.,
SPITSIN S¹., GOLOVKIN M¹., KOPROWSKI H¹.**

*¹Biotechnology Foundation Laboratories, Thomas Jefferson University,
1020 Locust Street, Philadelphia, PA 19107, USA. E-mail: NBorsisjuk@gmail.com*

*²Dept. of Nutritional Sciences and Rutgers Center for Lipid Research,
Rutgers University, 96 Lipman Drive, New Brunswick, NJ 08901, USA*

METABOLIC ENGINEERING OF PLANT BIOMASS PRODUCTION OF BIOFUEL

Uncertainties of fossil oil supplies and growing demand for energy provoked a surge of interest in renewable energy resources and greatly stimulated intense academic and applied research on biofuel, plant-derived ethanol and oil [1, 2]. Ethanol has been traditionally produced by fermentation plant produced sugars (sugarcane, sugar beet) and starch (corn, potato). A lot of efforts and resources are currently directed to develop second generation technologies for ethanol production from the lignocellulosic materials which compose the majority of plant biomass [3]. Another challenge lies in the efficient production of biodiesel fuels based on plant oils [4].

Biodiesel production is usually associated with seeds of selected plant species, such as sunflower, soybean, rapeseed or jatropha, which accumulate oil in the form of triacylglycerols (TAGs) as storage reserves. While the oil content can reach 40–50% of seed dry weight, the yields of oil-rich seeds are rather limited. Despite accumulation in seeds, primary lipid synthesis occurs in green photosynthetic tissues, leaves and stems [5], which constitute a significantly larger portion of plant biomass than seeds. A number of recent studies indicated that gene manipulations enable the relocation or elevation of oil storage in alternative plant organs such as roots, stems or leaves making the green biomass a plausible system for manufacturing biodiesel [6, 7]. It is well documented that enhanced expression of some enzymes involved in lipid metabolism can lead to increased oil accumulation in different plant organs [5, 6]. The second set of published data relates to channeling oil accumulation to leaf tissues by leaf-specific expression of genes coding for transcription factors that regulate seed development and maturation. When constitutively expressed in leaves, some of transcription factors, e.g. LEC1, LEC2 or WR11, induced the formation of seed-like structures and stimulated oil synthesis in the vegetative green tissues [8].

In an attempt to investigate the potential of plant biomass as a new source of biodiesel oil, we chose tobacco, a plant that has been widely used in genetic engineering experiments. Tobacco, a well-established industrial crop used primarily for non-food consumption, is widely cultivated in more than 100 countries worldwide, yielding up to 170 tons per hectare of green tissues when grown for biomass production instead of smocking [9]. Analysis of leaves from 56 tobacco species revealed that the average content of extractable fatty acids (FA), which is the major component of biodiesel fuel, is about 3% per dry weight [10]. While

the representation of oil in green biomass is much lower than in the oil-crop seeds, the sheer volume of biomass and the possibilities of metabolic engineering makes tobacco an attractive and promising “energy plant” platform. It could also serve as a model for the utilization of developed engineering strategies in other high-biomass plants for biofuel production.

Here, we present our data on enhanced accumulation of fatty acids in tobacco biomass following the constitutive expression of an *Arabidopsis* gene DGAT, coding for diacylglycerol acyltransferase, a key enzyme in TAG biosynthesis, and inducible expression of transcription factor LEC2, a master regulator of seed maturation and oil storage.

Additionally, as a feedstock for cellulosic ethanol fermentation, tobacco has two main advantages over existing feedstocks: 1) it contains relatively high amount of easily fermentable sugars and, 2) the content of lignin, which significantly hampers cellulose degradation and therefore contributes to high processing expenses, is much lower in tobacco compared to other feedstocks considered for ethanol production such as switch grass or corn stover.

Materials and Methods

Generation of expression vectors and plant transformation. Full length *Arabidopsis thaliana* cDNAs coding for diacylglycerol acyltransferase (DGAT, Ac.# BT008883), and Leafy Cotyledons-2 transcription factor (LEC2 Ac.# DQ446296) were used for construction plant expression cassettes. DGAT under the control of RbcS promoter and LEC2 under the control of ethanol-inducible AlcA promoter, were put into plasmid pBIN-Plus and the resulting vectors were used for *Agrobacterium*-mediated transformation of tobacco.

DNA and protein analysis. The presence of DGAT and LEC2 expression cassettes in transformed tobacco lines was confirmed by PCR analysis. The expression of DGAT and of LEC2 polypeptides has been confirmed by protein Western blot analysis.

Stimulation of LEC2 expression. The expression of LEC2 gene was induced by stimulating AlcR-promoter in 6-8 week old tobacco with 0.1% or 1% water solution of acetaldehyde. Induction was repeated twice with an interval of 24h and samples were taken for lipid analysis and mRNA expression analysis at 24h, 48h and 120h after the initial treatment.

Lipid extraction and analysis. For Liquid Chromatography (LC-MS) analysis total lipids were isolated by hexane extraction from lyophilized plant tissues. Extracted lipids were separated and analyzed using a Dionex UltiMate 3000 LC system partnered with an Applied Biosystems (Foster City, CA) 4000 Q Trap mass spectrometer with an electrospray ionization source. TAG amounts, adjusted for the internal standard, were calculated from a standard curve of triolein. For Gas Chromatography (GC) analysis of fatty acids, total lipids were extracted into chloroform using the methanol-chloroform procedure of Bligh and Dyer [10]. Extracted lipids were methylated and the fatty acids esters were analyzed by GC using Shimadzu Model GC-8APF gas chromatographer. To identify individual fatty acids, retention times of sample peaks were compared to peaks of

certified methylated fatty acid standards of rape seed oil. Fatty acid content was quantified using heptadecanoic acid as an internal standard added to samples prior to extraction.

Results and Discussion

Overexpression of DGAT results in increased TAG synthesis and accumulation of fatty acids. Tobacco, *Nicotiana tabacum*, cv. Wisconsin and a variety with elevated sugar content, NC-55, were transformed with *Arabidopsis* gene DGAT under the control of strong RbcS promoter with the aim of enhancing the synthesis of triacylglycerols (TAGs) in tobacco leaves. Prior to chromatographic lipid analysis, selected kanamycin resistant tobacco plantlets were grown for 3 months in a greenhouse and visually pre-selected by microscopic analysis of Sudan IV stained oil bodies in leaf samples. The plants with an increased number of oil bodies were subjected to analysis of TAGs by liquid chromatography mass spectroscopy (LC-MS) and/or to the analysis of total extracted fatty acid esters by Gas-chromatography (GC).

LC-MS analysis revealed up to a 20-fold increase in TAG accumulation in the tobacco plants overexpressing DGAT as compared to wild type. This increase in TAGs, which represent only 15-20% of total fatty acids in leaves, translated into an overall 2-fold increase of extractable fatty acids, up to 5.6% of tobacco dry biomass as determined by quantitative GC analysis, compared to 2.8% fatty acid content in untransformed tobacco, cv. Wisconsin. The reasoning for using high-sugar tobacco variety NC-55 in this study was the assumption that it could contain a higher background lipid levels because sugars are the primary precursors in fatty acid biosynthesis [5]. Indeed, the wild type cv. NC-55 demonstrated almost 30% higher total FAs compared to cv. Wisconsin, totaling 3.7% of dry weight. Overexpression of *Arabidopsis* DGAT enzyme in NC-55 tobacco led to persistently high accumulation of fatty acids above 5% of dry weight, with the highest FA level of 6%.

Enhanced TAG synthesis causes change in oil fatty acid composition.

The observed increase in total FA accumulation in tobacco leaves was accompanied by a drastic shift in the fatty acid composition. Three fatty acids, linolenate, linoleate and palmitate, are usually predominant in the green parts of plants including tobacco [9]. In transgenic tobacco lines of cv. Wisconsin, the proportion of linolenate was reduced to 30-40% as compared to 61% in wild-type plants, while oleate increased from 1.5% to 20-25% in total extracted fatty acids. Changes in the TAG fraction of tobacco oil in DGAT-overexpressing tobacco were even more profound, with a decrease in linolenate from 60% to about 20%, and accumulation of 50-60% of oleate. Although the exact fatty acid profiles differ among different transgenic lines due to variations in linolenate (18:3), linoleate (18:2), palmitate (16:0) and oleate (18:1) proportions, the trend toward an increased proportion of more saturated oleate and decrease of unsaturated linoleate was obvious. In the context of developing tobacco biomass oil into a diesel fuel, such a shift is definitely desirable for making biodiesel with better fuel qualities.

Stimulation of LEC2 expression leads to both enhanced oil accumulation and a shift in oil fatty acid pattern. In order to confirm the concept of regulated accumulation of oil in tobacco biomass, we generated and tested tobacco plants expressing the LEC2 gene under the control of ethanol-inducible AlcA promoter of *Aspergillus nidulans* [12]. We opted for an inducible promoter in this case to avoid potential problems that constitutive expression of *LEC2* could cause by interfering with the plant growth/development program [13]. To stimulate the expression of *LEC2*, roots of three month old plants were treated by soil drenching with 0.1% and 1% acetaldehyde, which is a product of ethanol metabolism and a physiological inductor of AlcA. While the level of oil accumulation varies between individual plants 0.1% acetaldehyde treatment increased extracted fatty acids up to 5.5%, and 1% acetaldehyde treatment resulted in a more than double increase of total extracted FA, from 2.9% to 6.8% of dry weight in selected lines. Similar to tobacco plants over-expressing DGAT, we observed a shift in fatty acid composition following the stimulated expression of *LEC2*.

Additional means of increasing oil accumulation include using other strong enhancers/promoters in combination with DGAT or other key enzymes influencing oil biosynthesis such as acetyl-CoA carboxylase or thioesterase [5, 6], gene amplification technology [14], or inhibition of the pathways of lipid breakdown [15].

Conclusion

By generating both oil and ethanol, tobacco has the potential to produce substantial amount of renewable biofuel to be considered as one of the promising “energy crop” platform; the obtained data could be also used to develop efficient strategies for metabolic engineering of other plants with enhanced accumulation of fatty acids to be used as biodiesel.

References

1. Henry R.J. Evaluation of plant biomass resources available for replacement of fossil oil // Plant Biotechnol. J.— 2010.— Vol.8.— P. 288–293.
2. Биоторливо и сельское хозяйство — технический обзор // ftp.fao.org/docrep/FAO.
3. Hahn-Høgerdal B., Galbe M., Gorwa-Grauslund M.F., Liden G., Zacchi G. Bio-ethanol — the fuel of tomorrow from the residues of today // Trends Biotechnol.— 2006.— Vol.24.— P. 549–556.
4. Ma F., Hanna M.A. Biodiesel production: a review // Biores. Technol.— 1999.— Vol.70.— P. 1–15.
5. Thelen J.J., Ohlrogge J.B. Metabolic engineering of fatty acid biosynthesis in plants // Metabolic Eng.— 2002.— Vol.4.— P. 12–21.
6. Durrett T.P., Benning C., Ohlrogge J. Plant triacylglycerols as feedstocks for the production of biofuels // The Plant J.— 2008.— Vol.54.— P. 593–607.
7. Andrianov V., Borisjuk N., Pogrebnyak N., Brinker A., Dixon J., Spitsin S., Flynn J., Matyszczuk P., Laurelli M., Golovkin M., Koprowski H. Potential of tobacco as a production platform for biofuel: overexpression of Arabidopsis DGAT and LEC2 genes increases accumulation and shifts the composition of lipids in green biomass // Plant Biotechnol. J.— 2010.— Vol.8.— P. 277–287.

8. Santos-Mendoza M., Dubreucq B., Baud S., Parcy F., Caboche M., Lepiniec L. Deciphering gene regulatory networks that control seed development and maturation in Arabidopsis // Plant J.— 2008.— Vol.54.— P. 608–620.
9. Schillberg S., Fischer R., Emans N. 'Molecular farming' of antibodies in plants / Naturwissenschaften.— 2003.— Vol.90.— P. 145–155.
10. Koiwai A., Suzuki F., Matsuzaki T., Kawashima N. The fatty acid composition of seeds and leaves of *Nicotiana* species // Phytochemistry.— 1983.— Vol.22.— P. 1409–1412.
11. Bligh E.G., Dyer W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification // Can. J. Biochem. Physiol.— 1959.— Vol.37.— P. 911–917.
12. Caddick M.X., Greenland A.J., Jepson I., Krause K.P., Qu N., Riddell K.V., Salter M.G., Schuch W., Sonnewald U., Tomsett A.B. An ethanol inducible gene switch for plants used to manipulate carbon metabolism // Nat. Biotechnol.— 1998.— Vol.16.— P. 177–180.
13. Braybrook S.A., Stone S.L., Park S., Bui A.Q., Le B.H., Fischer R.L., Goldberg R.B., Harada J.J. Genes directly regulated by LEAFY COTYLEDON2 provide insight into the control of embryo maturation and somatic embryogenesis // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.— 2006.— Vol.103.— P. 3468–3473.
14. Borisjuk N., Borisjuk L., Komarnytsky S., Timeva S., Hemleben V., Gleba Y., Raskin I. Tobacco ribosomal DNA spacer element stimulates amplification and expression of heterologous genes // Nat Biotechnol.— 2000.— Vol.18.— P. 1303–1306.
15. Slocombe S., Cornah J., Pinfield-Wells H., Soady K., Dyer J., Graham A. Oil accumulation in leaves directed by modification of fatty acid breakdown and lipid synthesis pathways // Plant Biotech. J.— 2009.— Vol.7.— P. 694–703.

Summary

Tobacco plants engineered to constitutively overexpress DGAT, a key enzyme in plant lipid biosynthesis, or to inducibly express a transcription factor LEC2 that govern seed maturation, have about two-fold increase in total fatty acid content in their green biomass. The increased fatty acid content was accompanied by changes in their composition that favor development of tobacco as a renewable source of biofuel.

**АТРАМЕНТОВА Л.А., КАРАЧЕНЦЕВ Ю.И., ГОРШУНСКАЯ М.Ю.,
ТЫЖНЕНКО Т.В., КРАВЧУН Н.А., ПОЧЕРНЯЕВ А.К., БАРБУЛ О.П.,
ПОЛТОРАК В.В.**

¹ГУ “Институт проблем эндокринной патологии им. В.Я. Данилевского АМН Украины”,
Украина, 61002, Харьков, ул. Артёма, 10

²Харьковская медицинская академия последипломного образования,
Украина, 61176, Харьков, ул. Корчагинцев, 58

³Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина,
Украина, 61077, Харьков, пл. Свободы, 4, e-mail: wshkoda23@rambler.ru

О РЕГИОНАЛЬНОМ РЕГИСТРЕ МАРКЁРОВ САХАРНОГО ДИАБЕТА 2 ТИПА

В настоящее время в Украине более миллиона людей больны сахарным диабетом (СД). Примерно 86% случаев заболевания СД приходится на 2 тип. Считается, что реальное количество больных в 2–3 раза больше за счёт не выявленных и скрытых форм заболевания. Эти люди с высокой генетической предрасположенностью к заболеванию должны стать объектом целенаправленной профилактики СД. Выявление таких людей проводится по специальным признакам – маркёрам наследственной предрасположенности. К настоящему времени накоплена обширная информация о ДНК-маркёрах и генах-кандидатах СД [1–5]. Это создаёт хорошие возможности для выявления группы повышенного риска, однако практическое использование результатов молекулярно-генетических исследований ещё отстаёт от научных разработок.

Эффективность использования маркёров зависит, как известно, от разницы их частот в сравниваемых группах, поэтому диагностическая ценность каждого маркёра имеет локально-популяционное значение. СД 2 типа — заболевание этноспецифичное. У современных народов, предки которых в течение тысячелетий занимались земледелием, заболеваемость сахарным диабетом значительно ниже, чем у тех, чьи предшественники в недавнем прошлом вели образ жизни охотников, собирателей или скотоводов. В европейских странах сахарным диабетом 2 типа больны 3–6% населения, в Полинезии и Микронезии — 25–30%. Среди жителей США европейского происхождения больные СД 2 типа составляют 5%, среди афроамериканцев — 10%, выходцев из Мексики — 24%. У индейцев Пима СД 2 типа поражены 35%, а в возрасте 55–64 лет — 70% населения. В ходе предшествующей генно-культурной коэволюции у народов-земледельцев сформировался генофонд, адаптированный к пище с высоким гликемическим индексом. Генофонд народов, которые вследствие глобализации приобщились к западной цивилизации, но не прошли адаптации в процессе биологической эволюции, оказался не приспособленным к этим условиям. Эпидемию СД, которая поразила эти народы, генетики рассматривают как реакцию определённых генотипов на новые факторы среды. Понимание этого приводит к мысли о необходимости разрабатывать систему мер по профилактике СД 2 типа в

каждом населении с учётом его индивидуальной истории и местных условий. В данной статье представлены данные об однонуклеотидных полиморфизмах (SNP) генов параоксоназы *PON-1* и адипонектина *APM-1* и изложены принципы создания региональных регистров для выделения группы риска по заболеванию СД 2 типа.

Материалы и методы

Образцы крови 213 больных СД 2 типа получены в клинике Института проблем эндокринной патологии им. В.Я. Данилевского АМН Украины (г. Харьков). Образцы крови 200 здоровых доноров получены на Харьковской областной станции службы крови с их письменного согласия. Все обследованные, украинцы и русские, были жителями Харькова и Харьковской области. Учитывались генеалогические данные и место рождения обследованных. ДНК выделена из лейкоцитов при помощи ионообменной смолы ChelexR100. Однонуклеотидную замену *Q192R* в гене *PON-1* и однонуклеотидную замену *+276G>T* в гене *APM-1* определяли путём полимеразной цепной реакции. Разделение фрагментов ДНК после рестрикции проводится с помощью электрофореза в 2% агарозном геле. По информации о числе генотипов были рассчитаны частоты SNP у мужчин и женщин, русских и украинцев, больных СД 2 типа и здоровых людей. Для оценки связи между SNP и СД 2 типа рассчитывали показатели относительного риска (*RR*) и отношения шансов (*OR*) и 95% доверительные интервалы. Проверку статистических гипотез о равенстве распределений генотипов и частот SNP проводили помощью критерия χ^2 на уровне значимости 0,05.

Результаты и обсуждение

Однонуклеотидный полиморфизм *Q192R* гена *PON-1*, приводящий к изменению активности параоксоназы, представляет собой несинонимическую замену *Q192R* SNP, которая связана с продукцией двух изоферментов, различающихся аминокислотными остатками — глутаминовый (Q) или аргининовый (R) — в позиции 192 активного центра фермента. Аллельные варианты гена предлагают использовать в качестве маркёров повышенного риска к сердечно-сосудистым и эндокринным заболеваниям, поскольку активность данного фермента у больных имеет иные значения, чем у здоровых индивидов [5, 6]. Лocus *APM-1* ассоциирован с СД 2 типа [Kissenbah, Sonnenberg, Mylekust J. et.al., 2000]. Однонуклеотидная замена в этом гене (SNP+276G>T), ассоциированная с инсулиновой резистентностью [2], относится к интону 2.

По частотам SNP гена *PON-1* и гена *APM-1* различий между русскими и украинцами, больными СД 2 и здоровыми мужчинами и женщинами не обнаружено. Частоты SNP *PON-1* во всех сравниваемых группах находятся на уровне (p_Q) 0,65–0,70 и (p_R) 0,30–0,35. Частоты SNP гена *APM-1* также не различаются у больных и здоровых, не зависят от пола и национальности и составляют (p_G) 0,45–0,50 и (p_T) 0,50–0,55. Таким образом, поиск предрасполагающего и защитного аллеля в отношении СД 2 типа в изученном населении успехом не увенчался. Анализ генотипов также не выявил различий по полу и национальности обследованных. Различия по генотипам были обнаружены лишь между больными СД 2 типа и здоровыми. Среди больных

было больше гомозигот, чем в контрольной группе. Удельный вес (в %) генотипов по гену *PON-1* составляет (контроль/больные): *QQ* (39/57), *QR* (52/26) и *RR* (9/17) ($p < 0,05$). Для гена *APM-1* это соотношение составляет: *GG* (7/28), *GT* (77/43), *TT* (16/29) ($p < 0,05$). Расчёт относительного риска и отношения шансов показал, что для гомозиготы *QQ* (ген *PON-1*) вероятность заболеть СД 2 типа в 1,46 раза превышает среднее популяционное значение. У гомозиготы *RR* вероятность заболеть СД 2 типа повышена в 1,89 раза ($p < 0,05$). У носителей генотипа *QR* риск оказался в два раза меньше, чем в среднем для населения. Наличие гомозиготного генотипа по SNP *APM-1* повышает вероятность заболевания СД 2 типа в 2,5 раза, а у гетерозигот риск понижен в два раза по сравнению с популяционным значением ($p < 0,05$).

Отсутствие разницы по частотам аллелей изученных генов между русскими и украинцами в Харькове и Харьковской области указывает на возможность использования в данном регионе единого регистра для славянского населения. Это, однако, не означает, что различий между славянскими группами не будет и в других областях. Генофонд населения восточной части Украины формировался на протяжении более чем трёх сотен лет совместного проживания этнических русских и украинцев. Генетические миграции, происходящие на протяжении десятков поколений, а также обитание в одной и той же географической зоне могли привести к выравниванию аллельных частот у современных русских и украинцев, проживающих на этой территории, если допустить, что прежде такие различия имелись. Генофонд населения, проживающего на приграничных территориях западной Украины, испытывал давление миграций с иными генетическими характеристиками, а подразделённость популяции создать градиент частот. В связи с этим переносить локальные данные на всё население нужно с осторожностью.

Информация о частотах SNP и генотипах даёт представление о структуре популяции и процессах, которые в них происходят. Так, по гену *PON-1* структура населения Харьковской области в целом соответствует состоянию панмиксии (выполняется равновесие Харди—Вайнберга), но частоты генотипов не совпадают у выходцев из сёл и коренных горожан: последние чаще являются гетерозиготами. По SNP гена *APM-1* популяция отклоняется от состояния панмиксии в сторону значительного преобладания гетерозигот. Это говорит о селективной значимости данного локуса и целесообразности его углублённого исследования. Изученные локусы являются аутосомными (*PON-1* расположен на хромосоме 7, *APM-1* на хромосоме 3), но один лишь этот факт не является достаточным основанием для создания общего регистра. Ген может иметь неодинаковую адаптивную ценность у мужчин и женщин, специфически проявляться в разных популяциях.

Использовать молекулярный маркер для массового скрининга нецелесообразно, так как это даёт лишь небольшую прибавку в оценке риска. В изученном населении популяционная частота СД 2 типа составляет 1,5%. При носительстве предрасполагающего генотипа риск заболевания увеличивается в 1,5–2,5 раза, достигая 3–5%, что не выходит за пределы критического (10%), при котором медико-генетическое консультирование считается необходи-

мым. При использовании нескольких независимых маркёров прогноз уточняется, однако стоимость его увеличивается. Совершенствование технологии, безусловно, изменит ситуацию, однако в настоящее время применение ДНК-маркёров при массовом скрининге пока не оправдано — в настоящее время идёт процесс генетической инвентаризации. На первых этапах для прогнозирования целесообразно использовать другие, менее затратные показатели риска. Наиболее доступным предиктором наследственной предрасположенности является генеалогическая характеристика консультируемого, которая даёт представление о специфическом риске, в то время как молекулярные маркёры ассоциированы не только с искомым заболеванием, но и с другими, что, в общем, не противоречит идее об единой системе генотипа, как факторе развития признаков. Риск заболевания полигенной природы для родственника первой степени больного рассчитывается как квадратный корень из популяционной частоты [8], значит, риск для родственников первой степени больного составляет около 12% превосходит критическое значение, при котором рекомендуется медико-генетическое консультирование, что позволяет отнести индивида к группе риска. Уточнить вероятность заболевания позволяют легко доступные для анализа признаки, ассоциированные с заболеванием: индекс массы тела, морфологические особенности и др. Молекулярные маркёры целесообразно использовать для уточнения риска после того, как реализованы все другие, менее затратные методы. Использование ДНК-маркёров на заключительном этапе позволяет сделать прогноз более надёжным и сузить круг лиц, которым требуется превентивная терапия в первую очередь. Эффективность применения регионального регистра зависит от того, насколько широк его спектр и насколько информативны маркёры для локального населения. При формировании регистров нужно учитывать региональные особенности этнически гетерогенного населения, тип популяции (мегаполис, частичный изолят), наличие изолирующих механизмов и др. Выявление этнических, половых и других особенностей в распределении маркёров требует проведения более обширных исследований. Затраты на это исследование окупятся тем, что дорогостоящие профилактические меры будут направлены на людей, которые больше всего в этом нуждаются.

Литература

1. *Hivert M.-F., Manning A.K., McAteer J.B., Florez J.C., Dupuis J., Fox C.S., O'Donnell C.J., Cupples L.A., Meigs J.B.* Common variants in the adiponectin gene (*ADIPOQ*) associated with plasma adiponectin levels, type 2 diabetes, and diabetes-related quantitative traits // *Diabetes*.— 2008.— Vol.57.— P. 3353–3359.
2. *Menzaghi C., Trischitta V., Doria A.* Genetic influences of adiponectin on insulin resistance, type 2 diabetes, and cardiovascular disease // *Diabetes*.— 2007.— Vol.56.— P. 1198–1209.
3. *Vimalaswaran K.S., Radha V., Ramya K. et al* A novel association of a polymorphism in the first intron of adiponectin gene with type 2 diabetes, obesity and hypo adiponectinemia in Asian Indians // *Human Genetics*.— 2008.— V.123(6).— P. 599–605.
4. *Koch M., Hering S., Barth C.* Paraoxonase-1 192 Gln/Arg gene polymorphism and cerebrovascular disease: interaction with type 2 diabetes // *Exp Clin. Endocrinol. Diabetes*.— 2001.— Vol.109.— P. 141–145.

5. Antikainen M., Murtomaki S., Syvanne M. et al. The Gln-Arg 192 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. 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.

7. Kotur-Stevuljevic J., Spasic S., Stefanovic A. et al. Paraoxonase-1 (*PON1*) activity, but not *PON1* (*Q192R*) phenotype, is a predictor of coronary artery disease in a middle-ages Serbian population // Clin. Chem. Lab. Med.— 2006.— Vol.44(10).— P. 1206–1213.

8. Falconer D.S. The inheritance of liability to certain diseases with variable age of onset with particular reference to diabetes mellitus // Ann. Hum. Genet.— 1967.— Vol.31.— P. 1–20.

Резюме

Частоти SNP *Q192R* гена *PON-1* (p_O 0,65–0,70 и p_R 0,30–0,35), SNP +276G>T гена *APM-1* (p_G 0,45–0,50, p_T 0,50–0,55) не различаються у руських і українців, больных сахарным диабетом 2 типа и здоровых мужчин и женщин. Распределение этих SNP-генотипов не зависит от национальности и пола. Фактором риска по СД 2 типа является гомозиготность по указанным SNP.

Частоти SNP *Q192R* гена *PON-1* (p_O 0,65–0,70 и p_R 0,30–0,35), SNP +276G>T гена *APM-1* (p_G 0,45–0,50, p_T 0,50–0,55) не розрізняються у етнічних росіян і українців, хворих на цукровий діабет 2 типу і здорових чоловіків і жінок. Розподіл генотипів не залежить від національності і статі. Фактором ризику на ЦД 2 типу є гомозиготність за вивченими SNP.

The frequencies of SNP *Q192R* gene *PON-1* (p_O 0,65–0,70 and p_R 0,30–0,35) and SNP +276G>T gene *APM-1* (p_G 0,45–0,50 and p_T 0,50–0,55) are the same in Russians and Ukrainians, in patients with 2 type diabetes mellitus and healthy men and women. The distribution of genotypes does not depend on ethnicity and gender. The homozygotic persons have a higher risk of 2 type DM.

БАГАЦЬКА Н.В., КОВАЛЬОВА В.І., НЕФІДОВА В.С., МЕДЗЯНОВСЬКА О.В.

ДУ "Інститут охорони здоров'я дітей та підлітків АМН України",

Україна, 61153, Харків, пр. 50-річчя ВЛКСМ, 52-А, e-mail: iozdp@ukrpost.ua

ОЦІНКА СТАНУ ХРОМОСОМНОГО АПАРАТУ ХВОРИХ ДІТЕЙ ТА ПІДЛІТКІВ З РІЗНИМИ МУЛЬТИФАКТОРІАЛЬНИМИ ХВОРОБАМИ

На сьогодні особливу увагу дослідників привертає вивчення генетичних факторів у формуванні мультифакторіальних хвороб. Мультифакторіальні хвороби (МХ) — велика та різнобічна група, розвиток котрих визначається взаємозв'язком певних спадкових (мутацій або сполучень алелей) та середовищних факторів. Етіологія та патогенез МХ достатньо складні, багатоступеневі і остаточно ще не з'ясовані [5]. Відмічається зростання хронічних

неінфекційних захворювань, які виникають у різні періоди онтогенезу та призводять до передчасної інвалідності та смертності.

Негативні чинники середовища, до яких відносяться складні соціально-економічні умови і неповноцінне харчування, токсичні речовини і хвороботворні мікроби, психогенні та інші фізичні і хімічні впливи можуть бути чинниками ризику, котрі сприяють виявленню спадкової схильності до різної патології. Під впливом комплексу чинників навколишнього середовища відбуваються патологічні зміни в органах і системах; функціональні, морфологічні і генетичні зміни в організмі [2].

Однією з характеристик стану організму людини є оцінка її хромосомного апарату. В останні роки з'явилися роботи, присвячені дослідженню хромосомного апарату хворих з різними хронічними неінфекційними хворобами. Зокрема, роботи, спрямовані на вивчення стану хромосомного апарату у хворих з різною соматичною патологією, особливо ревматичною, нечисленні і суперечливі. Мутації хромосом можуть мати спадкову природу та бути причиною розвитку хромосомних захворювань, а з іншого, бути епізодом в онтогенезі людини і виникати внаслідок впливів на його геном різних факторів (радіації, хімічних речовин, вірусів і таке інше). Розлади метаболізму, які виникають у хворих з різною патологією, також можуть сприяти формуванню перебудов хромосом, що було підтверджено при цитогенетичному обстеженні дітей та підлітків з деякими хворобами [4], що, в свою чергу, дозволило авторам охарактеризувати такі перебудови, як неспецифічні та другорядні відносно до захворювання.

Вищезазначене обумовило мету дослідження — виявлення цитогенетичних особливостей у дітей та підлітків з різною мультифакторіальною патологією.

Матеріали і методи

Цитогенетичне дослідження проводилося за стандартною схемою [9]. Матеріалом для цитогенетичного аналізу були препарати хромосом, отримані з культури лімфоцитів периферичної крові. При відборі метафазних пластинок для хромосомного аналізу керувалися загальноприйнятими критеріями [1]. Ідентифікація хромосом проводилася на препаратах, які забарвлювались рутинним та диференційним методами.

Цитогенетичне обстеження виконано у 15 дітей 6–9 років з різними неінфекційними хворобами (неврологічними, органів травлення, порушеннями імунітету), народжених від батьків-ліквідаторів аварії на ЧАЕС; у 61 підлітка 14–18 років, хворого на остеоартроз (ОА); у 34 пробандів віком від 8 до 17 років із ревматоїдним артритом (РА).

Контрольну групу склали 34 практично здорових дитини, у яких було проаналізовано 2936 метафаз.

У всіх обстежених аналізували до 100 метафазних пластинок. У пробандів з різними неінфекційними хворобами, батьки яких зазнали радіаційного впливу внаслідок аварії на ЧАЕС, було досліджено 1496; у хворих на ОА — 5168; у пробандів із РА — 2860 метафазних пластинок. Усі діти і підлітки з МХ і здорові пробанди були обстежені в ДУ “ІОЗДП АМНУ”.

Аналіз метафазних пластинок хромосом проводили за допомогою бінокулярних мікроскопів “Leica Galen III”, “Ergoval” та “Leica CME”.

Статистична обробка результатів дослідження виконувалася на PC IBM з використанням табличних процесорів “SPSS Statistics 17,0”. Для визначення значущості розбіжностей між ознаками, що порівнювались, використовували критерій Стьюдента [3].

Результати та обговорення

Каріотип обстежених пробандів у всіх досліджуваних групах відповідав нормальному жіночому — 46,XX або чоловічому — 46,XY.

Цитогенетичне дослідження дітей із хронічними неінфекційними хворобами, батьки яких зазнали радіаційного впливу внаслідок аварії на ЧАЕС, показало, що у 100% пробандів визначено аберації хромосомного або хроматидного типу. Частота хромосомних мутацій в цій групі складала $3,61 \pm 0,48\%$, що вірогідно перевищувало частоту ХА у здорових дітей ($1,60 \pm 0,23\%$, $p < 0,001$).

Структура аберацій хромосомного типу представлена передчасним розходженням сестринських хроматид, нерозходженням хромосом, парними фрагментами, поліплоїдією. У одного хворого спостерігалось тотальне ушкодження хромосом. Вірогідні відмінності встановлено у частоті передчасного розходження хроматид ($0,47\%$ у хворих проти $0,0\%$ у здорових, $p < 0,01$) та поліплоїдій ($1,94\%$ проти $0,10\%$ відповідно, $p < 0,001$). Виникнення поліплоїдних клітин, які є проявом геномних порушень в організмі людини, обумовлено ендоредуплікацією хромосом у клітинах-попередниках і може виникати внаслідок формування анафазних дицентричних містків з наступним злиттям мітотично блокованих дочірніх ядер та здвоєння хромосомного набору зі всіма абераціями хромосомного набору в наступному мітозі [8]. У 40% дітей з різними МХ, батьки яких зазнали впливу іонізуючої радіації, були виявлені парні фрагменти ($0,47\%$ у хворих і $0,85\%$ у здорових дітей, $p > 0,05$).

Відомо, що хроматидні аберації можуть виникати внаслідок впливу різних мутагенних факторів: інкорпорованих радіонуклідів, хімічних мутагенів, вірусних та бактеріальних інфекцій, що не дозволяє вважати їх характерними ознаками впливу іонізуючої радіації. Частота аберацій хроматидного типу була практично однаковою в обох групах порівняння ($0,60\%$ у хворих на МХ і $0,65\%$ — у здорових осіб, $p > 0,05$). Отримані нами результати можна пояснити тим, що у зонах інтенсивного промислового виробництва накопичуються хімічно-шкідливі речовини у ґрунті та ґрунтових водах, що сприяє розвитку цитогенетичних порушень та призводить до зниження загального здоров'я і зростання числа хронічних неінфекційних захворювань [7].

Іншими групами досліджуваних були хворі на ОА та РА. У 95,0% хворих на ОА були визначені різні аномалії хромосомного апарату. Загальна частота аберацій у пробандів із ОА складала 5,59%, що вірогідно перевищувало рівень хромосомних мутацій у здорових однолітків ($1,60\%$, $p < 0,001$). Порушення структури хромосом були представлені аномаліями хромосомного та хроматидного типів.

Серед аберацій хромосомного типу переважали парні фрагменти, які визначалися у 89,0% хворих та складали 3,13% у хворих на ОА і 0,85% у здорових, $p < 0,001$; передчасне розходження сестринських хроматид — у 28,0% (0,43% і 0,0% відповідно, $p < 0,001$); поліплоїдні клітини — у 57% (1,20% і 0,10% відповідно, $p < 0,001$); у одного хворого на ОА реєструвався ізохроматидний обмін (0,02% і 0,0% відповідно, $p > 0,05$). Стосовно причин виникнення парних фрагментів хромосом вважається, що цей вид перебудов, по-перше, може ефективно індукуватися в лімфоцитах периферичної крові хімічними мутагенами, які ушкоджують ДНК на пресинтетичній стадії клітинного циклу, а, по-друге, виникати внаслідок трансформації хроматидних одиночних фрагментів, які утворилися в клітинах-попередників та перейшли у дочірні лімфоцити у ході мітотичних поділів лімфоцитпрекурсорів. При культивуванні зрілих лімфоцитів з успадкованими від клітин-попередників хроматидними фрагментами ці аберації можуть здвоюватися у фазі реплікації ДНК і на стадії мітозу будуть представляти вже парні фрагменти [6]. Також аберації хромосомного типу в групі хворих на ОА були представлені розривами по центромері (0,04% і 0,0% відповідно, $p > 0,05$), кільцевими хромосомами (0,04% і 0,0% відповідно, $p > 0,05$), нерозходженням хромосом (0,02% і 0,0% відповідно, $p > 0,05$), тотальним ушкодженням хромосом (0,02% і 0,0% відповідно, $p > 0,05$), які в групі здорових дітей не спостерігалися взагалі. Загальна частота аберацій хроматидного типу в групі пробандів із ОА складала 0,64%, що вірогідно не відрізнялося від частоти даних ушкоджень у здорових осіб (0,65%, $p > 0,05$). У 39,0% пробандів серед аберацій хроматидного типу виявлялися одиночні фрагменти. У трьох хворих на ОА реєструвалася делеція короткого плеча (0,06% і 0,0% відповідно, $p > 0,05$) та у одного — делеція довгого плеча (0,02% і 0,0% відповідно, $p > 0,05$) хромосом із групи С.

У 79,4% хворих на РА також реєструвалися аберації хромосом. Загальна частота ХА складала $2,44 \pm 0,29\%$, що вірогідно переважало рівень ХА у здорових осіб ($1,60 \pm 0,23\%$, $p < 0,05$). Цитогенетичні аномалії були представлені, як і в попередніх групах обстежених, абераціями хромосомного та хроматидного типів. Рівень аберацій хромосомного типу мав вірогідне підвищення у хворих на РА порівняно зі здоровими особами (1,68% проти 0,85%, $p < 0,01$), тоді як хроматидного типу не розрізнявся в обох групах спостереження (0,77% проти 0,65%, $p > 0,05$). Щодо спектра аберацій хромосомного типу, то у хворих на РА при порівнянні зі здоровими особами визначалося збільшення центромерного індексу (0,21% і 0,0% відповідно, $p < 0,01$) та кількості дицентричних хромосом (0,21% і 0,0% відповідно, $p < 0,01$).

Крім того, аберації хромосомного типу в групі хворих на РА були представлені дуплікацією довгих пліч хромосоми 15 (0,03% і 0,0% відповідно, $p > 0,05$) та розривами по центромері (0,10% і 0,0% відповідно, $p > 0,05$). На відміну від хворих перших двох груп у пробандів із РА поліплоїдні клітини не виявлялися взагалі, але, на нашу думку, це можна пояснити незначною кількістю обстежених хворих.

Аналізуючи типи аберацій хроматидного типу, ми встановили тільки підвищення частоти делецій короткого плеча (0,59% і 0,0% відповідно, $p < 0,001$) хромосом групи C, а одиночні фрагменти рееструвалися майже з однаковою частотою в обох групах порівняння (0,77% при РА і 0,65% у здорових осіб, $p > 0,05$). Цілком вірогідно, що ознаки хромосомної центральної нестабільності (ламкість, міжхромосомні перебудови та передчасне розділення центромер) розглядається як вірогідний ефект генотоксичних впливів. Раніше вважалось, що розриви хромосоми та їхнє возз'єднання виникають випадково за довжиною хромосоми, а їх частота залежить від кількості ДНК у даній хромосомі. В останні роки накопичуються дані про те, що залучення індивідуальних хромосом у цитогенетичні аномалії мають більш складний характер, тобто, така нерівномірність розподілу хромосомних аберацій по індивідуальних хромосомах може обумовлюватися локалізацією протоонкогенів.

Таким чином, проведені дослідження показали, що каріотип у всіх обстежених хворих і здорових дітей відповідав нормальному жіночому 46,XX або чоловічому — 46,XY. Встановлено суттєві відмінності у стані хромосомного апарату у дітей та підлітків із різними МХ порівняно зі здоровими однолітками, які виражалися у підвищеній частоті ХА та збільшенні структурних аномалій хромосом.

Висновки

1. Частота ХА у дітей з різною неінфекційною патологією, народжених від батьків-ліквідаторів аварії на ЧАЕС, складала у 3,61%, що вірогідно перевищувало частоту ХА у здорових дітей (1,60%, $p < 0,05$). Статистичні відмінності встановлено у частоті передчасного розходження хроматид та поліплоїдних клітин.

2. Рівень хромосомних мутацій у хворих на ОА дорівнював 5,59%, що майже у 3,5 рази вище за такий у здорових пробандів (1,60%, $p < 0,001$). Виявлено статистично значущі відмінності у частоті аберацій хромосомного типу (парних фрагментів, передчасного розходження хроматид, поліплоїдів) порівняно зі здоровими особами.

3. У хворих на РА частота ХА складала 2,44%, що вірогідно переважало рівень ХА у здорових осіб (1,60%, $p < 0,05$). Збільшення статистично значущих відмінностей встановлено у частоті аберацій хромосомного (збільшення центромери, кількості дицентричних хромосом) та хроматидного (делеція короткого плеча) типу.

Література

1. Бочков Н.П., Демин Ю.С., Лучник Н.В. Классификация и методы учета хромосомных абераций в соматических клетках // Генетика.— 1972.— Т.8, №5.— С. 133–141.
2. Веккер И.Р., Сетко Н.П., Антоненко Б.Н. Роль факторов окружающей среды в перинатальной патологии (обзор) // Гигиена и санитария.— 2001.— №3.— С. 29–32.
3. Гланц С. Медико-биологическая статистика.— М.: Практика, 1999.— 459 с.

4. *Крыжановский Г.Н.* Дизрегуляционная патология.— М., 2001.— 300 с.
5. *Лильин Е.Т., Богомазов Е.А., Гофман-Кадошников П.Б.* Генетика для врачей.— М.: Медицина, 1990.— 254 с.
6. *Мазник Н.А.* Роль факторов нерадиационной природы в формировании цитогенетических эффектов у эвакуантов из 30-км зоны Чернобыльской АЭС // Цитология и генетика.— 2004.— №6.— С. 33–44.
7. *Фролов А.К., Арцимович Н.Г., Сохин А.А.* Иммуноцитогенетика.— М.: Медицина, 1993.— 240 с.
8. *Kaplan M.I., Limoli C.L., Morgan W.F.* Perpetuating radiation-induced chromosomal instability // *Radiat. Oncol. Invest.*— 1997.— Vol.5.— P. 124–128.
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.

Резюме

Проведено цитогенетическое исследование у детей и подростков с хроническими неинфекционными заболеваниями. Установлен высокий уровень хромосомных аберраций у пробандов в сравнении со здоровыми лицами (в 1,5–3,5 раза). Во всех группах больных частота аберраций хромосомного типа была достоверно повышенной.

Проведено цитогенетичне дослідження у дітей та підлітків із хронічними неінфекційними хворобами. Встановлено високий рівень хромосомних аберрацій у пробандів порівняно зі здоровими особами (у 1,5–3,5 рази). У всіх групах хворих частота аберрацій хромосомного типу була вірогідно підвищеною.

A cytogenetic study was performed in children and adolescents with chronic non-infectious diseases. A high level of chromosomal aberrations was established in probands in comparison with healthy persons (1,5–3,5 times above normal). In all groups of patients the incidence of aberrations of chromosomal type was increased significantly.

БОЛТИНА І.В.

*Институт екологіїни і токсикології ім. Л. І. Медведя МОЗ України,
Україна, 03680 Київ, вул. Героїв оборони 6 e-mail: irina_boltina@i.ua*

ВИКОРИСТАННЯ ПОКАЗНИКІВ ТРИВОЖНОСТІ ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ ЦИТОГЕНЕТИЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

Тривожність розглядають як негативний стан, пов'язуючи її зі стресовими переживаннями. У ряді робіт [2, 4, 5, 9, 11] розкривається зв'язок тривожності з особливостями нервової системи, з енергетикою організму, активністю біологічно активних точок шкіри, розвитком психоветегативних і соматичних захворювань.

Стандартизовані опитувальники тривожності Спілбергера, які були застосовані в роботі, вимірюють тривожність як властивість особистості та як емоційний стан, що дозволяє оцінити загальний рівень соціальної (особис-

тісної) та ситуативної (соматичної) тривожності [10]. Ранжування досліджених станів, проведені С.В. Биковим [3], показують більш високу діагностичність складових соціальної (особистісної) тривожності на відміну від психосоматичної (ситуативної) тривожності. Як вважають С.Ю. Алашеев та С.В. Биков [1], показники особистісної тривожності корелюють з різними демографічними та соціальними характеристиками опитуваних: статтю, рівнем доходів, стажем та ін. Якщо ця теза вірна, то показники тривожності здорових та хворих осіб повинні розрізнятися. Була виказана думка [11], що в ідеалі (у здорових осіб) ситуативна і особистісна тривожність мають знаходитись на одному рівні.

Але питання щодо особливостей залежності психологічних показників від цитогенетичних потребує більш детального дослідження, що і стало метою даної роботи.

Обстежувані та методи

Обстежено 200 мешканців Києва віком від 20 до 70 років, яких було розподілено на 5 підгруп (20–30, 31–40, 41–50, 51–60 та 61–70 років). За допомогою анкетування (шкала тривожності Спілбергера) оцінювали ступінь ситуативної та особистісної тривожності. Цитогенетичні показники (частота аберацій, кількість анеуплоїдних та мультиаберантних клітин) визначали в лімфоцитах периферичної крові. Культивування лімфоцитів та приготування препаратів хромосом виконували за стандартним напівмікрометодом з модифікаціями, що прийняті в лабораторії мутагенезу. Відбір метафазних пластинок для цитогенетичного аналізу, класифікація та метод обліку аберацій хромосом були загальноприйнятими. Мультиаберантними клітинами вважали такі, які мали 3 і більше аберацій. Анеуплоїдні клітини розподіляли на гіпоплоїдні, які мали від 24 до 44 хромосом, та гіперплоїдні, які мали більше 46 хромосом. Проводили аналіз зашифрованих препаратів, пофарбованих рутинним методом. Від кожного індивідууму аналізували не менше 200 метафаз. Статистичну обробку проводили згідно з *t*-критерієм Стьюдента — загальноприйнятою методикою.

Результати та обговорення

Аналізуючи праці деяких авторів [8, 11] стосовно діапазонів тривожності здорових осіб та осіб на соматичну патологію, відмічено, що ці показники знаходяться на різних рівнях. Можливо, це пов'язано з неоднорідністю вибірок. Отже, загальна ситуативна тривожність здорових осіб (згідно даних різних авторів) знаходиться в діапазоні від 28,40 до 39,00 балів, а у хворих осіб на соматичну патологію (без онкопатології) — 39,30–65,70 балів. Загальна особистісна тривожність здорових осіб — в межах 26,80–46,20 балів, у хворих на соматичну патологію — 41,00–71,20.

В проведених дослідженнях ситуативна тривожність знаходиться в межах 26,0–28,8 балів, особистісна — від 46,9 до 52,2 балів.

Ф.І. Інґелем та Ю.О. Рєвазовою [4, 5, 7] авторами серії статей про генетико-психологічні дослідження доведено, що психологічні показники корелюють із цитогенетичними та забрудненням навколишнього середовища. Під час проведення наших досліджень були співставленні цитогенетичні

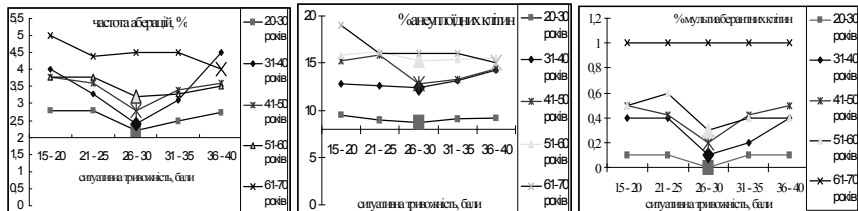
показники і бали особистісної та ситуативної тривожності. Залежностей між цитогенетичними показниками і балами особистісної тривожності не було виявлено. Я вважаю, що це обумовлено тим фактом, що особистісна тривожність є доволі стійкою характеристикою, виявляючись, перш за все як диспозиція, установка, індивідуальна властивість особи, яка не стільки залежить від характеристик несприятливих, стресових ситуацій, скільки від особливостей сприйняття і мотиваційно-емоційній сфері індивідуальної особи.

А от ситуативна тривожність виникає у будь-якої людини напередодні можливих неприємностей і життєвих ускладнень. Цей стан не лише є цілком нормальним але і грає свою позитивну роль. Він виступає своєрідним мобілізуючим механізмом, що дозволяє людині серйозно і відповідально підійти до вирішення виникаючих проблем. Ненормальним є зниження ситуативної тривожності коли людина серед серйозних обставин демонструє безладність і безвідповідальність, що найчастіше свідчить про інфантильну життєву позицію та недостатньо сформовану самосвідомість. Вважається, що ситуативна (або соматична) тривожність є показником здоров'я людини на даний момент. Ця тривожність коригується багатьма засобами, як медикаментозними, так і психологічними.

Але перед тим, як почати описувати отримані результати слід з'ясувати поняття "норми". Згідно медичного словника: "норма — у раді наук про живі організми, у тому числі про людину (медицина, біологія, а також соціологія та ін.) — точка відліку, еталон, стандарт — для порівняння з іншими варіантами стану живого об'єкту (об'єктів) (які можуть розглядатися, як варіація, патологія)". Згідно думки А.В. Попова [6]: "норма (здоров'я) є оптимумом біологічної системи, тобто інтервал її оптимального функціонування. Іншими словами, нормально для людини те, що є для неї оптимально. Пошуки норми часто важливіші, ніж виявлення патології, і якщо розуміння виниклих порушень є помилковим, суб'єктивним воно супроводжується терапевтичними невдачами".

Отже, ми шукаємо оптимальний інтервал, якій відповідає еталонним показникам як цитогенетичним, так і психологічним. Якщо згадати, що, згідно огляду літератури немає чітко визначених показників ситуативної тривожності, які є оптимальними для людини, а "норми" цитогенетичних показників чітко виявлені, то відправною точкою будуть слугуватиме саме вони.

Таким чином, "нормою" для частоти аберацій, анеуплоїдних та мультиаберантних клітин будуть найнижчі показники у вікових групах. Це показано на малюнках, на яких значимі показники відмічені збільшеними позначками.



У вікових групах від 20 до 60 років отримані дані мають однакову картину. Є відрізок, який вираховували по цитогенетичним показникам “норми”, тобто брались до уваги найнижчі відсотки частоти аберацій хромосом, кількості анеуплоїдних та мультиабераційних клітин і найвищі надспонтанні рівні. Цим показником “відповідали” бали ситуативної тривожності від 26 до 30. Тобто, ситуативні тривожність від 15 до 26 балів буде вважатись низькою, а від 31 балу — високою. Користуючись даними співставлення цитогенетичних та психологічних показників можна проводити скринінгові психолого-генетичні дослідження: масово визначати ситуативну тривожність, а потім — формувати групи ризику для подальших цитогенетичних досліджень.

У віковій групі 61–70 років картина дещо інакша. По-перше, найнижча частота аберацій хромосом, яка має бути менше 3,0%, у цій віковій групі складає 4,0%. Частота мультиабераційних клітин однакова для всіх балів тривожності. Найнижча частота анеуплоїдних клітин та найвищий показник надспонтанних рівнів відповідають (як і найнижча частота аберацій хромосом) 35–42 балам тривожності. Можливо, це пов’язано із віковими змінами у організмі. Є думка, що із віком тривожність підвищується, правда, чітких доказів цього факту в літературі немає.

Висновки

Обстеживши 200 мешканців Києва, можна зробити висновки, що у вікових групах від 20 до 60 років співвідношення цитогенетичних показників та балів ситуативної тривожності мають вигляд параболи, де “норми” цитогенетичних показників відповідають бали ситуативної тривожності від 26 до 30. У осіб від 61 до 70 років, ця картина змінюється. Крім того, під час досліджень на “перший план” по значимості вийшов цитогенетичний показник — кількість анеуплоїдних клітин, який варто більш широко використовувати в популяційних дослідженнях.

Включення оцінки рівня тривожності у людини в систему генетичних обстежень має прогностичну цінність — вона дозволяє з достатньо високою надійністю виявити контингент, для якого небезпечні додаткові генотоксичної дії. На першому етапі слід провести достатньо широкомасштабне психологічне тестування людей з метою формування 2 підгруп обстежуваних: осіб, що знаходяться в стані психологічного комфорту та осіб, що знаходяться в стані психологічного стресу.

Подібну процедуру слід проводити для кожної передбачуваної групи порівняння, а потім в кожній із сформованих підгруп проводити подальші цитогенетичні дослідження.

Аналіз даних, отриманих з використанням такої схеми, дозволяє:

- оцінити середньопопуляційні рівні генетичних ефектів, вільні від впливу соціо-психологічних чинників;
- проводити коректне порівняння показників генетичного здоров’я різних контингентів і/або жителів територій з різними рівнями генотоксичної дії;
- розробляти адекватну стратегію при ухваленні адміністративних рішень з метою вибору територій і/або контингентів, що в першу чергу потребують проведення відновних або профілактичних заходів;

— коректно формувати групи підвищеного генетичного ризику, тобто виявляти людей, для яких найбільш небезпечні генотоксичні навантаження, і хто в першу чергу потребує диспансерного спостереження в медико-генетичних консультаціях, онкологічних диспансерах та/або в проведенні профілактичних заходів.

Даний похід може бути включений в систему порівняльної оцінки генетичного здоров'я населення різних регіонів в рамках проведення соціально-гігієнічного моніторингу і використаний для ухвалення адміністративних рішень і проведення медико-профілактичних заходів.

Література

1. *Алашеев С.Ю., Быков С.В.* Состояния тревожности у педагогов // Социол. журн.— 1999.— №3–4.— С. 2–5.
2. *Астапов В.М., Микадзе Ю.В.* Психодиагностика и коррекция детей с нарушениями и отклонениями развития: Хрестоматия.— СПб.: Питер, 2001.— 365 с.
3. *Быков С.В.* Образование и здоровье (по материалам исследования выпускников школ г. Тольятти) // Социол. исследования.— 2000.— №1.— С. 125–129.
4. *Ингель Ф.И., Ревазова Ю.А.* Модификация эмоциональным стрессом мутагенных эффектов ксенобиотиков у животных и человека // Исследования по генетике: Вып.12.— СПб.: Изд-во СПб. ун-та, 1999.— С. 86–103.
5. *Ингель Ф.И., Прихожан А.М., Цуцман Т.Е., Ревазова Ю.А.* Оценка глубины стресса и ее использование при проведении генетико-токсикологических исследований на людях // Вестник РАМН.— 1997.— №7.— С. 24–28.
6. *Попов А.В.* Проблема терминологии в современной гомеопатии // <http://www.homeopat-ua.org/pr07.php>
7. *Ревазова Ю.А., Ингель Ф.И., Цуцман Т.Е.* и др. Опыт проведения генетического мониторинга загрязнения окружающей среды и генетического здоровья населения. // Вестник РАМН.— 1997.— №2.— С. 18–24.
8. *Сарвир И.Н.* Сравнительные данные экспериментально-психологического исследования личности больных гипертонической болезнью и ишемической болезнью сердца с анксиозными состояниями // Медицинские исследования.— 2001.— Т.1, вып.1.— С. 41–43.
9. *Уразаева Ф.Х.* Психофизиологический мониторинг регионов с повышенным содержанием химических веществ в воде: Автореф. дис. д-ра психол. наук.— Уфа, 2002.— 42 с.
10. *Хекхаузен Х.* Мотивация и деятельность: Пер. с нем.— В 2-х т.— М.: Педагогика, 1986.— 341 с.
11. *Шербатых Ю.В.* Психология стресса и методы коррекции.— СПб.: Питер, 2008.— 256 с.

Резюме

Проанализированы данные о связи ситуативной тревожности с возникновением заболеваний и генетическими аспектами. Показана возможность использования оценки психологического статуса для формирования групп риска для дальнейших цитогенетических исследований.

Проаналізовані дані про зв'язок ситуативної тривожності з виникненням захворювань та генетичними аспектами. Показана можливість використання оцінки

психологічного статусу для формування груп ризику для подальших цитогенетичних досліджень.

In the article information of review of literature is resulted on questions of situation anxiety, their connection with the origin of diseases, genetic aspects. Possibility of the use of estimation of psychological status is shown for forming of risk groups for further cytogenetics researches.

ГЕНИК-БЕРЕЗОВСЬКА С.О.

*ДУ "Інститут спадкової патології АМН України",
Україна, 79000, м.Львів, вул. Лисенка, 31а, e-mail: berezovska.s@gmail.com*

ДОСЛІДЖЕННЯ СТАНУ РЕПРОДУКЦІЙНОЇ ФУНКЦІЇ У ЖІНОК ГРУПИ РИЗИКУ ЩОДО ВРОДЖЕНИХ ВАД РОЗВИТКУ ЗА ДАНИМИ РЕЄСТРУ МОДЕЛЬНИХ ВВР ТА У ЖІНОК ІЗ СІМЕЙ ЛІКВІДАТОРІВ АВАРІЇ НА ЧАЕС НА МОДЕЛІ ПОПУЛЯЦІЇ ЛЬВІВСЬКОЇ ОБЛАСТІ

Складна екологічна ситуація, яка склалася в Україні після аварії на ЧАЕС спонукає до вивчення стану репродуктивного здоров'я жінок, які зазнали впливу іонізуючого опромінення внаслідок аварії. Відомо, що іонізуюча радіація є причиною непліддя, невиношування вагітності, зниження компенсаторно-адаптаційних механізмів у матерів і фетоплацентарних порушень, що спричинює довготермінові або хронічні хвороби новонароджених, виникнення вроджених вад розвитку (ВВР) та скорочення тривалості життя [1, 2]. Одним із найважливіших шляхів покращення демографічної ситуації у післячорнобильський період в Україні є зниження рівня малокової та дитячої смертності, в структурі причин якої вроджені вади розвитку (ВВР) складають до 37%. Основні завдання генетичного моніторингу можна поділити на три групи: вивчення епідеміології вроджених вад розвитку, оцінка ефективності застосування профілактичних програм на популяційному рівні, а також виявлення і контроль нових тератогенних факторів середовища [3]. 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. В умовах радіаційного і хімічного забруднення довкілля, поєднана дія цих факторів на організм людини може бути більш виражена у порівнянні з ізольованою дією кожного фактора [4, 5, 6]. Однією із найважливіших проблем прийдешніх років, на які потрібно буде звернути увагу є проведення серйозних наукових досліджень репродуктивного здоров'я жінок, які зазнали впливу іонізуючого опромінення внаслідок аварії, а також рівня вроджених вад розвитку серед новонароджених у регіонах з вираженим техногенним навантаженням та у відносно екологічно сприятливих областях [7].

Матеріали і методи

Шляхом проспективного та ретроспективного аналізу медичної документації пологових установ Львівської області проведено аналіз факторів ризику виникнення ВВР серед новонароджених та репродуктивного здоров'я матерів методом “випадок — контроль” за 2002–2009 роки. За даний період заповнено 481 карт на дітей із вродженими вадами розвитку та 479 карт на здорових дітей.

Отримані дані стандартизовані згідно Міжнародної статистичної класифікації хвороб та споріднених проблем охорони здоров'я десятого перегляду (МКХ — 10) та оброблено методами варіаційної статистики за допомогою пакету програм “Statistica 5” та Microsoft Excel-2000: визначали середнє арифметичне значення (M), відхилення від середнього арифметичного значення (m), співвідношення шансів (odds ratio — OR), довірчий інтервал співвідношення шансів (Exp), P — величина статистичної значимості.

Результати та обговорення

В групі ризику щодо вроджених вад розвитку (досліджувана група) перша вагітність закінчилася артифіціальним абортom у 6,1% випадків, в контрольній групі — в 3,0% випадків. Загалом в досліджуваній групі артифіціальних абортів було у 11,2% випадків, в контрольній — 8,5% (P>0,05). Самовільним викиднем закінчилося 42 вагітності в досліджуваній групі, з них 38 — викидні першого триместру, що становить 7,9% випадків, в контрольній групі самовільний викидень був у 39-ти випадках, з них в першому триместрі — у 33-х випадках — 6,8% (P>0,05).

Серед матерів групи ВВР померлі діти були у 13-ти випадках, що складає 2,7%, в контрольній групі — у 7-ми випадках, що становить 1,4%. Мертвонародження спостерігалися у 15-ти випадках (3,1%) досліджуваної групи та в 2-ох випадках (0,41%) контрольної групи (P<0,05). Під час вагітності анемія була у 43,4% випадків досліджуваної групи та 41,5% — контрольної групи (P>0,05). Ризик народження дитини (odds ratio — OR) з ВВР при анемії у матері складає 1,0 при довірчому інтервалі (0,32; 2,54) (табл. 1).

Гестоз першої половини вагітності у матерів був у 32,7% випадків досліджуваної групи та 31,3% — контрольної групи (P>0,05). Ризик народження дитини (OR) із ВВР при гестозі першої половини вагітності становить 1,1 при довірчому інтервалі (0,43; 2,55) (табл. 2).

Гестоз другої половини вагітності у матерів був у 34,5% випадків досліджуваної групи та 32,4% — контрольної групи (P>0,05). Ризик народження дитини (OR) із ВВР при гестозі другої половини вагітності становить 1,0 при довірчому інтервалі (0,56; 2,62) (табл.3). Не виявлено статистично значимої різниці щодо відсотку артифіціальних абортів (11,2%), самовільних викиднів (7,9%), померлих дітей (2,7%) у матерів досліджуваної групи (P>0,05) в порівнянні з контрольною (8,5%, 6,8% та 1,4% відповідно). Порівнюючи особливості перебігу вагітності, не виявлено статистично значимої різниці щодо анемії, гестозу першої та другої половини вагітності у жінок групи ВВР в порівнянні з контрольною (P>0,05).

Таблиця 1

Порівняння питомої ваги анемії протягом вагітності матерів дітей з ВВР та контрольної групи

Анемія	Випадки ВВР		Контрольна група		Співвідношення шансів, (OR)	P
	Кількість, (n)	Питома вага, %	Кількість, (n)	Питома вага, %		
Присутні	209	43,4	199	41,5	1,0	>0,05
Відсутні	224	46,6	227	47,4		
Невідомо	48	10,0	53	11,1		

Таблиця 2

Порівняння питомої ваги гестозу першої половини вагітності матерів дітей з ВВР та контрольної групи

Гестоз першої половини вагітності	Випадки ВВР		Контрольна група		Співвідношення шансів, (OR)	P
	Кількість, (n)	Питома вага, %	Кількість, (n)	Питома вага, %		
Присутні	157	32,7	150	31,3	1,1	>5
Відсутні	271	56,3	293	61,2		
Невідомо	53	11,0	36	7,5		

Таблиця 3

Порівняння питомої ваги гестозу другої половини вагітності матерів дітей з ВВР та контрольної групи

Гестоз другої половини вагітності	Випадки ВВР		Контрольна група		Співвідношення шансів, (OR)	P
	Кількість, (n)	Питома вага, %	Кількість, (n)	Питома вага, %		
Присутні	166	34,5	155	32,4	1,1	>0,05
Відсутні	255	53,0	259	54,0		
Невідомо	60	12,5	65	13,6		

Окремо проводився аналіз даних щодо 134 сімей ліквідаторів та евакуйованих після катастрофи на ЧАЕС, що в даний час проживають у м. Львові з метою оцінки додаткового генетичного ризику мутагенного впливу радіації для сімей учасників ліквідації наслідків аварії на ЧАЕС та евакуйованих в екологічно сприятливий регіон. Завданням роботи було порівняти репродуктивні характеристики та поширеність вроджених вад розвитку (ВВР) серед новонароджених із 134 сімей після переселення із радіоактивно забрудненого регіону до і після мутагенного навантаження.

Проводився аналіз наступних генетико-репродуктивних характеристик:

— поширеність репродуктивних втрат в обох групах визначалась за коефіцієнтом репродуктивних втрат — співвідношення кількості самовіль-

них 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.

У сім'ях ліквідаторів та евакуйованих обстежено дітей із контрольної групи, які були народжені до 26 квітня 1986 року та дітей із тест-групи, народжених 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.

Вроджені вади розвитку в контрольній групі були виявлені в 5-ти випадках, а саме: один випадок вродженої вади аортального клапану, одна вроджена пупкова кіла, 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 слюзової 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 (табл. 4).

Таблиця 4

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.

Висновки

Проведене дослідження репродукційної функції жінок групи ризику щодо вроджених вад розвитку виявило статистично значиму різницю ($P < 0,05$) щодо відсотку мертвонароджень (3,1%) у матерів, які народили дитину з вродженою вадою розвитку порівняно із жінками контрольної групи (0,41%) відповідно. Не зафіксовано статистично вірогідного збільшення кількості репродуктивних втрат у жінок із сімей ліквідаторів, проте виявлено статистично вірогідне збільшення рівня вроджених вад розвитку серед новонароджених із цих сімей після впливу низькодозового радіаційного опромінення. Дані дослідження необхідно продовжувати для з'ясування чи негативні зрушення в репродуктивному здоров'ї досліджуваних сімей будуть виражені у майбутньому та у зв'язку із необхідністю подальшого моніторингу вроджених вад розвитку серед новонароджених з метою оцінки та попередження факторів ризику виникнення ВВР у світлі покращання демографічної ситуації після Чорнобильської катастрофи.

Література

1. Radiation exposure to the population of Europe following the Chernobyl accident. Drozdovitch V., Bouville A., Chobanova N., Filistovic V., Ilus T., Kovacic M., Malatova I., Moser M., Nedveckaite T., Volkle H., Cardis E.. *Radiat Prot Dosimetry*.— 2007; 123(4): 515–28.
2. Female reproductive function in areas affected by radiation after the Chernobyl power station accident V.I. Kulakov, T.N. Sokur, A.I. Volobuev et al *Environ Health Perspect*.— 1993 July; 101(Suppl 2): 117–123.
3. Демикова Н.С. Мониторинг врожденных пороков развития и его значение в изучении их эпидемиологии // *Российский вестник перинатологии и педиатрии*.— 2003.— №4.— С. 13–17.
4. Неумержицька Л.В., Баріляк І.Р., Шкарупа В.М. та ін. 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.
5. Вертелецький В.Є., Баріляк І.Р., Афанасьєва Н.О. та ін. 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.

6. Бариляк І.Р., Шапошнікова В.М., Неумержицька Л.В. та ін. Екологічні аспекти міжрегіональних відмінностей частоти вроджених вад розвитку в Черкаській області.— Збірник наукових праць “Проблеми екологічної та медичної генетики і клінічної імунології”.— Вип.5.— 2009.— Ст. 22–27.

7. Materials of International Symposium on Chernobyl Health Effects, November 9–10, 2009, Minsk.

Резюме

Проведено дослідження стану репродукційної функції у жінок з групи ризику щодо народження дітей із ВВР та аналогічне дослідження у сім'ях ліквідаторів аварії на ЧАЕС. Виявлено статистично значиму різницю ($P < 0,05$) щодо відсотку мертворождення у матерів, які народили дитину з вродженою вадою розвитку порівняно із жінками контрольної групи, проте не зафіксовано статистично вірогідного збільшення кількості репродуктивних втраг у жінок із сімей ліквідаторів.

Проведено исследование состояния репродукционной системы у женщин из группы риска рождения детей с ВПР и аналогичное исследование в семьях ликвидаторов аварии на ЧАЭС. Выявлено статистически значимое различие ($P < 0,05$) по мертворождениям у матерей, родивших детей с ВПР относительно женщин контрольной группы, но не зафиксировано статистически значимого увеличения количества репродуктивных потерь у женщин из семей ликвидаторов.

The reproductive system study of women from congenital malformation risk group and from liquidators families was complete. The statistically significant increase in stillborn in congenital malformation risk group was revealed, but no increase in reproductive losses among women from liquidators families was detected.

ГУЛЬКО Т.П.¹, ДЕРЯБИНА Е.Г.², РЫМАР С.Е.¹, РУБАН Т.А.¹, СУХОРАДА Е.М.¹, МАСЛОВА О.А.², ЛИХАЧЕВА Л.И.¹, ДАХОВНИК А.В.¹, КОРДЮМ В.А.¹

¹Інститут молекулярної біології та генетики НАН України
Україна 03680, м. Київ, ул. Заболотного, 150

²Інститут генетическої та регенеративної медицини НАМН України
Україна 04114, м. Київ, ул. Вышгородская, 67

ИЗУЧЕНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ РАЗВИТИЯ МЫШИНЫХ БЛАСТОЦИСТ ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ

Эмбриональные стволовые клетки (ЕС-клетки) представляют больший интерес как в плане фундаментальных исследований, так и возможного клинического применения. Обусловлено такое внимание прежде всего их уникальными свойствами — неограниченной пролиферацией и плюрипотентностью (способность клеток дифференцироваться в производные всех трех зародышевых листков и в линию половых клеток) [1]. Удобными моделями для изучения ЕС клеток человека являются ЕС-клетки, изолированные из внутренней клеточной массы (ВКМ) бластоцисты млекопитающих [2].

Культивирование бластоцист является важным этапом при получении эмбриональных стволовых клеток млекопитающих, которое зависит от состояния клеток ВКМ, а именно от сохранения ими плюрипотентности и способности к размножению. Использование определенных животных связано с адекватностью при оценке того или иного процесса. Мышиные ES-клетки могут быть альтернативным модельным объектом для изучения многих вопросов в области молекулярной биологии, трансплантологии, регенеративной медицины и создания биотехнологий с использованием методов трансгеноза [3, 4, 5, 6]. Многими авторами показано сохранение эмбриональными клетками мышцы, изолированными из ВКМ бластоцисты, плюрипотентных свойств в условиях *in vitro* [4, 5].

Целью работы было изучение особенностей поведения мышинных преимплантационных зародышей на стадии бластоцисты при длительном культивировании и их характеристика.

Задачами работы было: стандартизация метода получения зародышей на стадии 3,5-дневной беременности у исследуемой линии мышей; наблюдение за изменением мышинных бластоцист в условиях длительного культивирования; выделение мышинных ES-клеток из ВКМ и идентификация их стволового состояния.

Материалы и методы

В опытах использовались половозрелые мыши линии ICR, которые являются потомством аутбредной популяции, полученной в Институте изучения рака, США (Institute Cancer Research) и длительно поддерживаемой путем инбредного размножения в виварии ИМБиГ НАН Украины. Животные этой линии характеризуются высокой плодовитостью, большой степенью жизнеспособности и выживаемости потомства. Для суперовуляции яйцеклеток у самок использовали гормоны фолликулостимулирующий — Фоллигон и хориональный гонадотропин — Хорулон. Отбор преимплантационных зародышей осуществляли под лупой МБС-10. Манипуляции с бластоцистами проводили с помощью микроманипулятора. Культивировали бластоцисты в среде DMEM с 15% фетальной телячьей сыворотки на слое первичных мышинных фибробластов, инактивированных митомицином С (MIF). Для поддержания плюрипотентного статуса ES-клеток в культуральную среду добавляли LIF (leukemia inhibitor factor), 1000 ЕД/мл. Гистохимическим окрашиванием по Гомори (рис. 10) выявляли экспрессию щелочной фосфатазы, маркера стволовости ES-клеток как на уровне клеток ВКМ бластоцисты, так и при их длительном культивировании.

Результаты и обсуждение

В качестве объектов исследования были использованы мышинные преимплантационные зародыши, полученные на стадии 3,5 суток гестации. Разные линии мышей отличаются как генетическими, так и физиологическими параметрами. Необходимость получения определенных стадий зародышей требует четких знаний временных параметров развития мышевидных грызунов [2, 3]. В связи с этим была проведена оптимизация условий получения

преимплантационных зародышей на стадии бластоцисты для использованной в данной работе линии мышей ICR. Животных тщательно подбирали по возрасту (1,5–2,0 мес.) и весу (18–20 г). Использование метода суперовуляции яйцеклеток с помощью гормонов Фолигона и Хориона давало возможность получать до 35 зародышей, по сравнению с 15 при естественном покрытии самок [3]. Дозу гормонов для самок исследуемой линии подбирали экспериментально, оптимальным оказалось введение 6–7 МЕ препарата на мышь.

Культивирование бластоцист является важным этапом дальнейшего развития преимплантационных зародышей вне организма матери, при котором идет увеличение числа клеток ВКМ с сохранением их плюрипотентности [4]. Отобранные визуально по морфологическим признакам, соответствующим этой стадии развития, зародыши вводили в культуру. Жизнеспособность бластоцист оценивали по наличию блестящей *Z. Pellucida*, способности продолжать дальнейшее развитие *in vitro* и по появлению полноценного и жизнеспособного потомства в результате пересадки культивируемых зародышей реципиентам (данный метод является наиболее надежным) [2].

В процессе культивирования наблюдали за особенностями развития бластоцист, введенных в культуру как с *Z. Pellucida*, так и без нее. Бластоцисты от *Z. Pellucida* освобождали либо ферментативным методом с помощью проназы, либо с помощью микроманипулятора (рис. 1–3).

При культивировании бластоцист были отмечены особенности их поведения, которое зависело, прежде всего, от состояния внутренней клеточной массы. На первых этапах зародыши вели себя идентично, независимо от способа снятия оболочки. Постепенно возникающие субпопуляции, представляющие собой потомство недифференцированных клеток ВКМ, были

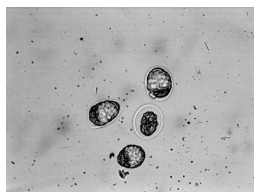


Рис.1

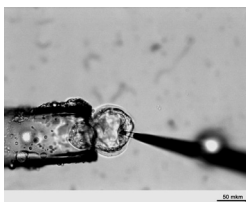


Рис.2

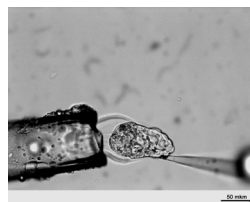


Рис.3



Рис. 4

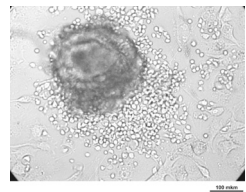


Рис. 5

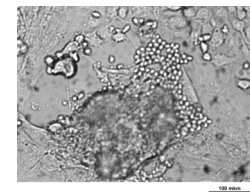


Рис. 6

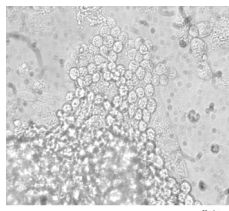


Рис. 7

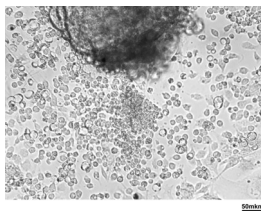


Рис. 8

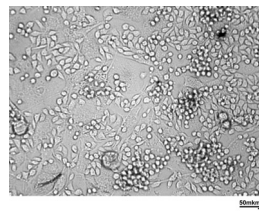
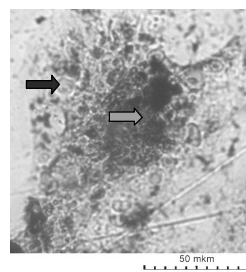
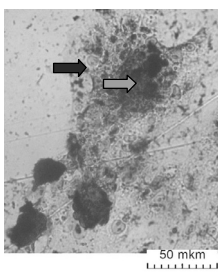
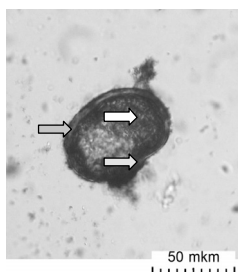


Рис. 9



Клетки ВКМ:

⇨ Клетки трофобласта.

⇨ Блестящая оболочка.

⇨ Клетки ВКМ обладают высокой активностью щелочной фосфатазы.

⇨ Краевые дифференцированные клетки имеют пониженную активность щелочной фосфатазы.

Рис. 10. Развитие бластоцисты в культуре (окрашивание по Гомори)

окружены клетками трофобласта (рис. 4). В процессе своего дальнейшего развития в культуре (5–6 сутки) бластоцисты видоизменялись. Одни представляли собой скопления клеток с четкой внешней границей, окруженные выселяющимися клетками энтодермы (рис. 5).

Через две недели у бластоцист центральное скопление не имело четко выраженных границ с интенсивным выселением энтодермальных клеток (рис. 6–7). На 17 сутки культивирования в центральном скоплении помимо плотных кластеров мелких клеток ВКМ хорошо идентифицировались группы клеток, имеющих строение, сходное с эпителиальными клетками различного типа (рис. 8).

Полученные клоны ES-клеток были перенесены с фидера в бессывороточную среду, дополненную LIF, который позволяет поддерживать культивируемые клетки в недифференцированном состоянии. Культуральную среду обновляли регулярно. Рост ES-клеток в культуре наблюдался в виде клонов (рис. 9). В каждом клоне присутствовали две популяции незрелых клеток с разным механизмом пролиферации. В центре клона пролиферировали самообновляющиеся клетки с однородным фенотипом и, вероятно,

максимальной плюрипотентностью. На периферии клона некоммитированные прогениторные слои вступали в цикл созревания, который сопровождался уменьшением потенциальности клеток. Одиночные клетки, покидая клон, неизбежно дифференцировались.

По-видимому, только в клоне сохраняется микроокружение, позволяющее стволовым клеткам удерживать необычно высокую генетическую потенциальность. Полученные нами результаты и высказанные предложения согласуются с описанными в литературе [8, 9].

Высокая активность щелочной фосфатазы ранних эмбриональных клеток, по мнению многих авторов может рассматриваться как биохимический маркер плюрипотентности стволовых клеток [7, 10]. В связи с этим, для изучения состояния полученных клеток, было проведено гистохимическое окрашивание на выявление щелочной фосфатазы. Методом гистохимического окрашивания по Гомори выявили равномерное окрашивание ВКМ как в бластоцисте, так и при ее длительном культивировании, что указывает на сохранение стволовости клеток.

Активность фермента щелочной фосфатазы падала по мере дифференцировки краевых ES-клеток, о чем можно было судить по снижению интенсивности окрашивания. Длительное культивирование ES-клеток требует соблюдения подбора условий для поддержания их недифференцированного состояния. Представленные результаты гистохимического окрашивания ES-клеток дают основание утверждать, что данный метод может служить одним из доступных наглядным тестом стволовости ES-клеток *in vitro*.

Литература

1. Никольский Н.Н., Габай И.А., Сомова Н.В. Эмбриональные стволовые клетки человека. Проблемы и перспективы // Цитология.— 2007.— Т.49, №7.— С. 529–537.
2. Hogan B., Constantini F. Manipulation the mouse embryo // N.Y. Cold Spring Harbor Lab. Cold Spring Harbor.— 1986.— P. 279.
3. Дыбан А.П. Раннее развитие млекопитающих // Л.: Наука.— 1988.— 234 с.
4. Evans M.J., Kaufman M.H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos // Nature.— 1981.—292.— P. 154–156.
5. Brook F.A., Gardner R.L. The origin and efficient derivation of embryonic stem cells in the mouse // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1997.— Vol.94.— P.5709–5712.
6. Robertson E., Bradley A. Production of permanent cell lines from early embryos and their use in studying developmental problems // Experimental approaches to mammalian embryonic development // Cambridge: Cambridge University Press.— 1986.— P. 108–112.
7. Лонда З., Госсрай П., Шиблер Т. Гистохимия ферментов. Лабораторные методы // М.: Мир.— 1982.— 278 с.
8. Wobus A.M., Holshausen H. Characterization of pluripotent stem cell line derived from mouse embryo // Exp. Cell.— 1984.— Vol.152.— P. 212–219.
9. Nagy A., Rossant J. Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells // PNAS —1993.— Vol.9.— P. 8424–8428.
10. Stojkovic M., Loko M., Stojkovich P., Stevart R., Evans J. Derivation of human embryonic stem cells from day-8 blastocysts recaptured after three step *in vitro* culture // Stem Cells.— 2004.— 22.— P. 790–797.

Резюме

В работе представлены результаты изучения поведения мышиных бластоцист при длительном культивировании в определенных условиях на слое митомидин С инактивированных мышиных фибробластов (MIF). Для поддержания плюрипотентного состояния ES-клеток в культуре в среду, добавляли LIF (лейкемия ингибирующий фактор). Цитохимическим окрашиванием по Гомори выявлена высокая активность щелочной фосфатазы в мышиных ES-клетках.

В роботі представлені результати вивчення поведінки бластоцисти миші при довготривалому культивуванні у визначених умовах на шарі інактивованих митомидином С фібробластів миші (MIF). Для підтримання плюрипотентного стану ES-клітин в середовище додавали LIF (лейкемія інгубуючий фактор). Цитохімічним забарвленням за Гоморі виявлена висока активність лужної фосфативи у ES-клітинах миші.

Results of the mouse blastocyst behaviour study during their long-time cultivation under definite conditions on the layer of mytomicin C — inactivated mouse fibroblasts (MIF) are presented in the article. To support pluripotent state of ES cells in culture, LIF (leukemia ingibitor factor) has been added to the medium. High alkaline phosphatase activity has been revealed in mouse ES cells by cytochemical Homori staining.

ДИБКОВ М.В., МАЛЮТА С.С., ТЕЛЕГЕСЬВ Г.Д.

*Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,
вул. акад. Заболотного, 150, м. Київ, 03680, Україна
e-mail: m.v.dybkov@imb.org.ua*

ВИЯВЛЕННЯ МУТАЦІЇ V617F В ГЕНІ *jak2* ХВОРИХ НА ХРОНІЧНІ МІЄЛОПРОЛІФЕРАТИВНІ НЕОПЛАЗМИ ЗА ДОПОМОГОЮ T-ARMS ПЛР

Однією з головних відмінностей нової, четвертої ревізії класифікації та діагностичних критеріїв ВОЗ є використання при постановці діагнозів генетичних маркерів. Зокрема, згідно цього документу генетичні маркери мають використовуватись і при діагностиці мієлопроліферативних неоплазм [1] — гетерогенної групи неопластичних захворювань, які характеризуються множинною гіперплазією гемопоетичних клітин кісткового мозку. Згідно останньої ревізії до мієлопроліферативних неоплазм відносять: хронічну мієлоїдну лейкемію (ХМЛ), хронічну нейтрофільну лейкемію, справжню поліцитемію, ідіопатичний мієлофіброз, есенціальну тромбо-цитемію, хронічну еозинофільну лейкемію, мастоцитоз та хронічні мієлопроліферативні захворювання, некласифіковані. Введенню генетичних маркерів у діагностичну практику при мієлопроліферативних неоплазмах передували кілька відкриттів. Відомо, що донедавна лише для ХМЛ було описано чіткий цитологічний маркер — філадельфійську хромосому, та відповідний молекулярний маркер — злитий ген *bcr/abl*. Але в 2005 році одночасно кілька груп

авторів [2–5] описали мутацію в чотирнадцятому екзоні гена *jak2*, що призводила до заміни валіну на фенілаланін у позиції 617. Мутація V617F виявляється у 95% хворих на справжню поліцитемію, приблизно і приблизно у 50% хворих на есенціальну тромбоцитемію та ідіопатичний мієлофіброз. І хоча функціональна роль цієї мутації не встановлена (вважають, що дана мутація в псевдокіназному домені призводить до порушення регуляції кіназної активності, що призводить до конститутивної активації тирозинкінази JAK2, і, відповідно, до збільшення кількості еритроцитів, тромбоцитів та гранулоцитів), однак висока частота даної мутації дозволила включити її як важливий діагностичний критерій. Так виявлення цієї мутації відноситься до головних критеріїв при встановленні діагнозів “справжня поліцитемія”, “ідіопатичний мієлофіброз” та “есенціальна тромбоцитемія” [1]. Також її наявність виключає вторинну поліцитемію, реактивний тромбоцитоз чи вторинний фіброз кісткового мозку тощо.

У дані роботі наводиться метод виявлення мутації V617F за допомогою tetra-primer amplification refractory mutation system ПЛР (T-ARMS ПЛР).

Матеріали і методи

У роботі використовували зразки крові хворих (за інформованої згоди), що проходили лікування в гематологічних клініках м. Києва. РНК виділяли згідно [6]. 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. Праймери підбирали за допомогою он-лайн утиліти http://cedar.genetics.soton.ac.uk/public_html/primer1.html. Полімеразну ланцюгову реакцію проводили в об'ємі 30 мкл продовж 30 циклів (94 °С — 35 с, 60 °С — 40 с, 72 °С — 35 с) з використанням буферу для ПЛР (100 мМ трісОН 8,0 50 мМ KCl); 10 pmol праймерів J4-FO (GAAGAGAAGTAGGAGACTACGGTCAAC) та J4-RO (ATAAGCAGAATATT TTTGGCACATACAT); 30 pmol праймерів J4-FI (GCATTTGGTTTTAAATTATGGAGT ATATG) та J4-RI (ACCAGAATAT TCTCGTCTCCACAAAA); 200 мМ dNTP та 2 мкл суміші для отримання кДНК. Продукти ампліфікації аналізували в 2% агарозному гелі.

Результати та обговорення

Існує кілька підходів до виявлення мутації V617F в гені *jak2* — це і ПЛР ампліфікація відповідного регіону з подальшим його секвенуванням чи рестрикційним аналізом, проведення кількісної ПЛР, тощо. Однак як було показано раніше [7] є доцільним використання саме ЗТ-ПЛР задля уніфікації початкових процедур виявлення генетичних маркерів, наприклад, для виявлення злитого гена *bcrlabl* [8], делецій в 12-му екзоні гена *jak2* тощо. Раніше нами було запропоновано тест-систему для виявлення мутації V617F за допомогою ПЛР та прямого секвенування ампліфікатів [7]. І хоча даний підхід має певні переваги, насамперед виявлення мінорних мутацій в даному регіоні даний аналіз вимагає значного часу і є коштовним. Тому для експрес тесту нами

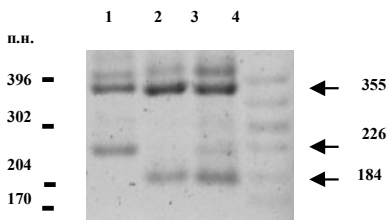


Рис. Електрофореграма продуктів T-ARMS ПЛП, що були отримані при дослідженні крові:

1 — здорового донора (G-алель), 2 — хворого М (Т-алель), 3 — хворого П (G- та Т- алелі); 3 — маркер молекулярних мас рЕТ32a/HinfI. Праворуч стрілками показано відповідні алелі

пропонується метод виявлення мутації V617F за допомогою методу tetra-primer amplification refractory mutation system PCR (T-ARMS-PCR), який базується на використанні двох зовнішніх геноспецифічних праймерів та двох алельспецифічних внутрішніх праймерів. В результаті проведення ПЛП із усіма чотирма праймерами напрацьовується повнорозмірний контрольний фрагмент та один чи два алельспецифічні фрагменти. Праймери підбирають так, щоб алельспецифічні фрагменти різнилися за розміром і їх можна було б виявити за допомогою простого електрофорезу в агарозному гелі. Так в нашому випадку розмір продукту для G-алеля (норма) складає 226 п.н., для Т-алеля (відповідає мутації V617F) — 184 п.н., контрольний геноспецифічний фрагмент — 355 п.н.

На рисунку представлено електрофореграму продуктів T-ARMS ПЛП хворих П., 1950 року народження та М, 1942 р.н., (діагнози встановлені на підставі клініко-гематологічних досліджень) та здорового донора. Як видно з рисунку у всіх трьох зразках виявляється контрольний геноспецифічний алель. У здорового донора виявляється лише G-алель, у хворого П — Т-алель і у хворого М — обидва маркери (G- та Т-алелі). Тому можна стверджувати, що ген *jak2* гомозиготний за мутацією V617F у пацієнта П і гетерозиготний — у пацієнта М. Оскільки у обох хворих виявлено мутацію V617F, то діагноз, який був поставлений за клініко-гематологічними показниками підтверджується наявністю генетичних маркерів згідно чинних діагностичних критерії ВОЗ [1].

Таким чином, запропонована методика виявлення мутації V617F за допомогою T-ARMS ПЛП може використовуватись для генетичної діагностики мієлопроліферативних неоплазм.

Література

1. Swerdlow, S.H., Campo, E., Harris, et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, Fourth Edition.— 2008.— IARC.— 439 p.
2. 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.

3. 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.

4. Levine R.L., Wadleigh M., Coombs 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.

5. 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.

6. 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.

7. Дибков М.В., Гартовська І.Р., Телегеев Г.Д., Малюта С.С. Розробка тест-системи для виявлення мутації V617F гена *jak2* у хворих на хронічні мієлопроліферативні захворювання // *Наука та інновації.*— 2009.— Т.5, №6.— С. 59–63.

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.

Резюме

Мутація V617F гена *jak2* є важливим діагностичним критерієм при хронічних мієлопроліферативних захворюваннях. Запропоновано методику для її виявлення за допомогою T-ARMS ПЦР.

Мутація V617F гена *jak2* являється важним діагностичним критерієм при діагностиці хронічних мієлопроліферативних захворювань. Предложена методика ее выявления с помощью T-ARMS ПЦР.

V617F mutation *jak2* gene is an important diagnostic criterion for the diagnostics of chronic myeloproliferative disorders. The method of detection using T-ARMS PCR was proposed.

ЗЕЛЕНЬКИЙ С.Б.¹, БОБЫК В.И., МАНДРЫК С.Я., СИДОРИК Л.Л., ПОГРЕБНОЙ П.В.

¹ *ИЕПОР им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины,*

Украина, 03022, Киев, ул. Васильковская, 45, e-mail: now15green@yahoo.com

ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ПОЛИКЛОНАЛЬНЫХ МОНОСПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ ПРОТИВ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНОГО, НИЗКОИММУНОГЕННОГО И ВЫСОКОКАТИОННОГО ПЕПТИДА *HVD-2*

Антимикробные пептиды (дефенсины) являются неотъемлемой частью так называемого неадаптивного, врожденного иммунитета. Все они действуют на широкий спектр микроорганизмов, грибов и вирусов, имеющих оболочку. Кроме того, исследования последних лет, показали, что что опухолям

эпителия ротовой полости, вульвы и шейки матки, толстой кишки человека свойственна повышенная экспрессия дефенсинов [1]. Также продемонстрировано наличие дефенсинов в сыворотке крови онкологических больных. Было установлено, что уровень hBD-1 в сыворотке крови больных раком легких можно рассматривать как вспомогательный маркер для диагностирования этого заболевания [1]. Все эти данные требуют более тщательного изучения, и в связи с этим актуальной становится задача детектирования дефенсинов как на уровне экспрессии генов, так и их количественного определения в биологическом материале. Так, для изучения возможной роли дефенсинов в регуляции врожденного и приобретенного иммунитета, их участия в механизмах карцерогенеза перспективными и высокоинформативными является иммунобиологические подходы. Важным инструментом для изучения экспрессии, клеточной локализации поиска белков-партнеров и клеточных мишеней при онкопатологиях являются высокоаффинные, специфические антитела доступ к которым ограничен.

Одной из проблем при получении антител к малым гидрофобным пептидам, с которой сталкиваются исследователи, есть их низкая иммуногенность, которая обуславливается как трехмерной структурой молекулы, так и свойствами самих пептидов. К таким низкомолекулярным пептидам относятся, в частности, дефенсины млекопитающих.

В данной работе рассматривается возможность получения высокоаффинных поликлональных моноспецифических антител, используя метод аутоконъюгации дефенсина hBD-2 с целью увеличения иммуногенности данного пептида, а также адаптация методов очистки антител.

Материалы и методы

Рекомбинантный hBD-2 получали путем наращивания и индукции бактериальной культуры *E. coli* (штамм XL-Gold), трансформированной плазмидной ДНК (pGEX-2T) с клонированным кДНК геном hBD-2. Выделение и очистку hBD-2 проводили как описано в [2], за исключением стадии очистки с использованием ионообменной хроматографии с Mono-SP column. Эта стадия была заменена очисткой с использованием Sep-Pak C₁₈ cartridge с носителем сефадекс (Waters, USA), водными растворами ацетонитрила (10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 80%, 100%) с pH, который не превышает 4, а также бидистиллированной водой с pH 3. Подкисление растворов проводили, используя трифторуксусную кислоту (ТФУ). Белковые фракции после протеолиза тромбином подкисляли ТФУ до pH 3 и наносили на Sep-Pak C₁₈. Используя растворы ацетонитрила снимали с носителя фракции содержащие hBD-2 (40% раствор), GST+hBD-2 (50%, 60% растворы), GST (80% раствор). Качество очистки hBD-2 контролировали с помощью SDS-электрофореза в градиенте ПААГ (7–22%) по методу Леммли [5]. *Концентрацию белка* определяли по методу Бредфорд [3].

Аутоконъюгирование hBD-2 проходило в две стадии (с применением диметилацетамида и малиемидного эфира), которые состояли из активации пептидов и непосредственно аутоконъюгирования.

Иммунизацию лабораторных животных (кролики) проводили аутоконъюгированным hBD-2, используя разработанную ранее нами схему [2]. Антисыворотку получали через 7 дней после последней иммунизации. Высаливание иммуноглобулинов из сыворотки проводили насыщенным раствором сульфата аммония до 50% (v/v).

Хроматографическая очистка иммуноглобулинов на колонке с DEAE-Tuorearl. В работе использовали носитель DEAE-Tuorearl-650M фирмы ToyoSoda (Япония). Носитель уравнивали Na-фосфатным буфером, pH 7,2. После высаливания сульфатом аммония осадок иммуноглобулинов собирали центрифугированием (10 000 об/мин, 10–15 минут при +4 °C) и растворяли в минимальном объеме охлажденного раствора PBS pH 7,3. Диализ проводили против бидистиллированной воды в течении 20 минут, потом против охлажденного раствора PBS pH 7,3 в течении 18 часов при +4 °C. После диализа иммуноглобулины наносили на колонку с DEAE-Tuorearl. Колонку 3 промывали объемами раствора PBS буфера, pH 7,3. Белковые фракции, которые не связались с носителем, собирали отдельно для дальнейшей очистки.

Очистка IgG на ProteinG-sepharose. В работе использовали носитель Protein G-Sepharose фирмы Pharmacia (Швеция). Колонку уравнивали буфером PBS, pH 7,3. После нанесения предварительно очищенных на DEAE-Tuorearl иммуноглобулинов на колонку с ProteinG-sepharose, антитела инкубировали с носителем 2–3 часа при комнатной температуре, промывали колонку 10 объемами буфером PBS pH 7,3 для удаления не связавшегося белка и проводили элюцию 0,2 М глицином pH 2,5 с последующей нейтрализацией элюата 1 М раствором Tris-HCl, pH 11,0. Чистоту полученных IgG проверяли методом SDS-электрофореза в 15% ПААГ. Фракции, содержащие максимальное количество белка объединяли и диализовали против буфера PBS, pH 7,3, при +4 °C на протяжении 18 часов. Конечная концентрация IgG составляла в среднем 1,5–1,6 мг/мл.

Твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA). Титр антител против белка hBD-2 в сыворотке на всех этапах очистки определяли с помощью метода твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) с модификациями. Учитывая высокую гидрофобность антигенов, в работе использовали микропланшеты фирмы Nunc (Дания) с маркировкой Maxisorb. Имобилизацию дефенсина проводили на протяжении 18 часов при +4 °C в PBS буфере, pH 7,3. Конечная концентрация антигенов вносимых в каждую лунку составляла 1 мкг/мл. Все последующие операции проводили с использованием буфера PBS pH 7,3 с 0,1% Tween-20 (PBS-T). Антисыворотку инкубировали при комнатной температуре на протяжении двух часов, а полученные антитела в течении часа в тех же условиях.

Иммуноблот-анализ (Western blot analysis). Определение специфичности полученных антител к hBD-2 клеточных лизатах проводили с помощью иммуноблотинга по известной методике [4] с модификациями. В иммуноблоттинге для контроля специфичности антител против очищенного hBD-2 использовали лизат клеток млекопитающих Tіrex с добавлением глутатион-6-трансферазы (GST), химерного белка GST-hBD-2 и hBD-2.

Иммунопреципитация. Для проведения иммунопреципитации использовали Protein A Sepharose фирмы Pharmacia (Швеция). Все процедуры проводили по стандартной методике с небольшими модификациями. Продукты иммунопреципитации после проведения градиентного SDS-электрофореза в ПААГ, визуализировали прокраской геля серебром и параллельно постановкой иммуноблоттинга.

Результаты и обсуждение

Исходя из того, что данный малый гидрофобный пептид обладает слабыми иммуногенными свойствами, было решено повысить иммуногенность hBD-2, используя метод аутоконъюгации с применением диметилацетамида и малиемидного эфира. В результате аутоконъюгирования были получены молекулы пептидов, состоящие из ди-, тетра- и мономеров. Качество конъюгирования hBD-2 и mBD-2 проверяли с помощью градиентного SDS-электрофореза в ПААГ, а для hBD-2 Western blot анализом с использованием полученных ранее моноклональных антител против hBD-2 [6]. Результаты проверки аутоконъюгирования в иммуноблот-анализе с использованием полученных ранее моноклональных антител против hBD-2 представлены на рис. 1, А. При анализе рис. 1, А можно сделать вывод, что в результате аутоконъюгирования образуются тетрамеры дефенсина с молекулярной массой около 16 кДа.

В ходе получения поликлональных антител было выяснено, что данные антитела имели слабую аффинность к человеческому сывороточному альбумину. Для определения возможности возникновения данного “феномена” был проведен компьютерный анализ аминокислотных последовательностей человеческого альбумина и hBD-2, используя программу определения гомологии, предоставленную на веб-сервере LALIGN (http://www.ch.embnet.org/software/LALIGN_form.html). Было найдено три сходные последователь-

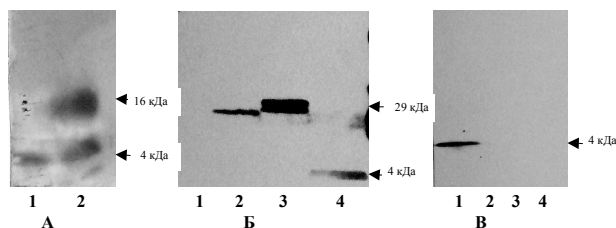


Рис. 1. **А.** Иммуноблоттинг с использованием полученных поликлональных анти-hBD-2 антител. Дорожки: 1 — очищенный белок hBD-2; 2 — аутоконъюгированный белок hBD-2. **Б.** Иммуноблоттинг с использованием полученных поликлональных анти-hBD-2 антител. Блокирование сайтов неспецифической сорбции в растворе сухого молока. Дорожки: 1 — лизат клеток Tirex; 2 — лизат клеток Tirex+GST+HSA (человеческий сывороточный альбумин); 3 — лизат клеток Tirex+GST-hBD-2; 4 — лизат клеток Tirex+hBD-2. **В.** Иммуноблоттинг с использованием полученных поликлональных анти-hBD-2 антител. Блокирование сайтов неспецифической сорбции сывороткой крупного рогатого скота. Дорожки: 1 — лизат клеток Tirex+очищенный белок hBD-2; 2 — лизат клеток Tirex+GST-hBD-2; 3 — лизат клеток Tirex+GST+HSA; 4 — лизат клеток Tirex

ности длиной 11, 6 и 4 аминокислотных остатка с соответствующими совпадениями 63,6%, 66,7% и 100%. Общая последовательность размером 11 аминокислотных остатков вполне может являться антигенной детерминантой, причем эта последовательность находится на С-конце hBD-2. И, возможно, что она в первую очередь подвергается воздействию протеаз при иммунизации лабораторных животных.

Для увеличения аффинности антител против hBD-2 и mBD-2 было необходимо очистить антитела от фракции, распознающей и человеческий сывороточный альбумин и hBD-2 из общего пула поликлональных антител. Для этого синтезировали афинную колонку Bg-CN sepharose 4B с пришитым на нее в качестве лиганда альбумином человека (ICN). Пул антител пропускался через колонку трижды, с промежуточной инкубацией 30 минут. Не связавшаяся с альбумином фракция антител была собрана и проверена на аффинность к hBD-2 и альбумину человека. Полученные антитела не выявили альбумин человека ни в ELISA, ни в Western blot анализе. При проверке в методе ELISA минимальная рабочая концентрация очищенных поликлональных анти-hBD-2 антител была 0,35 мкг/мл (результаты не представлены).

Для выяснения возможности определения нативного hBD-2 в биологических жидкостях с использованием полученных поликлональных антител необходимо было проверить их работу в методе иммунопреципитации. В эксперименте использовались клеточные лизаты, как бактериальных культур, продуцирующих рекомбинантный hBD-2, так и лизаты линии клеток A431, индуцированные EGF, продуцирующие нативный hBD-2. Было продемонстрировано, что очищенные поликлональные анти-hBD-2 антитела специфически узнавали белок hBD-2 в лизатах клеток бактериальных культур, трансформированных вектором с κДНК геном hBD-2, так и лизатах линии клеток A431 (результаты не представлены).

Последним этапом проверки работы полученных поликлональных антител был подбор условий и проведение иммуноблот-анализа. Результаты иммуноблот-анализа представлены на рис. 1, Б и В. При использовании в качестве агента для блокирования неспецифической сорбции раствора сухого молока, очищенные анти-hBD-2 неспецифически узнавали не только белок hBD-2, а также, химерный белок GST-hBD-2 и GST (рис. 1, Б). При использовании в качестве агента для блокирования неспецифической сорбции бычьей сыворотки, очищенные анти-hBD-2 специфически узнавали только белок hBD-2 (рис. 1, В). При проверке в методе иммуноблот-анализа минимальная рабочая концентрация очищенных поликлональных анти-hBD-2 антител была 1,75 мкг/мл. Таким образом, было оптимизировано условия работы очищенных антител в иммуноблот-анализе с использованием в качестве блокирующего агента сыворотку БРС.

Выводы

В работе представлены результаты получения и характеристики поликлональных кроличьих антител против низкомолекулярного, низкоиммуногенного и высококатионного человеческого пептида hBD-2. Разработано метод повышения иммуногенных свойств белка hBD-2 путем аутоконъюгирования.

Продемонстрировано роботу полученных специфических поликлональных антител в твердофазном иммуноферментном анализе, иммунопреципитации и иммуноблот-анализе.

Литература

1. Dynamic alteration of human b-defensin 2 localization from cytoplasm to intercellular space in psoriatic skin / Wook-Kang Huh, Takashi Oono, Yoshinori Shirafuji [et al.] // *J. Mol. Med.*— 2002.— Vol.80.— P. 678–684.
2. Получение рекомбинантного шаперона GroEL и его иммунологическая кросс-реактивность с Hsp60 / Л.Н. Капустян, Р.Г. Киямова, В.С. Гришкова [и др.] / *Биополимеры и клетка.*— 2006.— Т.2, №22.— С. 117–120.
3. *Bradford M. M.* A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / *Marian M. Bradford* // *Analytical Biochemistry.*— 1976.— Vol.86.— P. 193–200.
4. Idiopathic dilated cardiomyopathy in the young: Clinical profile and natural history / *Taliercio C.P., Seward J.B., Driscoll D.J.* [et al.] // *JACC.*— 1985.— Vol.6.— P. 1120–1126.
5. *Laemmli U.K.* Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T4 / *Ulrich K. Laemmli* // *Nature.*— 1970.— 227, №52.— P. 680–685.
6. *P.V. Pogrebnoy et al.* *Experemental Onkology*, March 2003, 25, p. 36–39.

Резюме

В работе продемонстрировано результаты получения специфических поликлональных антител против человеческого β -дефенсина-2. Показано роботу полученных анти-hBD-2 антител в твердофазном иммуноферментном анализе, иммунопреципитации и иммуноблот-анализе.

В роботі продемонстровано результати отримання специфічних поліклональних антитіл проти людського β -дефенсину-2. Показано роботу отриманих анти-hBD-2 антитіл в твердофазному імуноферментному аналізі, імунопреципітації та імуноблот-аналізі.

The results of the purification of high affinity polyclonal antibodies against human β -defensin-2 are represented in the work. Purified anti-hBD-2 antibodies were examined in ELISA, immunoprecipitation as well as in western blot analysis.

¹ЗУЕВА М.И., ²АТРАМЕНТОВА Л.А.

¹ГУ “Институт дерматологии и венерологии АМН Украины” Украина, 61057, Харьков, ул. Чернышевская, 7/9, e-mail: mahaqq@yandex.ru

²Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина, Украина, 61077, Харьков, пл. Свободы, 4, e-mail: wshkoda23@rambler.ru

ПОЛИМОРФИЗМ 1258G/A ГЕНА SPINK-5 ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ КРАСНОЙ ВОЛЧАНКЕ

Хроническая красная волчанка — заболевание, связанное с аутоиммунными патологиями. Для него характерно поражение кожи и соединительной ткани. О роли генетических факторов в развитии этого заболевания свиде-

тельствуют результаты семейных, близнецовых [2] и иммуногенетических исследований [4, 7]. Понимание природы заболеваний связывают с анализом кандидатных генов, среди которых большое внимание исследователей привлекает ген *SPINK-5* (serine protease inhibitor Kazal-type-5) — ингибитор сериновых протеаз пятого Казал-типа, локализованный на хромосоме 5q. Его продукт — ингибитор сериновых протеаз, принимает участие в противовоспалительных и антимикробных процессах, контролирует дифференцировку эпителия и организацию межклеточного матрикса, регулирует ангиогенез и клеточную адгезию [6, 9]. Полиморфизм гена *SPINK-5* связан с аллергиями, астмой, синдромом Нетертона, целиакией и др. [8, 10]. Полиморфизм *1258G/A* относится к экзону 14 и обуславливает аминокислотный полиморфизм (Glu 420 Lys) белка *SPINK-5*. В данной статье представлены результаты исследования SNP *1258G/A* экзона 14 гена *SPINK-5* при хронической красной волчанке.

Материалы и методы

Исследована ДНК 76 больных хронической красной волчанкой и 96 человек без признаков этого заболевания. Все обследованные — жители Харькова и Харьковской области, украинцы и русские. Выделение ДНК проведено фенольным методом из лейкоцитов периферической крови по стандартной методике [3]. Генотипирование выполнено методом ПДРФ (полиморфизм длин рестрикционных фрагментов). Амплификация фрагмента 14 экзона гена *SPINK-5* длиной 304 пары нуклеотидов проведена при помощи ПЦР (полимеразной цепной реакции) с использованием праймеров — 5'-*TGC AAT TGT GAG GAT TTC ACA G-3'* / 5'-*CCT GAA CAT GAT CTG TGG ATC-3'* [9]. Температурный режим: 95 °C 30 секунд, 52 °C 30 секунд, 72 °C 40 секунд. Объём рестрикционной смеси — 30 мкл. Амплифицированные фрагменты подвергали действию рестриктазы *HphI* (Fermentas, Литва), которая, если в положении 197 находится аденин, разрезает фрагмент в последовательности *GGTGA(N)8* на два участка, и на три, если в этом положении находится гуанин. Рестриктазу добавляли из расчёта три единицы на 30 мкл смеси после ПЦР. Образцы инкубировали в течение ночи при температуре 37 °C. Детекцию проводили с помощью электрофореза в 3% агарозном геле. Рестрикционные фрагменты соответствовали трём генотипам (рис. 1). Проверку гипотез о равенстве частот аллелей и генотипов в основной и контрольной группах, а также распределении фактических и теоретически ожидаемых частот генотипов проводили с помощью критерия χ^2 на уровне значимости 0,05 [1].

Результаты и обсуждение

Частоты SNP *A/G* различны у мужчин и женщин контрольной группы (табл. 1). У мужчин более частым оказался аллель *G* (0,64), у женщин — аллель *A* (0,59, $p < 0,01$). Это сделало необходимым проводить дальнейшие сравнения с учётом пола. Разница в частоте аллелей между основной и контрольной группами выявлена только у мужчин. Частота SNP *A* у мужчин с ХКВ составляет 0,69, что в 1,9 раза выше, чем у здоровых — 0,36 ($p < 0,001$).

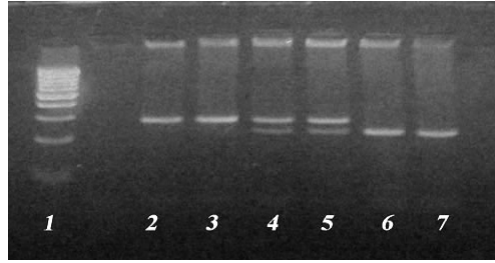


Рис. 1. Электрофореграмма ПЦР-продуктов ДНК шести человек, генотипированных по полиморфизму 1258G/A гена *SPINK-5*: (1 — маркер молекулярной массы; 2, 3 — генотип AA; 4, 5 — генотип AG; 6, 7 — генотип GG)

Таблица 1

Распределение аллелей и генотипов SNP *SPINK-5*

Группа	Пол	n	Генотипы <i>SPINK-5</i>			Частоты SNP	
			AA	AG	GG	A	G
Контроль	Мужской	37	6	15	16	0,36	0,64
	Женский	59	20	30	9	0,59	0,41
Больные ХКВ	Мужской	35	16	16	3	0,69	0,31
	Женский	41	13	21	7	0,57	0,43

Примечание. n — число обследованных, ХКВ — хроническая красная волчанка.

Таблица 2

Частоты генотипов (%)

Группа	Пол	Фактические			Теоретические		
		AA	AG	GG	AA	AG	GG
Контроль	Мужской	16,22	40,54	43,24	13,32	46,35	40,33
	Женский	33,90	50,85	15,25	35,19	48,27	16,54
Волчанка	Мужской	45,71	45,71	8,58	47,02	43,10	9,88
	Женский	31,70	51,22	17,08	32,86	48,93	18,21

Распределение генотипов у мужчин и женщин основной и контрольной групп соответствует равновесию Харди-Вайнберга (табл. 2). Половые различия в частоте аллелей изученного аутосомного гена пока не находят генетического объяснения. Прояснить ситуацию позволит расширение выборки в ходе дальнейших исследований.

Различия в частоте генотипов у больных и здоровых выявлены только в мужской группе (табл. 2). Больные мужчины в 2,8 раза чаще, чем здоровые являются обладателями генотипа AA, в пять раз реже имеют генотип GG ($p < 0,01$). Продукт гена *SPINK-5* белок SPINK-5 является негативным регулятором иммунного ответа, поэтому уменьшение его активности может инициировать аутоиммунные процессы, которые приводят к развитию хронической

красной волчанки [2]. Эти нарушения также могут быть связаны с изменением на уровне дифференцировки клеток иммунного ответа, который также контролируется продуктом гена *SPINK-5*. Известна также роль *SPINK-5* в формировании барьерной функции кожи и, в частности, защиты от ультрафиолетового излучения, инфекционных агентов, химически активных веществ и других неблагоприятных факторов внешней среды [5]. Перечисленные свойства этого белка убеждают в необходимости дальнейшего исследования гена *SPINK-5*, что позволит полнее понять природу исследованного заболевания и найти молекулярные маркеры наследственной предрасположенности.

Литература

1. Гланц С. Медико-биологическая статистика.— М.: Практика.— 1998.— 459 с.
2. Дядык А.И., Багрий А.Э., Ракитская И.В., Щукина Е.В. Системная красная волчанка: некоторые вопросы этиологии и патофизиологии // Украинський ревматологічний журнал.— 2009.— №2.— С. 61–66.
3. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генной инженерии. Молекулярное клонирование: Пер. с англ.— М.: Мир, 1984.— 480 с.
4. Ardoin S.P., Pisetsky D.S. Developments of the scientific understanding of lupus // *Athr. Res. Ther.*— 2008.— №10.— P. 218–226.
5. Deraison C., Bonnart C., Lopez F., Besson C. et al. LEKTI fragments specifically inhibit KLK5, KLK7, and KLK14 and control desquamation through a pH-dependent interaction // *Mol. Biol. Cell.*— 2007.— Vol.18, №9.— P. 3607–3619.
6. Godic A., Dragos V. Successful treatment of Netherton's syndrome with topical calcipotriol // *Europ. J. Dermatol.*— 2004.— Vol.14, №1.— P. 115–117.
7. Horvitz D.A. Regulatory T cells in systemic lupus erythematosus: past, present and future // *Athr. Res. Ther.*— 2008.— №10.— P. 226–235.
8. Hubiche T., Ged C., Benard A., Leaute-Labreze C. et al. Analysis of *SPINK 5*, *KLK 7* and *FLG* genotypes in a French atopic dermatitis cohort // *Acta Derm Venereol.*— 2007.— Vol.87, №6.— P. 499–505.
9. Kabesch M., Carr D., Weiland S.K., von Mutius E. Association between polymorphisms in serine protease inhibitor, kazal type 5 and asthma phenotypes in a large German population sample // *Clin. Exp. Allergy.*— 2004.— Vol.34, №2.— P. 340–345.
10. Wapenaar M., Monsuur A., Poell J., van 't Slot R. et al. The *SPINK* gene family andeliac disease susceptibility // *Immunogenetics.*— 2007.— Vol.59, №5.— P. 349–357.

Резюме

Структура славянского населения Харькова и Харьковской области по однонуклеотидному полиморфизму *1258A/G* гена *SPINK-5* соответствует равновесному состоянию. Аллель *A* является фактором повышенного риска по хронической красной волчанке у мужчин.

Структура слов'янського населення Харкова і Харківської області за однонуклеотидним поліморфізмом *1258A/G* гену *SPINK-5* відповідає стану рівноваги. Алель *A* є фактором підвищеного ризику по хронічному червоному вовчаку у чоловіків.

Slavic population structure of Kharkov and region of single-nucleotide polymorphism *1258A/G* gene *SPINK-5* corresponds to the equilibrium state. Allel *A* is high-risk factor of chronic lupus erythematosus in men.

ЛИЛО В.В., КОЦАРЕНКО К.В., МАНЬКО В.Г., МАЦЕВИЧ Л.Л.,
РУБАН Т.А., ЛУКАШ Л.Л.

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,
Україна, 03143, вул. Заболотного, 150, e-mail: lukash@imb.org.ua

ЦИТОКИНИ ЯК ПОТЕНЦІЙНІ МОДУЛЯТОРИ РЕПАРАЦІЇ ПЕРВИННИХ УШКОДЖЕНЬ, ІНДУКОВАНИХ АЛКІЛУВАЛЬНИМИ СПОЛУКАМИ

Забруднення довкілля є одним з основних факторів, що впливають на стабільність геному. Серед розмаїття антропогенних чинників, що здатні спричинити генотоксичну дію, можна виділити групу алкілувальних речовин. Вони є досить поширеними пошкоджуючими чинниками хімічної природи — в тому числі, як фактори промислового забруднення та професійного ризику.

Одним з генопротекторних механізмів, що протидіють мутагенному впливові алкілувальних сполук на клітинну ДНК, є репарація первинних пошкоджень, індукованих цими сполуками, що здійснюється, зокрема, репаративним ферментом O⁶-алкілгуанін-ДНК алкілтрансферазою (MGMT). Цей фермент реалізує пряму репарацію найбільш мутагенно- та канцерогеннонебезпечного пошкодження — O⁶-алкілгуаніну в клітинній ДНК [1, 2]. Таким чином, знижений рівень експресії та/або активності цього ферменту є важливим фактором ризику для людей, чия професійна діяльність передбачає контакт з алкіляторами. Тому важливо якомога краще зрозуміти механізми, що регулюють експресію цього ферменту.

Ці регуляторні механізми є складними і на сьогоднішній день недостатньо вивченими. Так, відомо, [3] що цей фермент є індукційним; його експресія може зростати у відповідь на ряд чинників (гіперметилування ДНК, розриви ДНК, тощо). Експресія MGMT може також регулюватися опосередкованим шляхом — через вплив регуляторних механізмів клітини (p53-опосередковані, протеїнази С-опосередковані, фосфорилування, убіквітинування, тощо). Існують дані, що на експресію MGMT можуть впливати також цитокіни та фактори росту (інтерферон β, IL-3 — окремо чи в сполученні з SCF, а також GM-CSF) [4] — проте саме цей аспект проблеми вивчений недостатньо, і в літературі наявні лише поодинокі відомості, що стосуються цього питання. Наприклад, IFN-β знижує транскрипцію гену MGMT через індукцію експресії білка p53. Тому IFN-β може знижувати рівні MGMT в клітинах гліоми через інгібування транскрипції гену MGMT [5].

Цитокіни є групою поліпептидних медіаторів, що беруть участь у формуванні і регуляції захисних реакцій організму. До цитокінів відносяться інтерферони, колонієстимулюючі фактори, інтерлейкіни, хемокіни, трансформуючі ростові фактори, група факторів некрозу пухлин і деякі інші. Біологічні ефекти цитокінів реалізуються через специфічні клітинні рецепторні комплекси. Гіперпродукція цитокінів веде до розвитку системної запальної реакції і може слугувати причиною розвитку ряду патологічних станів. На рівні

організму цитокіни здійснюють зв'язок між імунною, нервовою, ендокринною, кровотворною та іншими системами і служать для їхнього залучення до організації і регуляції захисних реакцій [6].

Метою нашої роботи було дослідження можливого впливу на експресію MGMT таких цитокінів, як LIF (лейкемієінгібуєчий фактор), SCF (фактор стовбурових клітин) та IL-3 (інтерлейкін 3).

LIF є плейотропним цитокіном, який відноситься до родини IL-6 та має молекулярну масу від 38 до 67 кДа. Біологічна дія LIF здійснюється через взаємодію з рецептором LIF-R на зовнішній поверхні плазматичної мембрани клітин [7].

Інтерлейкін 3 являє собою сильно гликозильований білок з молекулярною масою 21–36 кДа. Він діє як гемопоетичний фактор росту, що стимулює проліферацію і функцію клітин всіх ростків кровотворення [8].

SCF — це цитокін, що бере участь у регуляції процесів диференціації клітин (зокрема, гемопоезу) [9]. Він може існувати як у вільній, так і у трансмембранній формі; біологічна дія SCF здійснюється опосередковано через тирозинкіназний рецептор (c-Kit) [10].

Матеріали і методи

В роботі використовували культури клітин людини різного походження: первинні фібробластоподібні клітини ВКФ, іморталізована клітинна лінія 4BL2, та пухлинна лінія Нер-2 (рак гортані). Використовували методики дослідження та умови експерименту описано в [11].

Результати і обговорення

Ідентифікацію білку MGMT в клітинному екстракті проводили за допомогою Western blot аналізу.

У досліджуваних клітинах виявлено дві форми MGMT: немодифікована, з молекулярною масою 22–24 кДа, та модифікована, з молекулярною масою 48–50 кДа. Це явище було нами описано раніше [11].

Можливий вплив цитокіну LIF на рівень експресії MGMT перевірявся з використанням клітин ВКФ та Нер-2. Отримані результати представлені на рис. 1.

В контрольному варіанті (пухлинні клітини) були присутні обидві форми білку — як немодифікована, так і модифікована. При цьому переважала немодифікована форма. Після обробки клітин LIF спостерігалось інгібування синтезу цього білку. Білок, що знаходився у немодифікованій формі, взагалі не виявлявся, а кількість білка, який перебував у модифікованій формі, практично не змінювалася.

В умовно нормальних первинних клітинах у контрольних зразках виявлялася лише модифікована форма білку. Після обробки клітин LIF спостерігалось незначне зростання рівню експресії ферменту.

Вплив ростових факторів IL-3 та SCF досліджувався з використанням іморталізованої лінії мезенхімальних клітин крові людини 4BL2. Результати дослідження представлені на рис. 2.

В контрольному варіанті спостерігаються обидві форми білку — як модифікована, так і немодифікована. Після обробки досліджуваними

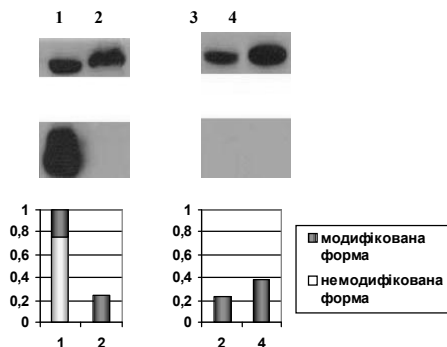


Рис. 1. Вплив цитокіну LIF на експресію АГТ в пухлинних клітинах людини (а) та в первинних клітинах людини (б):

1 — Нер 2, інтактні; 2 — Нер 2+LIF (20 мкг/мл); 3 — ВКФ, інтактні; 4 — ВКФ+LIF (20 мкг/мл)

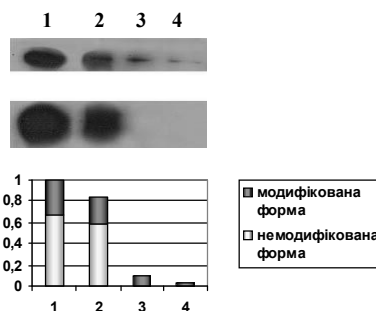


Рис. 2. Вплив ростових факторів ІЛ-3 та SCF на експресію MGMT в лінії імморталізованих мезенхімальних клітин людини:

1 — Нер 2, позитивний контроль; 2 — 4BL6, контроль; 3 — 4BL6+ІЛ-3 (20 мкг/мл), 4 — 4BL6+SCF (20 мкг/мл)

цитокінами білок, що перебуває у немодифікованій формі, цілком зникає, а кількість білку, що знаходиться у модифікованій формі, значно знижується. Таким чином, ми маємо підстави говорити про інгібування синтезу MGMT під впливом згаданих цитокінів.

Висновки

Нами було показано, що цитокіни ІЛ-3 та SCF у культурі клітин людини спричиняють виразний інгібуючий вплив на експресію репаративного ензиму MGMT.

Щодо цитокіну LIF, то характер його впливу на експресію цього ензиму носив дещо інший характер: практично не впливаючи на кількість білку, що знаходився у модифікованій формі, він спричиняв повне зникнення білку MGMT у немодифікованій формі.

Література

1. *Pegg A.E.* Mammalian O6-alkylguanine-DNA-alkyltransferase: regulation and importance in response to alkylation carcinogenesis and therapeutic agents // *Cancer Res.*— 1990.— Vol.50, №25.— P. 6119–6122.
2. *Лукаш Л.Л., Манько В.Г., Луло В.В.* Роль O6-алкілгуанін-ДНК-алкілтрансферази в репарації ушкоджень, індукованих алкілуючими сполуками // *Біополімери і клітина.*— 2001.— Т.17, №4.— С. 265–278.
3. *Margison G.P., Povey A.C., Kaina B., Santibanez Koref M.F.* Variability and regulation of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase // *Carcinogenesis.*— 2003.— Vol.24, №4.— P. 625–635.
4. *Gerson S.L., Phillips W, Kastan M, Dumenco L.L, Donovan C.* Human CD34+ hematopoietic progenitors have low, cytokine-unresponsive O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase and are sensitive to O6-benzylguanine plus BCNU // *Blood.*— 1996.— Vol.1, №88.— P. 1649–55.
5. *Natsume A., Ishii D., Wakabayashi T., Tsuno T., Hatano H., Mizuno M., Yoshida J.* IFN- β Down-Regulates the Expression of DNA Repair Gene MGMT and Sensitizes Resistant Glioma Cells to Temozolomide // *Cancer Res.*— 2005.— Vol.65.— P. 7573–7579
6. *Симбирцев А.С.* Цитокины — новая система регуляции защитных реакций организма // *Цитокины и воспаление.*— 2002.— Т.1, №1.— С. 9–16.
7. *Лобанок Е.С., Белянович Л.М., Лаврукевич Т.В., Волотовский И.Д.* Эмбриональные стволовые клетки: направленная дифференцировка и возможности терапевтического применения // *Медицинские новости.*— 2006.— №5.— С. 7–13.
8. *Вершигора А.Ю., Пастер С.У., Колибо Д.В.* Імунологія.— Киев.— 2005.— 599 с.
9. *Kent D., Copley M., Benz C., Dykstra B., Bowie M., Eaves C.* Regulation of hematopoietic stem cells by the steel factor / KIT signaling pathway // *Clin. Cancer Res.*— 2008.— Vol.14, №7.— P. 1926–1930.
10. *Ronnstrand L.* Signal transduction via the stem cell factor receptor-Kit // *Cell. Mol. Life Sci.*— 2004.— Vol.61, №19–20.— P. 2535–2548.
11. *Лыло В.В., Манько В.Г., Серебрякова К.В., Лукаш Л.Л.* Экспрессия репаративного фермента O6-алкілгуанін-ДНК алкілтрансферазы в линиях клеток млекопитающих *in vitro* // *Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології.*— 2007.— Т.1.— С. 117–121.

Резюме

Досліджувався вплив цитокинів LIF, IL-3 та SCF на експресію репаративного ензиму O6-алкілгуанін-ДНК алкілтрансферази (MGMT) в культурах клітин людини різного походження. Показано, що дані цитокини здатні спричинити зниження експресії MGMT в клітинах, проте характер впливу LIF дещо різнився від дії IL-3 та SCF.

Исследовалось влияние цитокинов LIF, IL-3 и SCF на экспрессию репаративного энзима O6-алкілгуанін-ДНК алкілтрансферазы (MGMT) в культурах клеток человека различного происхождения. Показано, что данные цитокины способны вызывать снижение экспрессии MGMT в культурах клеток, однако характер влияния LIF несколько отличался от действия IL-2 и SCF.

The influence of cytokines LIF, IL-3 and SCF on O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase (MGMT) repair enzyme expression in human cell cultures with different origin has been studied. These cytokines have been shown to inhibit MGMT expression in cell cultures, but particular qualities of LIF influence something differs from IL and SCF effect.

¹МАЧУЛИНА С.А., ²ФИЛИПЦОВА О.В.

*¹Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина,
Украина, 61077, Харьков, пл. Свободы, 4;*

*²Национальный фармацевтический университет,
Украина, 61002, Харьков, ул. Пушкинская, 53, e-mail: philiptsova@yahoo.com*

ИЗУЧЕНИЕ БРАЧНОЙ АССОРТАТИВНОСТИ ПО ЛИЧНОСТНЫМ ХАРАКТЕРИСТИКАМ ЧЕЛОВЕКА

Для решения ряда социальных и медицинских проблем, возникающих в обществе, необходимо иметь точную информацию о структуре популяции и генетико-демографических процессах, протекающих в них. Одной из важных задач, при изучении структуры популяции, является анализ динамики параметров ее брачной структуры, а также факторов, приводящих к нарушению панмиксии. Одним из таких факторов является положительная ассортативность браков, при которой вероятность формирования брака при сходных фенотипах партнеров выше, чем в случае статистической случайности. В предположении того, что фенотип является прямым или косвенным отражением генотипа, положительная брачная ассортативность ведет к тому, что частоты генотипов из поколения в поколение изменяются, становятся меньше гетерозигот и больше гомозигот. Таким образом, ассортативность браков способствует усилению у потомства количественной выраженности генетических признаков, приводит к подразделенности популяций по этим признакам и имеет последствия аналогичные инбридингу.

Большинство исследований сходится на том, что браки формируются статистически не случайно по таким этнодемографическим характеристикам как: возраст, национальность, место рождения, профессия, уровень образования. Данные характеристики часто сопряжены с генетическими различиями, что может обусловить вторичную ассортативность по фенотипическим признакам. Также брачные предпочтения показаны по многим морфофизиологическим признакам — рост, цвет кожи, глаз, волос [1–4]. Высокая степень ассортативности браков отмечается по личностным характеристикам, прежде всего по уровню интеллекта [5], по антисоциальному поведению [6], алкоголизму [7]. Описана положительная ассортативность браков по психическим заболеваниям, в частности по шизофрении [8], маниакально-депрессивным психозам, а также по состоянию общей тревожности, паническим состояниям и различным фобиям [9].

По литературным данным, изучение брачной ассортативности и ее влияния на брачную структуру популяций проводится во всем мире. Однако, результаты этих исследований не применимы к конкретной популяции, которая отличается этническим составом, степенью урбанизации и другими демографическими показателями, религиозными и культурными особенностями, экономическим положением. В Украине параметры брачной структуры популяций были проанализированы на примере Харькова, Донецка, Полтавы, Киева, малых городов (Шостка, Тростянец, Красноград, Змиев). Поло-

жительная брачная ассортативность была отмечена по этнодемографическим характеристикам: по национальности (максимальные индексы — у представителей этнических меньшинств), по месту рождения, образованию (максимальные индексы — у лиц с высшим и начальным уровнем образования), а так же по большинству профессий (в наибольшей степени у рабочих основного производства и у учащихся) [10–12]. Целью данного исследования является изучение брачной ассортативности по поведенческим признакам в восточно-украинских популяциях (на примере Харькова и Харьковской области).

Материалы и методы

В исследовании приняли участие 74 брачные пары. Сбор информации проведён с учётом этических требований при работе с человеком. Об исследуемых получена биологически значимая и социо-демографическая информация. Изучено 108 поведенческих характеристик, которые были объединены в восемь более узких условных групп: интеллект; агрессивность; темперамент; коммуникативные и организаторские способности; клинически значимые признаки; мотивационное поведение; нейропсихологические признаки; предпочтения. Для изучения указанных признаков были использованы следующие психометрические методики: тест для определения IQ Г. Айзенка [13], модифицированная версия опросника FPI, опросники Спилбергера, Айзенка EPI, Басса-Дарки, Ассингера, Томаса, Б.А. Федоришина КОС [14], М. Снайдера, Меграбяна-Эпштейна, Марлоу-Кроуна, Леонгарда-Шмишека, Стреляу [15], Ивлевой-Щербатых [16], опросник на оценку коммуникативных умений [15], методика оценки пословиц [14], тесты В.Ф. Ряховского [15], Холланда, Лири [14], метод портретных выборов Л. Сонди [17], методика нервно-психической неустойчивости и акцентуаций [15].

Коэффициенты корреляции между супругами вычисляли по соответствующим формулам в зависимости от характера признака. Связь между данными, распределение которых не соответствовало нормальному закону, оценивали методом Спирмена. База данных сформирована в программе Microsoft Excel. Расчеты произведены в программах Microsoft Excel и Biostat.

Результаты и обсуждение

Результаты корреляционного анализа по изученным поведенческим признакам в супружеских парах приведены в таблице. Наличие положительной брачной ассортативности в ряде случаев имеет эволюционную природу. Так, исследование показало высокую положительную корреляцию у супругов по IQ, что соответствует данным литературы. Предполагается, что при эволюции человека подбор брачных пар шел на увеличение интеллектуальности, поскольку это повышало жизнеспособность. В частности, считается, что такие поведенческие черты, как разговорчивость, музицирование, артистичность и юмор возникли для того, чтобы демонстрировать свой уровень интеллекта при ухаживании и, тем самым, привлекать партнера или партнершу [5].

При исследовании корреляции по брачным предпочтениям наибольшая положительная связь была отмечена по доминантности и добросердечию,

Таблица

Значимые коэффициенты корреляции между супругами по поведенческим признакам

Поведенческий признак	n	ρ
<i>Брачные предпочтения (тест Лири)</i>		
Доминантность	56	0,44***
Добросердечие		0,26*
Отзывчивость		0,46***
<i>Темперамент (по Айзенку)</i>		
Нейротизм	60	0,33**
<i>Личностные характеристики (по опроснику FPI)</i>		
Невротичность	54	0,39**
Депрессивность		0,42***
Раздражительность		0,29*
<i>Агрессивность (по Басса-Дарки)</i>		
Обида	61	0,26*
Вербальная агрессия		0,41***
Общая агрессия (по Ассингеру)	59	0,26*
<i>Стратегии разрешения конфликтных ситуаций (пословицы)</i>		
“Акула”	51	0,39**
“Медвежонок”		0,42**
“Сова”		0,38**
<i>Профессиональные склонности (по Холланду)</i>		
Реалистический	62	0,38**
Артистический		0,29*
<i>Коммуникативные и организаторские способности</i>		
Компетентность (раздражительность) в общении	63	0,52***
Коммуникативные способности (по Ряховскому)	61	0,35**
Мотивационное поведение: мотивация достижения	66	0,30**
<i>Акцентуации (по Леонгарду)</i>		
Циклотомия	65	0,28*
Неуравновешенность		0,30**
Интеллектуальные способности: IQ	54	0,40**
<i>Эмоциональные состояния страха</i>		
Развитие психических расстройств	38	0,41**
Болезнь близких		0,35*
Совершение самоубийства		0,43**
<i>Портретные предпочтения (по Сонди)</i>		
Истерия	40	0,36*
Маниакальность		0,36*

Примечание. n — число обследованных, ρ — коэффициент корреляции Спирмена.

несколько умеренная по отзывчивости. Высокая положительная корреляция также отмечалась по депрессивности. По антисоциальному поведению также существует положительная брачная ассортативность. По некоторым данным, в семьях, в которых и у мужа и у жены проявлялось антисоциальное поведение, рождается больше детей, чем в среднем в популяции [18]. Неслучайный подбор супругов приводит к подразделённости популяции по антисоциальному поведению, в результате чего, гены, сопряжённые с определённым фенотипом, концентрируются в однотипных семьях. Наиболее высокий коэффициент корреляции между супругами был отмечен в отношении компетентности в общении, который составил $\rho=0,52$.

В генетических исследованиях наличие брачной ассортативности в числе прочего учитывается при модификации коэффициенты корреляции в родственных парах по признакам, для которых были обнаружены значимые коэффициенты корреляции в супружеских парах. Для ряда признаков наличие высокой положительной связи между супругами может искусственно значительно завышать коэффициенты корреляции у родственников.

Выводы

В выборке восточно-украинского населения (в популяции Харькова и Харьковской области) обнаружена положительная брачная ассортативность по брачным предпочтениям, темпераменту, личностным характеристикам, агрессивности, стратегии разрешения конфликтных ситуаций, профессиональным склонностям, коммуникативным и организаторским способностям, мотивационному поведению, акцентуациям, уровню IQ, эмоциональным состояниям страха и портретным предпочтениям.

Литература

1. *Nakosteen R.A.* Men, money, and marriage: are high earners more prone than low earners to marry? / R.A. Nakosteen, M.A. Zimmer // *Social Science Quarterly*.— 1997.— Vol.78, N1.— P. 66–82.
2. *Raley R.K.* A shortage of marriageable men? A note on the role of cohabitation in black-white differences in marriage rates / R.K. Raley // *American Sociological Review*.— 1996.— Vol. 61, N6.— P. 973–983.
3. *Abdelrahman A.I.* Education and assortative marriage in northern and urban Sudan: 1945–79 / A.I. Abdelrahman // *J. Biosoc. Sci.*— 1994.— Vol.26, N3.— P. 341–348.
4. Assortative mating for relative weight: genetic implications / D.B. Allison, M.C. Neale, M.I. Kezis, [et al.] // *Behav. Genet.*— 1996.— Vol. 26, N2.— P. 103–111.
5. Cytogenetic abnormalities on chromosome 18 associated with bipolar affective disorder or schizophrenia / O. Mors, H. Ewald, D. Blackwood, W. Muir // *Br. J. Psychiatry*.— 1997.— N170.— P. 278–280.
6. The concentration of offenders in families, and family criminality in the prediction of boys' delinquency / D.P. Farrington, D. Jolliffe, R. Loeber [et al.] // *J. Adolescence*.— 2001.— Vol.24.— P. 579–596.
7. *Miller G.* Sexual selection for indicators of intelligence / G. Miller // *Novartis Found. Symp.*— 2000.— N233.— P. 60–280.
8. *Caspi A.* Marital assortment and phenotypic convergence: longitudinal evidence / A. Caspi, E.S. Herbener // *Soc. Biol.*— 1993.— N40(1–2).— P. 48–60.

9. Guze S.B. A psychiatric study of the wives of convicted felons: An example of assortative mating / S.B. Guze // *American Journal of Psychiatry*.— 1970.— Vol.126.— P. 115–118.

10. Філіпцова О.В. Генетико-демографічні процеси в урбанізованих популяціях Східної України: автореф. дис. на здобуття ступ. канд. біол. наук.: спец. 03.00.15 “Генетика”.— Харків, 1998.— 16 с.

11. Вилькер А.Л. Генетико-демографические процессы в популяциях малых городов и сел Восточной Украины. Автореф. дис. ... канд. биол. наук / А.Л. Вилькер.— Х., 2001.— 14 с.

12. Тимченко О.И. Динамика брачной структуры населения трех городов Украины в период с 1960 по 1992 г. / О.И. Тимченко, Э.М. Омельченко, Е.Т. Микула // *Генетика*.— 2000.— Т.36, №4.— С. 545–551.

13. Айзенк Г. Супертесты IQ / Ганс Айзенк.— М.: Изд-во ЭКСМО-Пресс, 2002.— 208 с.

14. Практикум по общей, экспериментальной и прикладной психологии: учеб. пособие / [сост. В.Д. Балин, В.К. Гайда, В.К. Гербачевский и др.; ред. А.А. Крылов, С.А. Маничев].— СПб: Изд-во “Питер”, 2000.— 560 с.

15. Психологические тесты: в 2 т. / [ред. А.А. Карелин].— М.: Гуманит. изд. центр ВЛАДОС, 2002.— Т.1.— 312 с.

16. Щербатых Ю.В. Психофизиологические и клинические аспекты страха, тревоги и фобий / Ю.В. Щербатых, Е.И. Ивлева.— Воронеж: Исток, 2002.— 282 с.

17. Собчик Л.Н. Модифицированная методика Сонди. Тест восьми влечений. Серия: практикум по психодиагностике / Л.Н. Собчик.— СПб.: изд-во “Речь”, 2003.— 176 с.

18. Assortative mating for antisocial behaviour: development and methodological implications / R.F. Kreuger, T.E. Moffitt, A. Caspi [et al.] // *Behav. Genet*.— 1998.— Vol.28.— P. 173–186.

Резюме

В выборке восточно-украинского населения (в популяции Харькова и Харьковской области) изучена структура брачных пар по поведенческим признакам. Обнаружена положительная брачная ассортативность по брачным предпочтениям, темпераменту, личностным характеристикам, агрессивности, стратегии разрешения конфликтных ситуаций, профессиональным склонностям, коммуникативным и организаторским способностям, мотивационному поведению, акцентуациям, уровню IQ, эмоциональным состояниям страха и портретным предпочтениям.

У вибірці східноукраїнського населення (в популяції Харкова та Харківської області) вивчено структуру шлюбних пар за поведінковими ознаками. Знайдено позитивну шлюбну сполученість за шлюбними перевагами, темпераментом, особистісним характеристикам, агресивності, стратегії вирішення конфліктних ситуацій, професійним схильностям, комунікативним та організаторським здібностям, мотиваційною поведінкою, акцентуаціям, рівнем IQ, емоційними станами страху та портретними перевагами.

Marital structure on behavior traits was studied in the Eastern Ukrainian population sample (in Kharkov and Kharkov region). Positive assortative mating was found on mate preferences, temperament, personality traits, aggression, conflict situation strategy decision, vocational interests, communicative and organizational abilities, motivation behavior, accentuations, IQ level, emotional states of fear and portrait preferences.

ПАВЛОВИЧ С.А.

*Киевский национальный университет имени Т.Г. Шевченко
Украина, 01601, Киев, пр. академика Глушкова, 2, корпус 12,
e-mail: sapavlovich@gmail.com.*

ПОПУЛЯЦИОННОЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ЛИЧНОСТНЫХ ХАРАКТЕРИСТИК ЖИТЕЛЕЙ ЦЕНТРАЛЬНОЙ УКРАИНЫ И АНАЛИЗ ЭФФЕКТА ЭТНИЧЕСКОЙ ЭНДО-ЭКЗОГАМИИ

Признаки, с которыми имеет дело генетик, различны по своей природе и выраженности. Изучение внутривнутрипопуляционной изменчивости поведенческих признаков является важной составляющей генетического анализа. На этом этапе происходит исследование характера распределения признаков, в том числе выяснение их зависимости от возраста и пола [1]. В генетическом анализе принято разделять признаки на альтернативные, непрерывные, квазинепрерывные и квазиальтернативные. К альтернативным признакам относятся признаки дискретного характера, а генетическая основа этих признаков также имеет альтернативную природу. К непрерывным признакам относят те, которые можно выразить количественно, а наследственная основа этих признаков представляет собой систему полигенов. Примером квазинепрерывных признаков могут служить хронические заболевания, в том числе, и психические. Фенотипически эти признаки проявляются как альтернативные. Предполагается, что генетической основой этих признаков является система полигенов. Считается, что гены, ответственные за признак, имеются у некоторой части, а может быть и у всех представителей популяции, но проявляется признак только у отдельных лиц — у которых в генотипе присутствует определенное (пороговое) количество этих генов. Такие признаки еще называют мультифакториальными и пороговыми. Квазиальтернативные признаки — это признаки, с непрерывной количественной выраженностью, но альтернативной генетической основой. Примером такого признака может быть уровень интеллекта, выраженный в баллах IQ, у индивидов с нормальным хромосомным набором и у больных с синдромом Дауна [2]. Предварительное выяснение характера распределения признака необходимо для выбора адекватных методов последующего компонентного анализа и разложения фенотипической дисперсии на генетическую и средовую составляющие. Признаки, которые выявляют связь с возрастом, в дальнейшем нормируются для определенного возрастного диапазона, а признаки, для которых установлен половой диморфизм, также анализируются отдельно у мужчин и женщин [1]. Внутривнутрипопуляционная изменчивость может зависеть от брачной структуры и различаться у потомков, происходящих от браков разной степени эндоэзогамии, в том числе, этнической.

Популяционно-генетический анализ украинского населения по самым разнообразным поведенческим признакам был инициирован харьковскими генетиками на примере восточно-украинской популяции (преимущественно Харьков и Харьковская область) [3]. Целью настоящей работы является ана-

лиз популяционных распределений ряда поведенческих признаков в популяции центральной Украины (преимущественно Киева и Киевской области), а также изучение роли этнической эндо-экзогамии в их проявлении.

Материалы и методы

В исследованиях приняли участие 197 жителей центральной Украины, преимущественно Киева и Киевской области. Младшему участнику исследования было 15 лет, старшему — 51 год. В текущий анализ были включены представители младшего поколения ($n=173$), граничный возраст которых составил 35 лет, 54 мужчины и 119 женщин соответственно. Сбор генеалогической и психометрической информации проведен с учетом этических требований. Оценка 12 личностных характеристик (невротичность, спонтанная агрессивность, депрессивность, раздражительность, общительность, уравновешенность, реактивная агрессивность, застенчивость, открытость, экстраверсия — интроверсия, эмоциональная лабильность, маскулинизм — феминизм) проведена по модифицированной версии методики FPI [4]. Вычислены характеристики распределений. Статистический анализ проведен с использованием критерия Стюдента t [5]. База данных сформирована в программе Microsoft Excel. Расчеты произведены в программах Microsoft Excel и Statistica v.6.

Результаты и обсуждение

Популяционные распределения личностных характеристик модифицированной версии опросника FPI представлены в таблице. По большинству признаков получен характер распределения, не соответствующий закону Гаусса. Как у мужчин, так и у женщин, большинство признаков имеют отрицательную асимметрию и отрицательный эксцесс. По асимметрии и у мужчин и у женщин исключение составили общительность, уравновешенность, экстраверсия-интроверсия и маскулинизм-феминизм, по эксцессу — общительность у мужчин и застенчивость у женщин. Ни по одному признаку в младшем поколении не обнаружено значимого полового диморфизма, что отличает центрально-украинскую популяцию от восточно-украинской [3], в которой по указанным признакам имеются выраженные половые различия. По-видимому, эти данные можно рассматривать как предварительные, поскольку по ряду признаков различия между мужчинами и женщинами выражены на уровне тенденций (например, по открытости и маскулинизму-феминизму), которые могут перейти в категорию значимых при последующем расширении выборки.

Изучение потомства от браков разной степени этнической эндо-экзогамии важно при прогнозе реагирования признаков на изменение брачной структуры. Поэтому, в настоящем исследовании были проанализированы поведенческие признаки у потомков умеренной и повышенной этнической экзогамии. К потомкам с умеренной этнической экзогамией были отнесены лица, происходящие от внутринациональных славянских браков (русско-русские или украинско-украинские), к потомкам с повышенной этнической экзогамией — соответственно те, чьи родители были представителями раз-

Популяционное распределение личностных характеристик модифицированной версии опросника FPI

Группы	Статистические показатели													
	n	\bar{x}	Me	Mo	min	max	Q ₂₅	Q ₇₅	s	S _K	As	s _{AS}	Ex	s _{EX}
	Мужчины													
1. Невроличность	52	5,2	5,0	4,0	1,0	9,0	4,0	7,0	2,2	0,3	-0,5	0,3	-0,2	0,7
2. Спонтанная агрессивность	52	5,7	5,0	8,0	1,0	9,0	4,0	8,0	2,2	0,3	-0,3	0,3	-0,7	0,7
3. Депрессивность	52	5,1	6,0	6,0	1,0	9,0	3,0	7,0	2,4	0,3	-0,5	0,3	-0,9	0,7
4. Раздражительность	52	5,8	6,0	8,0	1,0	9,0	4,5	8,0	2,2	0,3	-0,7	0,3	-0,3	0,7
5. Общительность	52	4,5	4,0	4,0	1,0	9,0	3,5	5,5	1,9	0,3	0,3	0,3	0,0	0,7
6. Уравновешенность	52	5,3	5,0	6,0	1,0	9,0	3,0	7,0	2,2	0,3	0,0	0,3	-1,0	0,7
7. Реактивная агрессивность	52	6,0	6,0	9,0	1,0	9,0	4,0	8,0	2,4	0,3	-0,3	0,3	-0,8	0,7
8. Застенчивость	52	5,6	6,0	6,0	1,0	9,0	5,0	7,0	2,2	0,3	-0,4	0,3	-0,1	0,7
9. Открытость	52	7,0	8,0	8,0	3,0	9,0	5,0	8,0	1,8	0,3	-0,7	0,3	-0,8	0,7
10. Экстраверсия—интроверсия	52	5,6	6,0	6,0	2,0	9,0	4,0	6,5	1,9	0,3	0,1	0,3	-0,7	0,7
11. Эмоциональная лабильность	52	5,3	6,0	7,0	1,0	8,0	4,0	7,0	2,1	0,3	-0,5	0,3	-0,9	0,7
12. Маскулизм—феминизм	52	5,2	5,0	5,0	1,0	9,0	4,0	6,0	2,2	0,3	0,0	0,3	-0,6	0,7
	Женщины													
1. Невроличность	119	5,8	6,0	8,0	1,0	9,0	4,0	8,0	2,1	0,2	-0,5	0,2	-0,3	0,4
2. Спонтанная агрессивность	119	5,4	5,0	5,0	1,0	9,0	4,0	7,0	2,1	0,2	-0,3	0,2	-0,6	0,4
3. Депрессивность	119	5,5	6,0	7,0	1,0	9,0	4,0	7,0	1,9	0,2	-0,3	0,2	-0,4	0,4
4. Раздражительность	119	6,1	6,0	8,0	1,0	9,0	4,0	8,0	1,9	0,2	-0,5	0,2	-0,4	0,4
5. Общительность	119	4,4	4,0	4,0	1,0	9,0	3,0	6,0	2,0	0,2	0,4	0,2	-0,5	0,4
6. Уравновешенность	119	5,2	5,0	5,0	1,0	9,0	4,0	6,0	2,1	0,2	0,1	0,2	-0,8	0,4
7. Реактивная агрессивность	119	5,8	6,0	5,0	1,0	9,0	4,0	8,0	2,0	0,2	-0,3	0,2	-0,6	0,4
8. Застенчивость	119	5,7	6,0	6,0	1,0	9,0	5,0	7,0	2,1	0,2	-0,6	0,2	0,1	0,4
9. Открытость	119	6,5	6,0	8,0	2,0	9,0	5,0	8,0	1,9	0,2	-0,4	0,2	-0,9	0,4
10. Экстраверсия—интроверсия	119	5,3	6,0	6,0	1,0	9,0	4,0	6,0	1,7	0,2	0,0	0,2	-0,7	0,4
11. Эмоциональная лабильность	119	5,7	6,0	4,0	2,0	9,0	4,0	7,0	1,8	0,2	-0,1	0,2	-1,1	0,4
12. Маскулизм—феминизм	119	4,6	5,0	5,0	1,0	9,0	3,0	6,0	2,2	0,2	0,1	0,2	-0,8	0,4

Примечание. n — число обследованных, \bar{x} — среднее арифметическое, Me — медиана, Mo — мода, min — минимальное значение, max — максимальное значение, Q₂₅ — нижний квартиль, Q₇₅ — верхний квартиль, s — стандартное отклонение, s_K — ошибка среднего арифметического, As — асимметрия, s_{AS} — ошибка асимметрии, Ex — эксцесс, s_{EX} — ошибка эксцесса.

ных славянских национальностей. Такое разделение правомочно, т.к. молекулярно-генетические исследования показали наличие генетических различий даже у близких славянских народов, проживающих раздельно [6]. В настоящем исследовании была обнаружена связь брачной структуры по этническому признаку у женщин для трех поведенческих признаков — открытости, эмоциональной лабильности и маскулинизма-феминизма. Так, у женщин более эндогамного происхождения по сравнению с женщинами более экзогамного происхождения выше уровень открытости ($\bar{x}=6,6$, $s=1,9$ и $\bar{x}=5,3$, $s=1,8$ баллов соответственно, $p<0,01$) и уровень эмоциональной лабильности ($\bar{x}=5,8$, $s=1,8$ и $\bar{x}=4,9$, $s=1,6$ баллов соответственно, $p<0,05$), но ниже уровень маскулинизма-феминизма ($\bar{x}=4,2$, $s=2,3$ и $\bar{x}=6,1$, $s=2,3$ баллов соответственно, $p<0,01$). У мужчин связи типа брака родителей с проявлением поведенческих признаков обнаружено не было ни по одному из изученных признаков. Для сравнения можно указать, что в восточно-украинских популяциях устойчивой и у сыновей и у дочерей была связь этнической эндо-экзогамии с уровнем IQ [3].

Выводы

1. Оценка популяционной изменчивости 12 личностных признаков человека на основе модифицированной версии опросника FPI показала, что по большинству из них в выборке популяции центральной Украины (на примере Киева и Киевской области) получены распределения, не соответствующие закону Гаусса, и характеризующиеся отрицательной асимметрией и отрицательным эксцессом.

2. По изученным признакам не установлено статистически значимого полового диморфизма.

3. Эффект этнической эндо-экзогамии был обнаружен для дочерей по признаку открытости, эмоциональной лабильности и маскулинизма-феминизма.

Литература

1. *Фалконер Д.С.* Введение в генетику количественных признаков / Д.С. Фалконер, пер. с англ. А.Г. Креславского и В.Г. Черданцева.— М.: ВО “Агропромиздат”, 1985.— 486 с.
2. *Атраментова Л.А.* Введение в психогенетику: Учебное пособие, 3-е изд. / Л.А. Атраментова, О.В. Филиппова // Москва: МСПИ, “Флинта”, 2008.— 472 с.
3. *Филиппова О.В.* Популяционно-генетический анализ поведенческих признаков: опыт изучения населения Украины / О.В. Филиппова.— Дисс. на соиск. учен. степ. докт. биол. наук.— Киев, 2009.— 340 с.
4. Практикум по общей, экспериментальной и прикладной психологии: учеб. пособие / [сост. В.Д. Балин, В.К. Гайда, В.К. Гербачевский и др.; ред. А.А. Крылов, С.А. Маничев].— СПб: Изд-во “Питер”, 2000.— 560 с.
5. *Лакин Г.Ф.* Биометрия: Учеб. пособие для биол. спец. вузов.— 4-е изд., перераб. и доп.— М.: Высш. шк., 1990.— 352 с.
6. *Кравченко С.А.* Дослідження мікросателітних локусів Y-хромосоми серед населення слов'янського походження з України та Росії / С.А. Кравченко, С.А. Лимборська, Л.А. Лівшиць // Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології. Збірн. наук. праць. Т.1.— К.: Логос, 2007.— С. 460–462.

Резюме

Впервые в популяции центральной Украины проведены популяционные исследования 12 личностных признаков, оцененных по модифицированной версии опросника FPI. Характер распределения большинства признаков не соответствует закону Гаусса, а характеризуется отрицательной асимметрией и отрицательным эксцессом. У представителей младшего поколения по изученным поведенческим признакам не выявлено статистически значимого полового диморфизма. У дочерей, но не у сыновей, обнаружено влияние типа брака родителей по этническому признаку на выраженность открытости, эмоциональной лабильности и маскулинизма-феминизма.

Вперше в популяції центральної України проведено популяційні дослідження 12 особистісних ознак, оцінених за модифікованою версією опитувальника FPI. Характер розподілу більшості ознак не відповідає закону Гауса, а характеризується негативною асиметрією та негативним ексцесом. У представників молодшого покоління за вивченими поведінковими ознаками не знайдено статистично значущого статевого диморфізму. У дочок, але не у синів, знайдено вплив типу шлюбу батьків за етнічною ознакою на вираженість відкритості, емоційної лабільності та маскулінізму-фемінізму.

For the first time population research on 12 personality traits evaluated by modified version of FPI questionnaire was conducted in the central Ukraine population. Distribution characteristics of majority traits were not in accordance with Gaussian law and were characterized by negative asymmetry and negative excess. There was no statistically significant sex dimorphism in members of younger generation. In daughters, but not in sons, there was found a parental ethnicity effect in marriage on openness, emotional stability and masculinity-femininity.

ПШЕНЬ О.О.¹, МАЦЕВИЧ Л.Л.¹, КОСТЕЦЬКИЙ І.С.¹, РЕДІС Г.², ЛУКАШ Л.Л.¹.

¹Институту молекулярної біології та генетики НАН України, Україна, 03143, Київ, вул. Заболотного, 150, E-mail: igorka@imb.org.ua

²Медичний коледж Джефферсон, Філадельфія, США, e-mail: glenn.radice@jefferson.edu

РОЛЬ N-КАДЕРИН/КАТЕНІНОВОГО КОМПЛЕКСУ У КАРДІОГЕНЕЗІ ССАВЦІВ

Структурна цілісність серця забезпечується інтеркалярними дисками, які мають у своєму складі різні з'єднувальні комплекси: адгеринові з'єднання, десмосоми і гар-з'єднання. Найбільш поширений тип міжклітинної адгезії — це адгезія, котра забезпечується кадерин/катеніновим комплексом [1]. У серці кадери́ни представлені виключно N-кадери́ном [2]. Сімейство катенінів включає в себе α -, β - і γ -катеніни, які забезпечують зв'язок кадери́нів та актинового цитоскелету клітини. Кадери́ни разом з катені́нами є структурними ланками адгезивного комплексу (рис. 1).

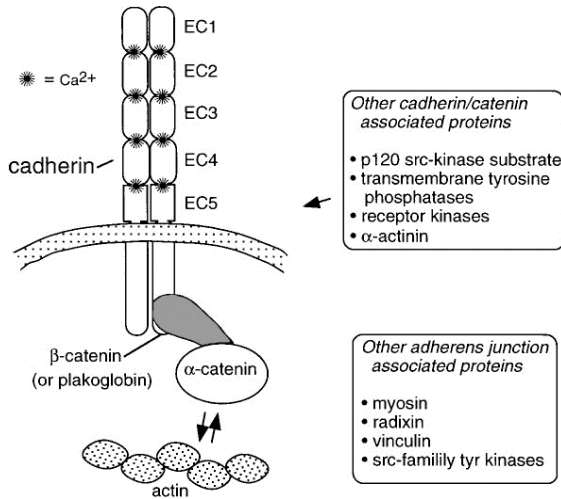


Рис. 1. Кадерин-катеніновий комплекс та асоційовані з ним білки. Кадерин — трансмембранний білок, екстрацелюлярний домен якого складається з п'яти кадеринових повторів, EC1-EC5.

Цитоплазматичний хвіст білку зв'язується з β-катеніном, який у свою чергу взаємодіє з α-катеніном, формуючи стабільний білковий комплекс. β-катенін забезпечує зв'язок з актиновим цитоскелетом. Білки, що асоційовані з кадерином — катеніновим комплексом (верхній блок). Інші білки, що концентруються у місцях адгеринових зв'язків (нижній блок), але їх відношення до кадерином — катенінового комплексу невідоме. За матеріалами: Alpha S. Yap and all Molecular and Functional Analysis of Cadherin-Based Adherens Junctions // Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 1997. 13:119–46

Порушення адгезивного комплексу у серці призводять до розвитку серцевих аритмій та інших патологій, так було показано, що делеція N-кадеринову у дорослому серці призводить до яскраво вираженої тахікардії шлуночка, внаслідок якої наступала смертність піддослідних мишей [3]. Делеція гену β-катеніну у дорослому серці мишей, згідно результатам, що були отримані групою Figain Li, не призводила до летального ефекту, більш того мутантні тварини не відрізнялись від нормальних ні за фізіологічними, ні за морфологічними ознаками. Імунологічні дослідження показали, що за умов делеції гену β-катеніну відбувалось підвищення рівня експресії гену плакоглобіну (γ-катенін) [4]. Як відомо, плакоглобін приймає участь у формуванні десмосом та адгеринових з'єднань і має високу ступінь гомології до β-катеніну, і за припущеннями авторів здатен функціонально замінити останній.

Результати, отримані іншою групою дослідників [6,7], показали, що делеція α- або β-катеніну в дорослому міокарді у ранні строки спостережень дійсно не призводила до смертності тварин, здебільшого нокаутні тварини мали нормальний фенотип, і лише у віддалені після делеції строки (32 тижні)

автори спостерігали морфологічні зміни тканини міокарду: витончення стінок серця, що призводило до кардіоміопатії серця.

Наведені експериментальні дані підтверджують важливість міжклітинних з'єднань у підтриманні нормальної функції дорослого серця. У своїй роботі ми вирішили зосередитись на дослідженні ролі білків кадєрин-катєнінового комплексу у ембріогенезі серця, а саме, дослідити значення α Е-катєніну та β -катєніну у ембріональному розвитку серцево-судинної системи ссавців.

Матеріали та методи

Для дослідження ролі α Е-катєніну або β -катєніну використовували модельних мишей з умовним нокаутом аСАТ СКО та бСАТ СКО, відповідно (Jackson Lab, USA). У результаті схрещувань таких мишей з трансгенними тваринами (генотип аМНС-Cre (Ni), California, USA), котрі в кардіоміоцитах експресують не індуквану Cre рекомбіназу, ми отримували мутантний фенотип флор/флор, NiCre, де відбувалась делеція гену-мішені. Варто зауважити, що у своїй роботі ми застосували модель трансгенних тварин, де рекомбіназа знаходиться під регуляцією аМНС промотору, який експресується виключно в серці починаючи з 6–6,5 доби гістації, саме тоді, коли починається формування області ембріонального серця. Цей промотор досить добре вивчений та широко застосовується при проведенні подібних досліджень. Таким чином, ми могли аналізувати морфологічні та імунологічні особливості тканини серця на різних термінах ембріогенезу за умови делеції α Е-катєніну або β -катєніну. У дослідженнях використовували ембріони віком 10,5, 12,5 та 14,5 діб а також новонароджених тварин.

Всі молекулярно-біологічні процедури (виділення ДНК, ПЛР) проводили згідно зі стандартними протоколами [8].

Імунофлуоресцентний аналіз, гістологія та електронна мікроскопія

На визначеному терміні вагітності дослідних тварин забивали та оперували, амніон використовували для генотипування ембріону, а ембріони фіксували у розчині 4% параформальдегіду. Після фіксації проводили дегідратацію дослідного матеріалу, готували парафінові блоки згідно стандартної процедури [9] і на мікротомі готували зрізи зразків товщиною 6 мкм. Інкубацію з первинними антитілами проводили у концентрації, рекомендованій виробником (розведення 1:200–1:1000). Після відмивання додавали відповідні вторинні антитіла (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, USA), мічені флуоресцентним барвником (Cy3). Аналіз забарвлення і фотографування проводили на флуоресцентному (Nikon, Japan) або конфокальному мікроскопі. Для гістологічного аналізу дослідного матеріалу зрізи серця фарбували розчином гематоксиліну та еозину і аналізували під світловим мікроскопом (збільшення $\times 40$).

Результати та обговорення

Морфологічні дослідження ембріонів терміном гістації E10,5 діб, 12,5 та 14,5 діб показали, що ембріони з делецією α Е- або β -катєніну суттєво не відрізнялись від контрольних зразків відповідного терміну гістації (рис. 2).

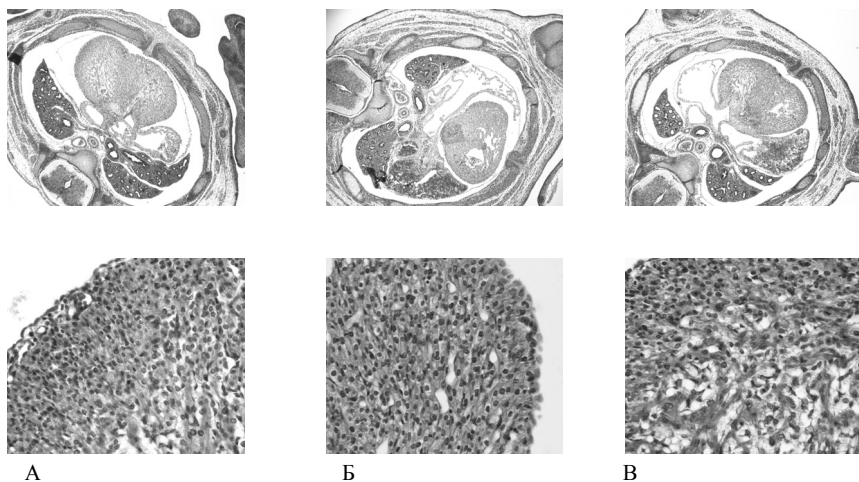


Рис. 2. Порівняльний морфологічний аналіз зрізів серця контрольного ембріону (А); ембріону з делецією гену αE -катеніну (Б) та ембріону з делецією гену β -катеніну (В). Аналіз проведено з використанням ембріонів віком 14,5 діб (E14,5), (забарвлення гематоксилін-еозином)

При порівняльному аналізі ембріонів не спостерігали виражених вад розвитку серцево-судинної системи, витончень стінок серця чи порушень формування міжклітинних зв'язків (рис. 2).

Імуногістохімічні дослідження зрізів тканини ембріонального серця показали, що делеція αE -катеніну у тканині ембріонального серця не впливала на рівень експресії та розподіл N-кадєрину у тканині порівняно з контролем. У той же час, спостерігали підвищення рівня експресії αT -катеніну відносно контрольних зразків, що дає змогу висунути припущення про здатність останнього функціонально компенсувати делетований αE -катенін як у дорослому, так і у ембріональному міокарді.

Делеція гену β -катеніну у ембріональному серці також не впливала на рівень експресії N-кадєрину, можливо, що під час ембріонального розвитку адгєринові зв'язки кардіоваскулярної системи можуть формуватися за рахунок функціональної компенсації між β -катеніном та плакоглобіном (або γ -катеніном).

Аналіз співвідношення генотипів новонароджених мишей (табл.) показав, що делеція гену αE -катеніну не впливала на життєздатність новонароджених тварин: так ми спостерігали 20% тварин гомозиготних за нокаутом гену αE -катеніну (генотип cre+, Nflox/Nflox) та 20% тварин гетеризиготних за нокаутом гену αE -катеніну (cre+, Nflox/-), що є досить близьким до Менделівського розщеплення генів. На відміну від попереднього спостереження, аналіз новонароджених тварин з делецією β -катеніну показав, що нокаут цього гену негативно впливає на життєздатність новонароджених тварин,

Генетичний аналіз ембріонів та новонароджених тварин

№ п/п	Досліджуваний ген	Термін гістації	Контрольні ембріони		Ембріони з делецією гену	
			кількість	відсоток, %	кількість	відсоток, %
1	α Е-катенін	E10.5	19	79	5	21
2		E14.5	26	76	8	24
3		новонароджені	12	80	3	20
4	β -катенін	E10.5	36	80	9	20
5		E14.5	33	82	7 (3 [#])	18 (8 [#])
6		новонароджені	27 (1 [#])	90 (3 [#])	3 (1 [#])	10 (3 [#])

Примітка: () — аномальні ембріони/тварини, # — мертві ембріони/тварини.

та ембріонів: так лише 10% тварин народжувалось з генотипом cre+, Nflox/Nflox і 3% з цих тварин були мертвнонародженими, відсоток тварин гетерозиготних за нокаутом β -катеніну (cre+, Nflox/-) становив 20%, з них 3% — були мертвнонародженими. Тож, ми припускаємо, що делеція гену β -катеніну негативно впливає на життєздатність новонароджених мишей як у гомозиготному, так і гетерозиготному стані. А тварини з мутантним генотипом cre+, β -cat flox / flox елімують ще у ембріогенезі, так ми показали, що така елімінація відбувається десь посередині ембріонального розвитку до 14,5 доби.

Висновки

Порушення адгеринових з'єднань у тканині ембріонального серця, а саме делеція цитоплазматичних партнерів N-кадерину (α Е-катеніну або β -катеніну) не призводить до вад розвитку серцево-судинної системи на ранніх термінах гістації, можливо, завдяки функціональній компенсації іншими представниками родини катенінів (α Т-катеніном та γ -катеніном відповідно). Однак, делеція β -катеніну у ембріональному серці негативно впливає на життєздатність ембріонів та новонароджених тварин.

Література

1. *Takeichi M.* Morphogenetic roles of classic cadherins // *Curr Opin Cell Biol.*— 1995.— №17.— P. 619–627.
2. *Lilien J., Balsamo J., Arregui C., Xu G.* Turn-off, drop-out: functional state switching of cadherins // *Dev Dyn.*— 2002.— Vol.224.— P. 18–29.
3. *Igor Kostetskii, Lifen Li, Yanming Xiong, Rong Zhou, Victor A. Ferrari, Vickas V. Patel, Jeffery D. Molkentin, Glenn L. Radice.* Induced Deletion of the N-Cadherin Gene in the Heart Leads to Dissolution of the Intercalated Disc Structure // *Circulation Research.*— 2005.— №18.— P. 1–9.
4. *Jibin Zhou, Jiexiang Qu, Xian Ping Yi, Kelly Graber, Lu Huber, Xuejun Wang, A. Martin Gerdes, and Faqian Li.* Upregulation of g-catenin compensates for the loss of β -catenin in adult cardiomyocytes // *Am J. Physiol Heart Circ Physiol.*— 2007.— Vol.292.— P.270–276.

5. McKoy G., Protonotarios N., Crosby A., Tsatsopoulou A., Anastasakis A., Coonar A., Norman M., Baboonian C., Jeffery S., McKenna W.J. Identification of a deletion in plakoglobin in arrhythmic right ventricular cardiomyopathy with palmoplantar keratoderma and woolly hair (Naxos disease) // *Lancet*.— 2000.— Vol.355.— P. 2119–2124.

6. Xin Chen, Sergei P. Shevtsov, Eileen Hsich, and other. The Catenin / T-cell Factor / Lymphocyte Enhancer Factor Signaling Pathway Is Required for Normal and Stress-Induced Cardiac Hypertrophy.// *Mol. And Cell. Biology*.— 2006.— Vol.26.— №12.— P. 4462–4473.

7. Farah Sheikh, Yinghong Chen, Xingqun Liang, Alain Hirschy, Antine E. Stenbit and other. α E-Catenin Inactivation Disrupts the Cardiomyocyte Adherens Junction, resulting in Cardiomyopathy and Susceptibility to Wall Rupture // *Circulation*.— 2006.— Vol.114.— P. 1–10.

8. Maniatis G. *Molecular cloning*.— Oxford press.— 1994.— Vol.1.— 842 p.

9. Kaufman M.H. *The Atlas of Mouse Development*.— San Diego: Academic Press.— 1992.— 523 p.

Резюме

Делеція α E-катеніну та β -катеніну у тканині серця не призводила до розвитку морфологічних дефектів ембріонального серця, вірогідно, завдяки функціональній компенсації α T-катеніном та γ -катеніном (плакоглобіном) відповідно. Спостерігали часткову летальність мутантних ембріонів з делецією β -катеніну на більш пізніх термінах ембріонального розвитку.

Делеция α E-катенина и β -катенина в ткани серца не приводит к развитию морфологических дефектов эмбрионального сердца, вероятно, благодаря функциональной компенсации α T-катенином и γ -катенином (плакоглобином) соответственно. Наблюдалась частичная летальность мутантных эмбрионов с делецией β -катенина на более позднем этапе эмбрионального развития.

The cardiac-specific deletion of α E-catenin and β -catenin did not cause morphological defects in the embryonic heart presumably due to compensation by α T-catenin and γ -catenin (plakoglobin), respectively. However, β -catenin mutant embryos did exhibit a cardiac defect later in development resulting in partial lethality.

ПОЛТАВСКАЯ О.А.¹, ЗЕЛЕНАЯ Л.Б.¹, КОВАЛЕНКО Н.К.¹, ШАТИЛО В.Б.²

¹Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины, Украина, 03680, Киев, ул. Заболотного, 154, e-mail: poltavaska@ukr.net

²ГУ “Институт геронтологии АМН Украины”, Украина, 04114, Киев, ул. Вышгородская, 67

ВИДОВОЕ РАЗНООБРАЗИЕ БИФИДОБАКТЕРИЙ ПИЩЕВАРИТЕЛЬНОГО ТРАКТА ЛЮДЕЙ ПОЖИЛОГО ВОЗРАСТА

Род *Bifidobacterium* — один из наиболее многочисленных родов микроорганизмов желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) человека [7]. Бифидобактерии играют существенную роль в поддержании общего физиологи-

ческого статуса организма человека: участвуют в усвоении нутриентов, которые не усваиваются макроорганизмом, продуцируют аминокислоты, витамины, участвуют в формировании и функционировании иммунной системы макроорганизма, препятствуют колонизации кишечного тракта патогенными микроорганизмами [1, 2]. Бифидобактерии являются представителями нормальной микрофлоры, их количественный и видовой состав служит показателем стабильности микробиоценоза пищеварительного тракта человека [3]. В этом плане, присутствие разных видов бифидобактерий в кишечнике человека представляет большой интерес. Ранее было показано, что наиболее распространенными видами бифидобактерий в кишечнике взрослых людей являются виды *B. adolescentis* и *B. longum*, у детей — *B. infantis* и *B. breve* [5]. В то же время, данные по изучению бифидофлоры лиц пожилого и старческого возраста, и особенно — её видового разнообразия, крайне ограничены.

Классические микробиологические методы, включая выделение, идентификацию и количественный учет этих микроорганизмов, являются длительными и трудоемкими. Кроме того, эти методы имеют низкую степень воспроизведения, связанную с различными условиями культивирования бифидобактерий в разных лабораториях, а также с нередкими вариациями свойств штаммов внутри одного вида.

В последние годы, с появлением метода полимеразной цепной реакции (ПЦР), стала возможной разработка разных вариантов праймеров для определения многих видов рода *Bifidobacterium* на основании строения генов рРНК, а также других молекулярных маркеров [4, 5]. Кроме того, для анализа видового состава бифидобактерий был разработан метод мультиплекс-ПЦР, позволяющий идентифицировать одновременно несколько видов этих микроорганизмов.

Целью данной работы было изучить видовой состав представителей рода *Bifidobacterium* содержимого кишечного тракта людей пожилого и старческого возраста.

Материалы и методы

Исследования проводили на базе Института геронтологии АМН Украины, г. Киев. Объектом исследования были люди пожилого и старческого возраста (от 63 до 84 лет), не имеющие патологий со стороны ЖКТ и не принимавшие антимикробные препараты в течение 2-х месяцев до начала исследования. Они являлись жителями Киевской области. В ходе исследования испытуемые были разделены на 2 группы: пожилые (от 63 до 80 лет) и старики (более 80 лет). Содержимое дистального отдела кишечника отбирали и анализировали методом ПЦР с использованием родо- и видоспецифических праймеров (не позже 4 ч после отбора). К 1 г образца фекалий добавляли 9 мл стерильного физиологического раствора и перемешивали в течение 5–10 мин. Тотальную ДНК выделяли, используя комплект реагентов для выделения ДНК (“ДНК-Технология”, Россия). Состав реакционной смеси и условия проведения ПЦР соответствовали приведенным в работах

Matsuki с соавт. [4] и Mullie с соавт. [6]. Продукты амплификации разделяли в 1,7% агарозном геле с последующей окраской бромистым этидием и визуализацией в УФ свете.

Результаты и обсуждение

Геноидентификация микроорганизмов с использованием специфических праймеров имеет определенные преимущества, по сравнению с микробиологическими методами ввиду их высокой чувствительности и точности. Для детекции бифидобактерий в исследуемых образцах мы вначале использовали метод ПЦР с родоспецифическими праймерами Bif164-f и Bif662-r. Данная пара праймеров является высокоспецифичной к гену 16S рРНК бифидобактерий и широко используется в мировой научной практике. В результате исследования было установлено наличие представителей рода *Bifidobacterium* во всех исследуемых образцах (рис. 1).

Для видовой идентификации бифидобактерий нами была выполнена множественная амплификация с праймерами к 12 видам представителей рода *Bifidobacterium* (рис. 2).

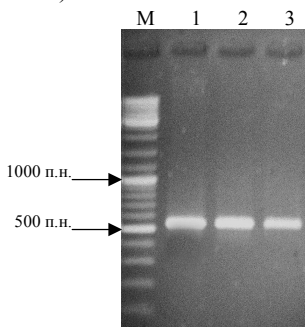


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов амплификации с родоспецифичными праймерами:

М — маркер молекулярных масс DNA ladder mix; 1, 2, 3 — исследуемые образцы

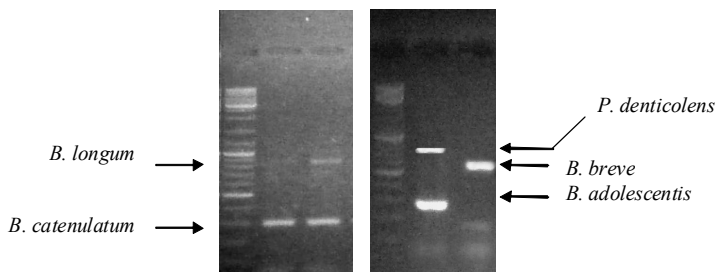


Рис. 2. Электрофореграмма ампликонов, полученных в результате множественной ПЦР с видоспецифичными праймерами и ДНК, выделенной из фекальных масс пожилых людей и долгожителей:

М — маркер молекулярных масс; 1–4 — исследуемые образцы

Таблица

Распространение видов *Bifidobacterium* в пищеварительном тракте людей пожилого и старческого возраста

Вид или комбинация видов	Количество образцов (% от общего количества)	
	Пожилые люди (n = 7)	Старики (n = 8)
Виды		
<i>B. catenulatum</i>	6 (86)	6 (75)
<i>B. longum</i>	4 (57)	1 (12,5)
<i>B. adolescentis</i>	3 (43)	1 (12,5)
<i>S. inopinatum</i>	3 (43)	2 (25)
<i>B. dentium</i>	2 (29)	1 (12,5)
<i>B. gallicum</i>	2 (29)	1 (12,5)
<i>B. breve</i>	0 (0)	2 (25)
<i>P. denticolens</i>	0 (0)	1 (12,5)
Комбинация видов		
1 вид	3 (43)	4 (50)
2 вида	0 (0)	1 (12)
3 вида	1 (14)	3 (38)
4 вида	1 (14)	0 (0)
5 видов	2 (29)	0 (0)

Такой метод множественной ПЦР (мультиплекс-ПЦР) позволяет определить одновременно несколько видов бактерий, присутствующих в образце, в результате проведения одной реакции. Мультиплекс-ПЦР позволяет значительно ускорить и упростить процесс идентификации. Результаты исследования видового состава бифидобактерий в пищеварительном тракте, а также их видовое разнообразие, представлены в таблице.

В результате анализа исследованных образцов было обнаружено 8 видов бифидобактерий: *B. catenulatum*, *B. longum*, *B. adolescentis*, *S. inopinatum*, *B. dentium*, *B. gallicum*, *B. breve* и *P. denticolens*. согласно полученным данным, наиболее часто встречающимся видом в содержимом пищеварительного тракта людей пожилого возраста является *B. catenulatum*, процентное содержание которого — 86% (6 образцов). Субдоминирующими видами этой группы микроорганизмов явились виды *B. longum*, *B. adolescentis* и *Scardovia inopinatum*, а минорными видами — *B. dentium* и *B. gallicum*. Виды *B. breve* и *Parascardovia denticolens* в образцах группы пожилых людей не были обнаружены.

В содержимом пищеварительного тракта стариков также наиболее часто встречался вид бифидобактерий *B. catenulatum*, процентное содержание которых в этой группе составило 75% (6 образцов). Остальные из исследуемых видов явились минорными.

Известно, что старение организма человека часто сопровождается значительными изменениями видового состава фекальной микрофлоры, о чем свидетельствует снижение числа анаэробных видов микроорганизмов и особенно представителей молочнокислых бактерий [3]. Было показано, что бифидофлора кишечника здорового взрослого человека представлена одновременно 4–6 видами. Нами было установлено, что у лиц старческого возраста наблюдается уменьшение видового разнообразия бифидобактерий, которые представлены всего 1–3 видами.

В результате исследования видового состава бифидобактерий, присутствующих в кишечном тракте людей пожилого и старческого возраста было установлено, что *B. catenulatum* является наиболее распространенным видом, населяющим пищеварительный тракт. Этот факт представляет интерес, поскольку ранее отмечалось, что наиболее распространенным видом, присутствующим в пищеварительном тракте людей молодого и зрелого возраста, является вид *B. adolescentis*. Кроме того, нами были выявлены такие редко встречающиеся у людей среднего возраста виды, как *B. gallicum*, *B. dentium* и *P. denticolens*. Такое отличие в видовом составе бифидобактерий людей среднего и более старшего возрастов можно объяснить возрастным изменением метаболических процессов пищеварения.

Выводы

Таким образом, кишечная бифидофлора людей пожилого и старческого возраста представлена видами *B. catenulatum*, *B. longum*, *B. adolescentis*, *S. inopinatum*, *B. dentium*, *B. gallicum*, *B. breve* и *P. denticolens*. Доминирующим видом является *B. catenulatum*. У людей старческого возраста наблюдается уменьшение видового разнообразия бифидобактерий.

Литература

1. Cummings J.H., Mac Farlane G.T. Role of intestinal bacteria in nutrient metabolism // Clinical nutrition.— 1997.— Vol.16, N1.— P. 3–11.
2. Gibson G.R., Rastall R.A. Gastrointestinal infection and the protective role of probiotics and prebiotics // Food Science and Technology Bulletin.— 2003.— N1.— P. 35–52.
3. He F., Ouwehand A.C., Isolauri E. et al. Differences in composition and mucosal adhesion of bifidobacteria isolated from healthy adults and healthy seniors // Curr. Microbiol.— 2001.— Vol.43, N4.— P. 351–354.
4. Matsuki T., Watanabe K., Fujimoto J. et al. Development of 16S rRNA-gene-targeted group-specific primers for the detection and identification of predominant bacteria in human feces // Appl. Environ. Microbiol.— 2002.— Vol.68, №5.— P. 5445–5451.
5. Matsuki T., Watanabe K., Tanaka R. et al. Distribution of bifidobacterial species in human intestinal microflora examined with 16S rRNA-gene-targeted species-specific primers // Appl. Environ. Microbiol.— 1999.— Vol.65, N10.— P. 4506–4512.
6. Mullie C., Odou M.-F., Singer E. et al. Multiplex PCR using 16S rRNA gene-targeted primers for the identification of bifidobacteria from human origin // FEMS Microbiology Letters.— 2003.— Vol.222.— P. 129–136.
7. Scardovi V. Genus *Bifidobacterium*. Orla-Jensen // Bergey's Manual of Systematic Bacteriology / Edited by P.H.A. Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe, J.G. Holt.— Baltimore: Williams&Wilkins, 1986.— P. 1418–1434.

Резюме

Исследован видовой состав представителей рода *Bifidobacterium* содержимого кишечного тракта людей пожилого возраста. Установлено, что их кишечная бифидофлора представлена в основном видами *B. catenulatum* (доминирующий вид), *B. longum*, *B. adolescentis*, *S. inopinatum*. У людей старческого возраста наблюдается уменьшение видового разнообразия бифидобактерий.

Досліджено видовий склад представників роду *Bifidobacterium* вмісту кишечного тракту людей похилого віку. Встановлено, що їх кишкова бифідофлора представлена в основному видами *B. catenulatum* (домінуючий вид), *B. longum*, *B. adolescentis*, *S. inopinatum*. У людей похилого віку спостерігається зменшення видового різномаття бифідобактерій.

Specific diversity of representatives of genus *Bifidobacterium* of seniors' intestinal tract has been investigated. It has been detected that their bifidoflora is represented basically by *B. catenulatum* (dominate species), *B. longum*, *B. adolescentis*, *S. inopinatum*. Decrease of bifidobacterial species diversity has been observed.

**СЕНЧЕНКО Т.В., БОЛТІНА І.В., КОСТИК О.Л., ТКАЧУК О.М.,
ЛЕПЬОШКІН І.В., КРАВЧУК О.П**

*Інститут екологієни і токсикології ім. Л. І. Медведя МОЗ України,
Україна, 03680 Київ, вул. Героїв оборони 6, e-mail: onorina@i.ua*

ОСОБЛИВОСТІ ВИКОРИСТАННЯ КОРОТКОСТРОКОВИХ ТЕСТІВ ДЛЯ ДОСЛІДЖЕННЯ МУТАГЕННОЇ АКТИВНОСТІ ПЕСТИЦИДІВ

Одним з провідних аспектів “віддалених наслідків” несприятливої дії пестицидів є оцінка їх можливого вкладу в індукований мутаційний процес у людини, наслідком якого може бути зріст частоти патології с генетичною компонентою. Тому до актуального напрямку у вивчені біологічного ефекту пестицидів відносять генетико-гігієнічні дослідження, основною метою яких є наукове прогнозування та попередження мутагенної небезпеки пестицидів для здоров’я теперішнього та майбутніх поколінь [3, 6, 11]. Оцінити потенційну мутагенну небезпечність пестицидів неможливо без попередньої оцінки їх токсичної дії на тест-об’єкти.

Метою роботи є розробка підходів до тестування пестицидів в експериментальних умовах. Для цього проводили аналіз даних по вивченню мутагенної активності пестицидних препаратів на трьох основних тестах: на індукцію генних мутацій у *S. typhimurium*/тест Еймса; на індукцію аберацій хромосом в клітинах кісткового мозку мишей *in vivo*; на індукцію аберацій хромосом в культурі лімфоцитів периферичної крові людини *in vitro* без та з метаболічною активацією).

Матеріали і методи

Тест Еймса, суть якого полягає в реєстрації здатності досліджуваної речовини та її метаболітів індукувати генні мутації від ауксотрофності до прототрофності по гістидину у індикаторних штамів *S. typhimurium*, які несуть *his*-мутації і не здатні синтезувати гістидин, проводили методом стандартного чашкового тесту, запропонованого D.M. Maron і B.N. Ames [13]. Мутагенний ефект в даному тесті визначали ступінню кратності перевищення кількості колоній-ревертантів в кожній концентрації над кількістю колоній у контролі (спонтанний рівень реверсій) та, згідно рекомендаціям Л.М. Фонштейну [7] оцінювали як слабкий, середній і сильний.

Культивування лімфоцитів *in vitro* та приготування препаратів хромосом виконували за стандартним напівмікрометодом [12] з модифікаціями, що прийняті в лабораторії мутагенезу [2]. Експеримент по вивченню пестицидних препаратів проводили в двох варіантах — без та з метаболічною активацією. При постановці експерименту з метаболічною активацією разом з препаратом додавали мікосомальну активуючу суміш (S-9 mix), яку готували за методичними рекомендаціями D.M. Maron і B.N. Ames [13]. Відбір метафазних платівок для цитогенетичного аналізу, класифікація та метод обліку аберацій хромосом — загальноприйняті. Статистичну обробку одержаних даних проводили відповідно до критеріїв Ст'юденту [1].

Дослідження метафазних хромосом клітин кісткового мозку проводили на білих нелінійних мишах, самцях за методом H.J. Evans [10]. Під час проведення експерименту тварини утримувались у віварії в стандартних пластикових клітках, при температурі навколишнього середовища 20–22 °С, вологості повітря 50–60%, стандартному світловому режимі “день — ніч”. Відбір піддослідних тварин проводили методом “випадкових чисел” [4]. Досліджувану речовину вводили внутрішньошлунково одноразово за допомогою зонду. Тварин забивали через 24 години після введення досліджуваної речовини. За дві години до забою тваринам внутрішньочеревно вводили розчин колхіцину для припинення поділу клітин на стадії метафази мітозу. Статистичну обробку одержаних даних проводили відповідно до критеріїв Ст'юденту [1].

Результати та обговорення

За весь час роботи лабораторії мутагенезу було досліджено більше 100 пестицидних препаратів.

В тесті Еймса та в тесті на індукцію аберацій в кістковому мозку мишей мутагенні ефекти були виявлені у чотирьох препаратів.

Тест на індукцію аберацій хромосом в лімфоцитах периферичної крові *in vitro* виявився “самим чутливим” по кількості пестицидних препаратів, які проявили мутагенні властивості. Збільшення частоти аберацій хромосом було виявлено у 19 препаратів

Крім частоти аберацій хромосом на метафазних препаратах підраховували частоту анеуплоїдних клітин — явище, при якому клітини організму містять число хромосом, некратне гаплоїдному (ординарному). Підвищення

частоти анеуплоїдних клітин може свідчити про можливий канцерогенний ризик при дії пестицидного препарату на культуру лімфоцитів периферичної крові людини [5, 9, 14]. За час досліджень підвищення частоти анеуплоїдних клітин було виявлено у 10 пестицидів.

Ще одним цитогенетичним показником, на який варто звернути увагу, є мультиаберантні клітини, наявність яких свідчить про зміни в системі репарації [8]. Мультиаберантні клітини виявлені майже у всіх препаратів в найвищих концентраціях, що свідчить про їх потенційну небезпеку.

Слід зауважити, що протягом останнього року став актуальним ще один показник — токсичність пестицидних препаратів при дослідженні їх мутагенних властивостей.

При постановці експерименту в тесті Еймса спершу визначали бактеріотоксичність (критерієм бактеріотоксичності вважали відсутність колоній в двох повторях), “відштовхуючись” від розчинності препарату. При співставленні концентрацій пестицидних препаратів (мається на увазі однієї і тієї ж діючої речовини при дослідженні різних пестицидних препаратів) був зафіксований бактеріотоксичний ефект (зниження діючих концентрацій в дослідженні на мутагенез). В тесті Еймса токсичний ефект був виявлений у 13 діючих речовин різних пестицидних препаратів.

Подібну картину спостерігали і в тесті на індукцію аберацій хромосом в клітинах кісткового мозку мишей *in vivo*. Першою концентрацією вважається $1/2-1/4$ ЛД₅₀. При дослідженні однакових діючих речовин пестицидних препаратів були виявлені різні токсичні властивості (загибель тварин в першій концентрації).

В тесті на індукцію аберацій хромосом в культурі лімфоцитів периферичної крові людини *in vitro* без та з метаболічною активацією були виявлені цитотоксичні властивості у 16 пестицидних препаратів. Показником цитотоксичності вважали зниження мітотичного індексу в культурі лімфоцитів, що відповідає зниженню мітотичній активності лімфоцитів.

Можливо, це пов'язано з тим, що останнім часом з'явилися копії оригінальних препаратів, які називають генериками. Речовина, що діє, в препаратах, як правило, одна і та ж, але при синтезі генериків неминуче з'являються домішки, які змінюють рівень токсичності.

Таким чином, дослідження токсичних властивостей пестицидних препаратів-генериків, мають бути невід'ємною частиною досліджень мутагенної активності цих речовин, тому що, токсичний ефект (*toxic — ядовитий, потенційно летальний*) свідчить про можливий потенційний летальний вплив.

Висновки

1. Дослідження токсичних властивостей пестицидних препаратів-генериків, мають бути невід'ємною частиною досліджень мутагенної активності цих речовин, які слід проводити тільки в комплексі із застосуванням не менше трьох тестів, що відображено на схемі щодо вивчення їх мутагенної активності.

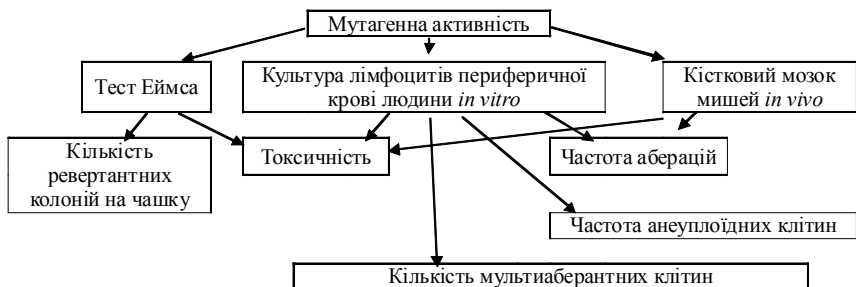


Схема. Вивчення мутагенної активності препаратів-генериків

2. Зниження рівня токсичності концентрацій при дослідженні мутагенної активності пестицидних препаратів-генериків, може бути підставою для перегляду деяких нормативів при застосуванні окремих препаратів.

3. Цитогенетичні показники — кількість анеуплоїдних та мультиаберантних клітин необхідно більш широко використовувати в експериментальних дослідженнях.

Література

1. Атраментова Л.А. Статистические методы в биологии. Учебник для студентов высших учебных заведений / Л.А. Атраментова, О.М. Утевская.— Горловка: “Видавництво “Ліхтар”, 2008.— 247 с.

2. А.с. (Свідоцтво про державну реєстрацію прав автора на твір) Модифікація методу вивчення мутагенної активності речовин (метафазного аналізу аберацій хромосом в культурі лімфоцитів периферичної крові людини) *in vitro* з метаболічною активацією / Болтіна І.В. №23794, заяв. 21.12.2007; опубл. 05.03.2008.

3. Куринный А.И. Оценка пестицидов как мутагенного фактора окружающей среды: автореф. дис на соискание науч. степени доктора биол. наук: спец. 030015 “Генетика” / А.И. Куринный.— Москва, 1986.— 39 с.

4. Лабораторные животные. Разведение, содержание, использование в эксперименте / И.П. Западнюк, В.И. Западнюк, Е.А. Захария, Б.В. Западнюк.— К.: Вища освіта, 1983.— 383 с.

5. Назаренко С.А., Сравнительный анализ частоты анеуплоидии в покоящихся и делящихся клетках человека при воздействии вредных внешнесредовых факторов / С.А. Назаренко, В.А. Тимошевский // Генетика.— 2005.— Т.41, №3.— С. 391–395.

6. Порошенко Г.Г. Экогенетические аспекты мутагенеза и их изучение в модельных системах : автореферат дис. на соискание науч. степени доктора биол. наук: спец. 030015 “Генетика” / Г.Г. Дорошенко.— Москва, 1998.— 38 с.

7. Фонштейн Л.М. Методы первичного выявления генетической активности загрязнителей среды с помощью бактериальных тест-систем. (Методические указания) / Л.М. Фонштейн, С.К. Абилов, Е.В. Бобринев.— Москва: Производственно-издательский комбинат ВИНТИ 1985.— 34 с.

8. Худoley В.В., Мизгирев И.В. Пути развития и перспективы экологической онкологии / В.В. Худoley // Вопросы онкологии.— 1997.— Т.43, №1.— С. 116–119.

9. Duesberg P., Rasnick D. Aneuploidy, the somatic mutation that makes cancer a species of its own / P. Duesberg, D. Rasnick // Cell Motility and Cytoskeleton.— 2000.— V.47.— P. 81–107.

10. Evans H.J. Cytological methods for detecting chemical mutagens. / H.J. Evans // Chemical mutagens: principles and methods for their detection.— 1976.— V.4.— P. 1–29.

11. Flemiry L. Mortality in a cohort of licenced pesticide applicators in Florida / L. Flemiry, J. Bean, M. Rudolph // Occup. and environ. Med.— 1999.— 56.— №1.— P. 14–21.

12. Hungerford D.A. Leucocytes cultured from small inoculate of whole blood and preparation metaphase chromosomes by treatment with hypotonic KCl / D.A. Hungerford // Stain Techn.— 1965.— V.40.— P. 333–338.

13. Maron D.M. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test / D.M. Maron, B.N. Ames // Mutation Research.— 1983.— V.113.— P. 173–215.

14. Sen S. Aneuploidy and cancer / S. Sen // Opinion Oncology.— 2000.— V.12.— P. 82–88.

Резюме

Исследование токсичных свойств пестицидов должно быть частью исследований мутагенной активности. Исследование следует проводить только в комплексе с применением не менее трех тестов.

Дослідження токсичних властивостей пестицидів мають бути частиною досліджень мутагенної активності. Дослідження слід проводити тільки в комплексі з застосуванням не менше трьох тестів.

Research of toxic properties of pesticides must be part of researches of mutagenicity. Research it is necessary to conduct only in a complex with application no less than three tests.

ТАЛАН О.О., ШЕМЕТУН О.В., ПЕДАН Л.Р., ПІЛІНСЬКА М.А.

ДУ “Науковий центр радіаційної медицини АМН України”,

Україна, 04050, Київ, вул. Мельнікова, 53, e-mail: okstal@ukr.net

ВПЛИВ ВІКУ НА ЧАСТОТУ СПОНТАННИХ АБЕРАЦІЙ ХРОМОСОМ В ЛІМФОЦИТАХ ПЕРИФЕРИЧНОЇ КРОВІ ЛЮДИНИ

Протягом останніх років відмічається зростання популяційних частот спонтанних аберацій хромосом в лімфоцитах периферичної крові людини. Дані щодо рівня хромосомних аберацій в неекспонованих групах людей вважаються вихідними під час оцінки цитогенетичного ефекту, індукованого виробничними чи екологічними мутагенами [1]. Це обумовлює актуальність оцінки спонтанного мутаційного процесу в клітинах людини на цитогенетичному рівні в післячорнобильський період.

На спонтанний рівень аберацій хромосом в лімфоцитах периферичної крові людини впливають не лише зовнішні, а й внутрішні чинники, зокрема,— вік обстежених [2]. Дані літератури з цієї проблеми на сьогодні є досить суперечливими. Це може бути зумовлено використанням в більшості цитогенетичних досліджень рівномірного забарвлення препаратів метафазних хромосом, що не дозволяє ідентифікувати весь спектр хромосомних аберацій [2, 3].

Метою нашої роботи було встановлення частоти всіх типів аберацій хромосом у осіб різного віку, які постійно проживають в умовах великого промислового міста.

Матеріали і методи

Матеріалом цитогенетичного дослідження були лімфоцити периферичної крові 18 умовно здорових осіб середнього віку (27–48 років) та 14 умовно здорових дітей 12–16-ти років, які постійно проживали в Києві і заперечували свідомий контакт з іонізуючою радіацією та іншими мутагенами, вели здоровий спосіб життя.

Лімфоцити периферичної крові культивували за загальноприйнятим напівмікрометодом протягом 48 годин [4]. Цитогенетичний аналіз виконували з використанням диференційного G-забарвлення метафазних хромосом за методом М. Seabright [5]. Від кожного обстеженого аналізували не менше 100 диференційно забарвлених метафаз.

Хромосомний аналіз проводили на зашифрованих препаратах під мікроскопами зі збільшенням $\times 1000$. Враховували аберації хроматидного (хроматидні розриви, обміни) і хромосомного (дицентричні й 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 у дітей ($1,26 \pm 0,28$) знаходився на популяційному рівні. У дорослих цей показник був статистично вищим і дорівнював $2,51 \pm 0,34$ на 100 клітин ($p < 0,05$). У 28% обстежених дорослих донорів зареєстровано клітини з двома абераціями хромосом, тоді як у дітей цього не спостерігалось, що вказує на збільшення пошкодженості абераційної клітини з підвищенням віку обстежених осіб. Чеботарьов А.Н. пояснює подібні закономірності більш ефективним перебігом репаративних процесів у осіб молодого віку [7].

Аналіз спектру виявлених пошкоджень засвідчив різницю в абераціях хромосомного типу, зареєстрованих у дітей і осіб середнього віку: $0,66 \pm 0,21$ та $1,78 \pm 0,29$ на 100 метафаз, відповідно ($p < 0,05$) (рис. 1). У всіх обстежених осіб пошкодження хроматидного типу були представлені хроматидними розривами з частотами $0,60 \pm 0,20$ та $0,73 \pm 0,19$ на 100 метафаз у дітей і дорослих, відповідно (рис. 1).

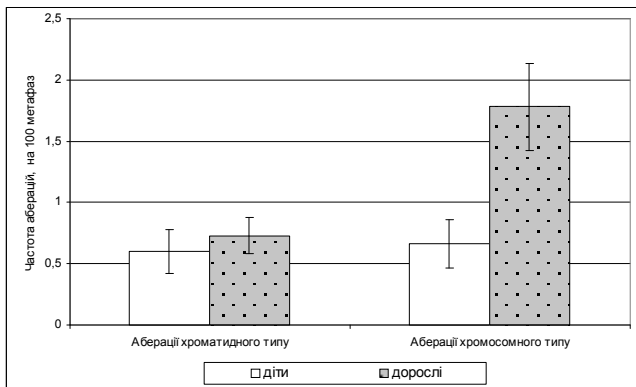


Рис. 1. Спонтанний рівень аберацій хроматидного та хромосомного типів в умовно здорових мешканців м. Києва різного віку

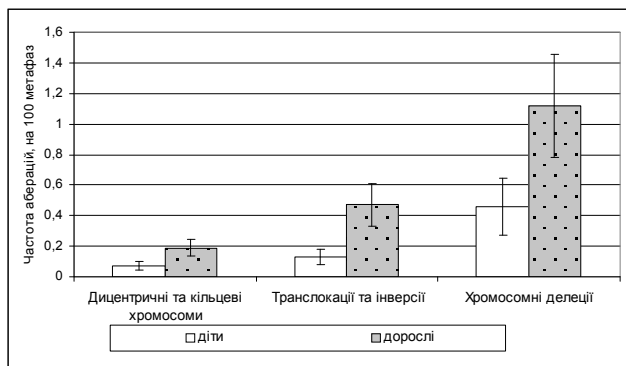


Рис. 2. Спонтанний рівень стабільних і нестабільних аберацій хромосом в умовно здорових мешканців м. Києва різного віку

Отримані нами результати узгоджуються з даними літератури, де відмічається зростання аберацій хромосомного типу зі збільшенням віку обстежених осіб [2, 3]. В обох обстежених нами групах аберації хромосомного типу були представлені термінальними та інтерстиціальними делеціями, транслокаціями, інверсіями, дицентричними і кільцевими хромосомами. Переважну більшість цих пошкоджень склали делеції, які зустрічались з частотами $0,46 \pm 0,17$ та $1,12 \pm 0,23$ на 100 метафаз в групах дітей та дорослих, відповідно (рис. 2). Більшість делецій хромосом було представлено термінальними пошкодженнями.

Рівень асиметричних хромосомних обмінів (дицентричних і кільцевих хромосом) у обстежених осіб не перевищував популяційної норми та становив $0,07 \pm 0,06$ на 100 метафаз у дітей і $0,19 \pm 0,09$ на 100 метафаз у дорослих (рис. 2). Разом з тим, частота симетричних хромосомних обмінів (транслокацій

та інверсій) в групі дорослих ($0,47 \pm 0,15$ на 100 клітин) достовірно перевищувала цей показник у обстежених дітей ($0,13 \pm 0,09$ на 100 клітин) (рис. 2).

Висновки

Цитогенетичне обстеження умовно здорових мешканців м. Києва різного віку, проведене з використанням диференційного G-забарвлення метафазних хромосом, показало, що у дітей віком від 12 до 16 років частота аберацій хромосом становила $1,26 \pm 0,28$ на 100 клітин. У осіб середнього віку (27–48 років) зафіксовано зростання середньогрупового рівня аберацій хромосом до $2,51 \pm 0,34$ на 100 клітин за рахунок збільшення частоти транслокацій і делецій хромосом, що є стабільними хромосомними перебудовами та накопичуються протягом життя.

Література

1. Пілінська М.А., Дибський С.С., Шеметун О.В., Талан О.О. Рівень спонтанних хромосомних аберацій у дітей з екологічно чистого регіону України, встановлений при цитогенетичному аналізі рівномірно та диференційно забарвлених метафазних хромосом // Цитология и генетика.— 2004.— №6.— С. 45–48.
2. Любимова Н.Е., Воробцова И.Е. Влияние возраста и низкодозового облучения на частоту хромосомных абераций в лимфоцитах человека // Радиационная биология. Радиоэкология.— 2007.— Т.47, №1.— С. 80–85.
3. Predrag Erceg, Dragoslav P. Milosevic, Nebojsa Despotovic and Mladen Davidovic. Chromosomal changes in ageing // Journal of Genetics.— 2007.— Vol.86, N3.— P. 277–278.
4. Цитогенетичні методи дослідження хромосом людини: Метод. рекомендації / КМАПО МОЗ України.— К., 2003.— 23 с.
5. Seabright M. A rapid banding technique for human chromosomes // Lancet.— 1971.— Vol.2.— P. 971–972.
6. An International system for human cytogenetic nomenclature: high-resolution banding (2005) / Standing committee on Human Cytogenetic nomenclature.— Basel: Karger, 2005.— 130 p.
7. Чеботарёв А.Н. Закономерности хромосомной изменчивости соматических клеток человека // Вестник РАМН.— 2001.— №10.— С. 64–69.

Резюме

За допомогою G-диференційного забарвлення метафазних хромосом проведено цитогенетичне обстеження дітей віком від 12 до 16 років і дорослих віком від 27 до 48 років, які постійно проживали в м. Києві. Відмічено зростання рівня аберацій хромосом у дорослих осіб ($2,51 \pm 0,34$ на 100 метафаз) порівняно з групою дітей ($1,26 \pm 0,28$ на 100 клітин), за рахунок транслокацій і делецій хромосом.

С помощью G-дифференциального окрашивания метафазных хромосом проведено цитогенетическое обследование детей в возрасте от 12 до 16 лет и взрослых в возрасте от 27 до 48 лет, постоянно проживающих в г. Киеве. Отмечено увеличение частоты абераций хромосом у взрослых ($2,51 \pm 0,34$ на 100 метафаз) по сравнению с группой детей ($1,26 \pm 0,28$ на 100 клеток), за счет транслокаций и делеций.

Cytogenetic examination of two healthy human groups — children 12–16 years old and adults 27–48 years old constantly lived in Kiev had been carry out with the help of G-banding analysis. The increased level of chromosome aberrations in the group of adults ($2,51 \pm 0,34$ per 100 cells) has been established in comparision with the group of children ($1,26 \pm 0,28$ per 100 cells) at the expense of translocations and deletions.

ТЕЛЕГЄВ Г.Д., МИРОШНИЧЕНКО Д.О., ДИБКОВ М.В., МАЛЮТА С.С.
*Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,
Україна, 03680, Київ, вул. Заболотного, 150; e-mail: g.d.telegeev@imbg.org.ua*

ВИВЧЕННЯ ВПЛИВУ ДН/РН ДОМЕНІВ БІЛКА ВСR НА СУБКЛІТИННУ ЛОКАЛІЗАЦІЮ ОНКОПРОТЕЇНУ ВСR-Abl

Ген *bcr* (від англ. breakpoint cluster region) бере участь у патогенезі двох типів лейкемій, що мають філадельфійську хромосому (t 9:22). Ця хромосома детектується в 95% випадків у хворих на ХМЛ та 25–30% випадків у хворих на ГЛЛ (дорослих). Розвиток хвороби обумовлений експресією гібридного білку, що складається з доменів *Vcr* (амінокінцева частина, з 22 хромосоми) та *Abl* (карбоксільна частина, з 9 хромосоми) [1].

Відмінність перебігу хронічної та гострої форми обумовлена наявністю різних форм гібридного білку, а саме p190 при ГЛЛ та p210 при ХМЛ. Остання відрізняється від p190 тим, що має 2 додаткові домени (ДН та РН)

Таким чином, визначення структурно-функціональної ролі цих доменів дасть змогу пояснити різні типи лейкемій, розробити нові терапевтичні підходи.

Матеріали і методи

Трансфекція клітин еукаріотів проводили згідно [2]. Для експресії білків ДН, ДНРН, РН було використано конструкції на основі вектора pRK5-мус. Для експресії білків p190Vcr-Abl та p210Vcr-Abl було використано вектори pSG5 та pGDE.

Імунофлуоресцентна мікроскопія. Для використання в мікроскопії клітини вирощували на скельцях для мікроскопії в 6-лунковій культуральній плащі у відповідному середовищі при +37 °С та 5% CO₂. Через 24 год. після трансфекції клітини переносили в середовище без сироватки і інкубували 16 год. Реакцію мічення антитілами проводили за [4]. Для отримання флуоресцентного сигналу різні компоненти клітини фарбували декількома способами: ядро — DAPI 1:1000, актин — TRITC-міченим фалоїдин 1:200, комплекс Гольджі — маркером GM130 1:100 і TRITC-міченими антитілами anti-mouse IgG 1:500, білки Vcr-Abl (p190, p210) — anti-Abl антитілами 1:100 і вторинними Cy2-міченими anti-rabbit IgG антитілами.

Результати та обговорення

Дослідження локалізації білків p190 і p210 Vcr-Abl. Як було зазначено, білки p190 і p210 відрізняються тим, до складу останнього додатково входять домени ДН і РН. Ми встановили, що РН домен зв'язує фосфатиділінозитолмонофосфати з високою афінністю [3]. Відомо, що в клітині існує розподіл ліпідів за компартментами, тому наявність в складі білка РН домену може впливати на його локалізацію. Клітини Cos-1 були трансфіковані конструкціями, які експресували p190 або p210 Vcr-Abl. Через 36 годин після трансфекції клітини фіксували і фарбували (рис. 1). Було показано, що білки p190 і p210 Vcr-Abl мають відмінності в локалізації. Обидва білки знаходяться в цитоплазмі, але помітно, що p190 Vcr-Abl має більш рівномірний розподіл

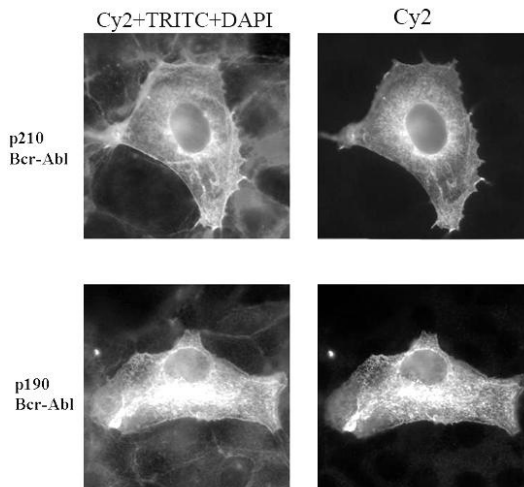


Рис. 1. Імунофлуоресцентний аналіз розподілу білків p210 і p190 Bcr-Abl в клітинах Cos-1: візуалізація: Bcr-Abl — анти-Abl антитіла 1:100; вторинні Cy2-мічені антитіла 1:500; актин — TRITC-мічений фаллоїдин 1:200; ядро — DAPI 1:1000

по цитоплазмі клітини. Білок p210, навпаки є більш концентрованим навколо ядра, і хоча також присутній по всій цитоплазмі, його локалізація явно пов'язана з ядром. Отже, можна зробити висновок, що ділянка Bcr, яка входить до складу p210 і не входить до p190 Bcr-Abl, має певний вплив на розподіл зазначених білків. Найбільш вірогідним є участь PH домену в локалізації білка Bcr-Abl. Морфологія клітин Cos-1 не змінювалась при трансфекції. Клітини мали округлу форму, рівномірний розподіл актину без виражених філаментів, мембрана клітин не утворювала ламелоподій або філоподій. Це може означати, що ГТФази родини Rho, які беруть участь у реорганізації актинового цитоскелету, у цьому випадку не були активовані, чого слід було б очікувати, якщо DH домен білка p210 Bcr-Abl має GEF-активність.

Дослідження локалізації GFP білків, що несуть DH і PH домени білка BCR.

Було помічено, що розподіл білків p190 та p210 відрізняється. Додатково трансформували клітини Cos-1 GFP-конструкціями, що несли DH, PH або DHPH домени Bcr і вивчали локалізацію відповідних GFP-білків, а також розподіл актину (рис. 2). Не спостерігалось виникнення ламелоподій або філоподій, що виникають при активації Rho ГТФаз, актинові філаменти не були чітко вражені. Білки з PH доменом і без нього мали різну локалізацію. Так, білок DH знаходився в цитоплазмі клітин, а обидві конструкції з PH доменом крім цитоплазми, були також детектовані в області ядра клітини. Природа такого розподілу не з'ясована, але такі відмінності в локалізації

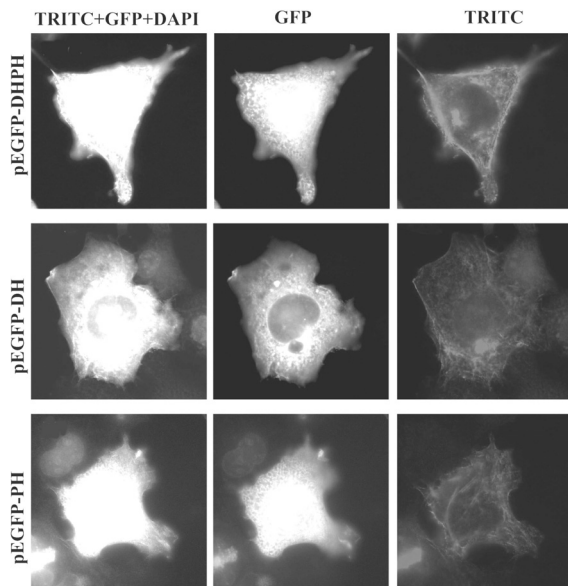


Рис. 2. Імунофлуоресцентний аналіз субклітинної локалізації GFP-білків, що несуть DH і PH домени Bcr: клітини Cos-1 трансфіковані плазмідами pEGFP, що експресують DH; PH і DHPH фрагменти Bcr з GFP-послідовністю; актин візуалізовано за допомогою TRITC- кон'югованого фаллоїдину 1:200; ядро — DAPI 1:1000

відповідних білків ілюструють вплив PH домену на місце знаходження білка, до складу якого він входить, і, таким чином, на його роль у передачі сигналів в клітині.

Локалізація білків p190 і p210 Bcr-Abl в клітині відносно апарату Гольджі. Ми показали, що PH домен має властивість зв'язувати PI(4)P, який є основним компонентом мембран комплексу Гольджі [3]. Тому було вирішено дослідити локалізацію білків p190 і p210 відносно апарату Гольджі (рис. 3).

Клітини Cos-1 трансформували конструкціями, що несли білки p190 і p210 Bcr-Abl. Для візуалізації апарату Гольджі було використано антитіла до матричного білка GM130, що є його специфічним маркером. Було відмічено, що локалізація білка p210 пов'язана з апаратом Гольджі, крім того, що він також знаходиться в цитоплазмі. Але в районі комплексу Гольджі спостерігалась найбільш висока концентрація білка. В свою чергу, білок p190 Bcr-Abl не має такого явного розташування навколо ядра, він є розподіленим рівномірно по всій цитоплазмі клітини.

Таким чином, показано, що наявність PH домену впливає на субклітинну локалізацію цього протеїну, обумовлює взаємодію з різними органелами та білками клітини.

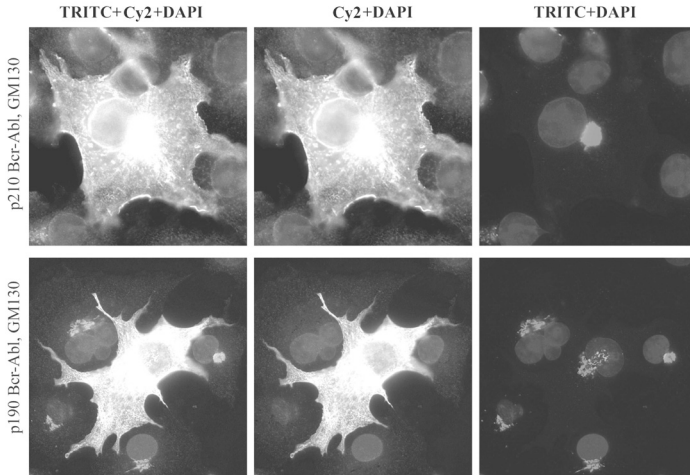


Рис. 3. Імунофлуоресцентний аналіз колокалізації білків p190 і p210 Bcr-Abl і апарату Гольджи: візуалізація: Bcr-Abl — анти-Abl антитіла 1:100, вторинні Cy2-мічені антитіла; комплекс Гольджи — анти-GM130 антитіла 1:100, вторинні TRITC-мічені антитіла; ядро — DAPI 1:1000

Література

1. Quintas-Cardama A., Cortes J. Molecular biology of bcr-abl positive chronic myeloid leukemia // *Blood*.— 2009.— V.113, N8.— P. 1619–1630.
2. Chen C., Okayama H. High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA // *Mol. Cell. Biol.*—1987.— V.7.— P. 2745–2752.
3. Мірошніченко Д.О., Дубровська А.М., Телегеев Г.Д., Малиута С.С. Визначення специфічності білок-ліпідних і білок-білкових взаємодій PH домену білка Bcr, пов'язаного з хронічною мієлоїдною лейкемією // *Біополімери і клітина*.— 2007.— Т.23, №5.— С. 405–409.
4. Miroshnychenko D., Dubrovska A., Maliuta S., Telegeev G., Aspenstrom P. Novel role of pleckstrin homology domain of the Bcr-Abl protein: Analysis of protein-protein and protein-lipid interactions // *Exp Cell Res.*— 2010.— 316.— N4.— P. 530–542.

Резюме

Вивчали вплив DH, PH доменів білка Bcr на розподіл онкопротеїну Bcr-Abl в клітині. Показано, що наявність PH домену впливає на субклітинну локалізацію цього протеїну, обумовлює взаємодію з різними органелами та білками клітини.

Изучали влияние DH, PH доменов Bcr белка на локализацию Bcr-Abl в клетке. Установлено, что наличие PH домена определяет внутриклеточную локализацию этого белка, обуславливает его взаимодействие с клеточными белками и органеллами.

We studied role of PH, DH domains of Bcr on localization of Bcr-Abl in cell. It was detected that PH domain determines its subcellular position and interaction with cells organelles and proteins.

ТЕРПИЛЯК О.І., ЗАСТАВНА Д.В., ЗАГАНЯЧ Я.Ю., ГЕЛЬНЕР Н.В.

ДУ "Інститут спадкової патології АМН України"

Україна, 79000, м. Львів, вул. М. Лисенка, 31а, e-mail: root@ihp.lviv.ua

АСОЦІАЦІЯ МІЖ ГЕНЕТИЧНИМИ ПОЛІМОРФІЗМАМИ ПРОМОТОРНОЇ ДІЛЯНКИ ІЛ-10 ТА РЕПРОДУКТИВНИМИ ВТРАТАМИ У ЖІНОК

Роботи останніх років [1, 2] засвідчують, що продукція цитокінів знаходиться під генетичним контролем, і жінки з репродуктивними втратами мають генетичну predisпозицію до типу імунної відповіді, яка власне відповідає за втрату вагітності. Цитокіни індують зміни в експресії генів в клітинах-мішенях і діють як імуномодулятори [3, 4]. Вони впливають на репродукцію безпосередньо через втручання в процеси гаметогенезу, імплантацію, інвазію трофобласта, децидуалізацію, розвиток плаценти та імунотолерантність вагітності. Th1-цитокіни опосередковують цитотоксичну, запальну та ембріотоксичну реакцію, Th2-цитокіни через гуморальний імунітет запобігають Th1-відповіді проти зародка [5, 6]. Отже, протікання вагітності залежить від типу та концентрації цитокінів, вони можуть як охороняти плід, так і впливати пагубно на нього.

Серед Th2-цитокінів ключову роль відіграє ІЛ-10. Підтримуючи Th2-цитокінове оточення, він є критичним цитокіном для пролонгування вагітності. Ген ІЛ-10 локалізований на хромосомі 1 в регіоні 1q31-q32, в промоторній ділянці якого (пІЛ-10) знаходиться багато SNP (single-nucleotide polymorphisms), котрі і забезпечують рівень його продукції. Найбільш дослідженими є SNP –1082 G→A, –819 T→C та –592 A→C. Результати по асоціації алельних поліморфізмів SNP з рівнем продукції ІЛ-10, отримані різними авторами [7, 8], неоднозначні, відповідно, такого роду дослідження є актуальними.

Отже, виходячи з вище сказаного, метою роботи було вивчення особливостей розподілу поліморфних варіантів SNP –819 T→C та –592 A→C промоторної ділянки гена ІЛ-10 в групі жінок з непліддям.

Матеріал і методи

Матеріалом для дослідження була ДНК, виділена з периферійної крові жінок з непліддям, які звернулися для медико-генетичного консультування у Львівський міжобласний медико-генетичний центр. Обстежено 22 жінки з навиковим невиношуванням вагітності (ННВ), 41 жінка з первинним непліддям (ПН) та 106 жінок контрольної групи без обтяженого акушерсько-генетичного анамнезу, котрі мають не менше двох здорових дітей.

Досліджувану промоторну ділянку гена ІЛ-10 ампліфікували за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) згідно методу, описаного Giorgani L. et al. [9] з використанням реактивів "МВІ Fermentas". Детекція проводилася 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). Отримані дані піддавались обробці методами варіаційної статистики: визначали критерій Пірсона χ^2 [10].

Результати та обговорення

Вивчали розподіл та частоти алелів, гаплотипів та генотипів SNP – 1082 G→A –819 T→C та –592 A→C пІЛ-10 у жінок з первинним непліддям (вагітність не наступала протягом щонайменше 2-х років), з навиковим невиношуванням вагітності (щонайменше 2-о разове переривання вагітності до 12 тижнів вагітності) у порівнянні з контрольною групою жінок без обтяженого генетично-акушерського анамнезу, які мають щонайменше 2-х здорових дітей. За допомогою критерію Пірсона χ^2 були виділені групи алелів, які володіли позитивною, чи негативною асоціацією з обстеженими групами (непліддям, чи невиношуванням вагітності).

Результати вивчення частот алелів низької (А) та високої (G) експресії 1082 G→A гена ІЛ-10 засвідчили, що співвідношення частот А- та G-алелів в групі з навиковим невиношуванням вагітності (ННВ) становило 38,6% до 61,4% алелей. Таким чином, обстежувана група жінок характеризувалася суттєво підвищеною частотою алелі G (61,4%) SNP –1082 G→A, тобто алелі високої експресії гена ІЛ-10 в порівнянні з алелем А (38,6%) — низька експресія гена ІЛ-10. Слід зазначити, що ці дані діаметрально протилежно відрізняються від показників контрольної групи, де підвищена частота належала алелі А (55%), а алель G характеризувалася заниженою частотою (45%). Оцінювання вірогідності відмінностей показників контрольної групи від обстежуваної групи з ННВ підтвердили статистично вірогідну різницю, а саме, заниження частоти алелі А та підвищення частоти G-алелі ($\chi^2 = 4,98$, $p < 0,05$).

В групі з первинним непліддям (ПН) встановлені показники не досягали вірогідно значимої різниці, порівняно з контролем. В групі подружніх пар з ПН, як і в контрольній групі, з найвищою частотою зустрічається AG генотип (45%, помірної експресії гена ІЛ-10). Цей факт засвідчує відмінність групи жінок з ПН з групою жінок з НВ, де найвищою частотою характеризувався генотип GG (45,7%, генотип високої експресії гена ІЛ-10).

Отримані результати також засвідчили, що у жінок з ПН частота алелів Т та А SNP –819 T→C та –592 A→C, які відносять до алелів “низької” експресії ІЛ-10, складає 25,6% при контрольних показниках — 24,1%, а частота алелю С (алель “високої” експресії ІЛ-10) складає 74,4% при 75,9 — відсотковій частоті в контролі.

Тобто, за частотами алелів SNP –819 T→C та –592 A→C пІЛ-10 жінки з первинним непліддям не відрізняються від контрольної групи жінок. Окрім того, як видно з представлених результатів і нами перевірено в повторних досліджах, відзначається зчеплена залежність між алелем А –592 A→C та алелем Т –819 T→C, а також між алелями С цих двох локусів.

У групі жінок з ННВ за розподілом алелів відзначено вірогідно значиму різницю у порівнянні з контрольною групою. Частота алелю С у жінок з ННВ перевищувала 90%, відповідно частота алелів низької експресії ІЛ-10

A і T SNP –819 T→C та –592 A→C пІЛ-10 складала 9,1% при 24,1% в контролі. Оцінюючи асоціативні зв'язки між ННВ та частотами алелів А і Т SNP –819 T→C та –592 A→C пІЛ-10, встановлена вірогідна відмінність показників контрольної групи від обстежуваної групи з ННВ, а саме, занижена частота алелі А і Т та підвищена частота С-алелі ($\chi^2 = 4,84$, $p < 0,05$).

Вірогідно значима різниця між контрольною групою жінок та групою жінок із ранніми перериваннями вагітності (ННВ) зафіксована при співставленні гапло- та генотипів SNP –819 T→C та –592 A→C пІЛ-10 у цих групах. АА/ТТ — генотип “низької” експресії ІЛ-10 не зустрічався в дослідній групі взагалі при 1,9 — відсотковій частоті в контролі. Частота генотипу СС/СС “високої” експресії ІЛ-10 вірогідно перевищувала контрольні показники ($\chi^2 = 5,9$ $p < 0,05$). Генотип АС/ТС “помірної” експресії ІЛ-10 в досліді був вірогідно знижений у порівнянні з контролем ($\chi^2 = 5,9$ $p < 0,05$).

Жінки з ПН практично не відрізнялися від контрольної групи за гаплотипами та генотипами. Вірогідна різниця порівняно з контролем виявлена лише стосовно генотипу “низької” експресії (АА/ТТ).

Отже, підсумовуючи вище сказане, ми згідні з іншими дослідниками, що ІЛ-10 має вплив на розвиток плоду [11, 12, 13], а його генетичне регулювання виглядає ключем до розвитку успішної вагітності. Результати, представлені нами в цій праці принципово співпадають з результатами D'Alfonso et al. [14] щодо сильнішої лінійної залежності між –1082А/С, –819Т/С і –592А/С SNPs та трьома гаплотипами (АСС, АТА, ССС) при ННВ. Слід особливо наголосити, що за нашими даними група жінок з ННВ принципово відрізняється від групи жінок з ПН по розподілі та частоті алелів, гаплотипів та генотипів SNP –1082А/С, –819 Т→С та –592 А→С, а це опосередковано підтверджує тезу, що саме при ННВ може запускатися так звана “материнська імунна відповідь на плід” через генетично обумовлені порушення цитокінового статусу у жінки.

Висновки

1. Алельний поліморфізм SNP 1082 G→A –819 T→C та –592 A→C пІЛ-10 у жінок з первинним непліддям не відрізняються від контрольної групи жінок.

2. Вірогідно значима різниця між контрольною групою жінок та групою жінок із навиковим невиношуванням вагітності зафіксована при співставленні частоти та розподілу алелів, гапло- та генотипів SNP –1082 G→A –819 T→C та –592 A→C пІЛ-10 у цих групах.

3. Підтримується теза, що при навиковому невиношуванні вагітності може запускатися так звана “материнська імунна відповідь на плід” через генетично обумовлені порушення цитокінового статусу у жінки.

Література

1. Zammitti W., Mтираoui N., Kallel C. et al. A case-control study on the association of idiopathic recurrent pregnancy loss with autoantibodies against b2-glycoprotein I and annexin V // *Reproduction*.— 2006.— N131.— P. 817–822.

2. D'Alfonso S., Rampi M., Rolando V. et al. New polymorphisms in the IL-10 promoter region // *Genes Immun*.— 2000.— N1.— P. 231–233.

3. *Medica I., Ostojic S, Perez N. et al.* Association between genetic polymorphisms in cytokine genes and recurrent miscarriage — a meta-analysis // *Reproductive BioMedicine Online.*— 2009.— Vol.19.— N3.— P. 406–414.
4. *Parham P.* *The Immune System / Garland Publishing.* — London.— 2000.— 171 p.
5. *Заставна Д.В.* Інтерферонові показники у вагітних жінок на різних термінах вагітності // *Педіатрія, акушерство та гінекологія.*— 2000.— №1.— С. 72–74.
6. *Hales D.B.* *Cytokines and testicular function.*— Wiley-Liss.— New York.— 2000.— 305 p.
7. *Kwak-Kim J.Y., Gilman-Sachs A., Kim C.E. et al.* Thelper 1 and 2 immune responses in relationship to pregnancy, nonpregnancy, recurrent spontaneous abortions and infertility of repeated implantation failures // *Chem Immunol Allergy.*— 2005.— N88.— P. 64–79.
8. *Prigoshin N., Tambutti M., Larriba J. et al.* Cytokine gene polymorphisms in recurrent pregnancy loss of unknown cause // *Am J. Reprod Immunol.*— 2004.— N52.— P. 36–41.
9. *Giordani L., Bruzzi P., Lasalandra C.* Association of breast cancer and polymorphisms of Interleukin-10 and Tumor Necrosis Factor- α genes // *Clin. Chem.*— 2003.— Vol.49.— P. 1664–1667.
10. *Певницкий Л.А.* Статистическая оценка ассоциаций HLA-антигенов с заболеваниями // *Вестник АМН СССР.*— 1988.— №7.— С. 48–51.
11. *Costeas P. A., Koumouli A., Giantsiou-Kyriakou A. et al.* Th2/Th3 cytokine genotypes are associated with pregnancy loss // *Hum Immunol.*— 2004.— N65.— P. 135–141.
12. *Crilly A., Hamilton J., Clark C.J. et al.* Analysis of the 5' flanking region of the interleukin 10 gene in patients with systemic sclerosis // *Rheumatology (Oxford).*— 2003.— N42.— P. 1295–1298.
13. *Temple S.E., Lim E., Cheong K.Y., Almeida C.A., Price P., Ardlie K.G. and Waterer G.W.* Allele carried at positions-819 and -592 of the IL-10 promoter affect transcription following stimulation of peripheral blood cells with streptococcus pneumoniae // *Immunogenetics.*— 2003.— N55.— P. 629–632.
14. *D'Alfonso S.* New polymorphisms in the IL-10 promoter region / *S. D'Alfonso, M. Rampi, V. Rolando, [et al.] // Genes Immun.*— 2000.— N1.— P. 231–233.

Резюме

Вивчали особливості розподілу поліморфних варіантів SNP 1082 G \rightarrow A -819 T \rightarrow C та -592 A \rightarrow C промоторної ділянки гена ІЛ-10 в групі жінок з непліддям. Встановлено, що вірогідно значиме підвищення частоти GG/CC/CC-генотипу високої експресії ІЛ-10 є прогностично негативним маркером протікання вагітності. Припускаємо, що ІЛ-10 може бути задіяний в патогенезі навикового невиношування вагітності.

Изучали нуклеотидные полиморфизмы SNP 1082 G \rightarrow A -819 T \rightarrow C та -592 A \rightarrow C промоторного участка гена ИЛ-10 в группе женщин с бесплодием. Установлено, что достоверно повышенная частота генотипа GG/CC/CC-генотипа высокой экспрессии ИЛ-10 является негативным маркером для течения беременности. Допускаем, что ИЛ-10 может быть задействован в патогенезе привычного невынашивания беременности.

We studied the SNP 1082 G \rightarrow A -819 T \rightarrow C та -592 A \rightarrow C of the gene IL-10 promoter region in infertility women. It was confirmed, that increase of high expression CC-genotypes SNP -819 T \rightarrow C та -592 A \rightarrow C пІЛ-10 was prognostically unfavourable for running of pregnancy. It is expected, that IL-10 gene may be active in pathogenesis of accustomed miscarriages.

ФЕДОТА А. М., ГАВИЛЕЙ Н. С., ПОЛТАВСКАЯ А. Ю.

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

ГЕНОДЕРМАТОЗЫ КАК МАРКЕРЫ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ОТЯГОЩЕННОСТИ ПОДРАЗДЕЛЕННЫХ ПОПУЛЯЦИЙ С РАЗЛИЧНЫМИ ПОКАЗАТЕЛЯМИ ИНФРАСТРУКТУРЫ

Исследования украинских популяций начались в начале 90-х годов XX века, когда были получены первые данные про генетико-демографическую структуру и особенности генетических процессов в харьковской популяции [1]. Генетико-демографические исследования малых городов и сел Восточной Украины в конце 90-х годов XX века показали увеличение коэффициента инбридинга, изоляции расстоянием по сравнению с 60–80-ми годами XX века [2]. Поскольку сельское население составляет более 30% населения Украины, понимание особенностей генетической структуры и направление генетических процессов в сельских популяциях имеет существенное значение для генетического мониторинга и генетического прогнозирования, для анализа природы генетического груза, в частности, груза наследственных болезней, представляющего угрозу генетической безопасности населения.

По данным ряда авторов, сопоставление таких важных в медико-генетическом отношении популяционных характеристик, как отягощенность ее наследственной патологией и подразделенность популяции, имеет серьезные методические сложности. Большинство подходов к оценке генетических параметров популяции рассчитаны на работу в элементарной, менделеевской, относительно небольшой популяции, тогда как сбор сведений о частоте и распространенности наследственной патологии в силу редкости каждой отдельной нозологической единицы часто проводится в крупной популяции [3].

Во избежание описанных выше методических сложностей, в данной работе авторы предполагают проанализировать влияние различных элементов и объектов инфраструктуры на подразделенность малочисленных популяций, и, соответственно, на отягощенность популяций моногенной патологией, используя в качестве “сторожевых” фенотипов моногенные генодерматозы, распространенность которых оценивалась в исследуемых популяциях.

Моногенные дерматозы, например, различные формы ихтиоза, буллезного эпидермолиза, в первом приближении не используются в качестве “сторожевых” или “индикаторных” фенотипов для оценки динамики параметров генетического груза [4] в силу невысокой распространенности в популяциях, трудностей ее оценки в связи с необходимостью высококвалифицированного подхода при диагностике различных форм этих патологий. Однако авторы данной работы предлагают показать приемлемость генодерматозов, при соблюдении вышеописанных условий, в качестве маркеров при исследовании генетической структуры, в данном случае подразделенности популяции, для оценки степени генетической безопасности населения.

Целью данной работы стало исследование влияния элементов инфраструктуры как одной из причин генетической подразделенности малочисленных популяций, на отягощенность популяций наследственной патологией с использованием моногенных дерматозов как маркеров.

Материалы и методы

В настоящем исследовании использованы материалы экспедиций 2008–2010 гг. из всех 27 районов Харьковской области. Для изучения распространенности моногенных дерматозов [5]: простого аутосомно-доминантного (ОМIM 146700) и X-сцепленного (ОМIM 308100) ихтиоза, аутосомно-доминантного простого (типы Вебера-Коккейна, ОМIM 131800 и Кобнера, ОМIM 131900) и аутосомно-рецессивного дистрофического буллезного эпидермолиза (формы Аллопо-Симена, ОМIM 226600 и претибиальная ОМIM, 131850) в результате скрининга населения всех районов Харьковской области проведен сплошной учет больных с одновременной экспертной оценкой 277 амбулаторных карт, а также историй болезней пациентов, находящихся под наблюдением в Харьковском областном клиническом кожновенерологическом диспансере №1 и районных диспансерах г. Харькова и Харьковской области. При накоплении первичной информации динамичные осмотры больных и родственников и анализ генеалогической информации, полученной путем их личного опроса, позволили точно установить все формы исследуемых генодерматозов во всех населенных пунктах области.

Данные о численности населения, площади и количестве населенных пунктов районов были получены в Главном управлении статистики Харьковской области. Для оценки линейной связи между двумя признаками рассчитывали коэффициент корреляции Пирсона. Статистический анализ многомерных корреляционных связей применяли для получения коэффициентов множественной корреляции. Проверку гипотез осуществляли на уровне значимости не менее 0,05 [6].

Результаты и обсуждение

Изучение генетической структуры популяций традиционно начинают с таких характеристик популяционной структуры, как размер, изоляция расстоянием, показатели миграции, коэффициент инбридинга и других. Эти параметры, в свою очередь, задаются территориально-географическими особенностями существования популяции в определенные временные интервалы, что в целом и определяет генетическую отягощенность населения моногенной наследственной патологией, создающую угрозу генетической безопасности населения.

По данным ряда авторов [1, 7], анализ коэффициентов корреляции при анализе взаимосвязи размеров районов, физических и генетических расстояний между ними, позволяет предположить, что кроме географических расстояний и размера, существенным изолирующим механизмом и причиной разного уровня генетической подразделенности популяции на субпопуляции выступают элементы и объекты инфраструктуры.

Для описания влияния подразделенности харьковской популяции на ее генетическую структуру, более адекватно, чем панмиктическая модель, может подходить островная модель [7], предполагающая подразделение ее на большую панмиктическую популяцию и небольшие субпопуляции, с примерно одинаковой эффективной численностью и интенсивностью обмена генами друг с другом и с “популяцией-материком”. Кроме “ближних” миграций, все популяции испытывают одинаковое давление “дальних” миграций. Однако,

Таблица 1

Характеристика районов Харьковской области: параметры инфраструктуры и наследственной патологии на примере генодерматозов

Район области	Плотность сел (1 сел/км ²)	Плотность населения (тыс/км ²)	Плотность дорог (км/км ²)	Буллезный эпидермолиз (дом, рец.)		Ихтиоз (дом, X-сц рец)	
Балаклеяский	1/28,8	46,5	0,266	2	0	30	8
Барвенковский	1/22,3	23,16	0,235	0	0	11	2
Близнюковский	1/14,1	18,62	0,257	0	0	12	1
Богодуховский	1/13,9	41,6	0,293	0	0	17	3
Боровской	1/22,6	20,7	0,312	0	0	7	0
Валковский	1/9,9	34,7	0,275	0	0	9	1
Вел.Бурлукский	1/14,5	21,7	0,225	0	0	5	2
Волчанский	1/19,1	27	0,141	1	1	6	4
Двуречанский	1/20,9	18,9	0,233	0	0	15	4
Дергачевский	1/14,3	107	0,306	1	0	-	-
Зачепиловский	1/20,8	22,6	0,378	0	0	-	-
Змиевской	1/17,5	57,5	0,205	0	0	14	3
Золочевский	1/13,0	32,9	0,254	1	0	1	2
Изюмский	1/26,7	47,4	0,247	0	1	23	1
Кегичевский	1/19,5	30,1	0,392	0	0	3	0
Красноградский	1/15,2	56,4	0,434	0	0	10	1
Краснокутский	1/15,8	30,1	0,194	0	0	2	1
Коломакский	1/9,7	26	0,291	0	0	-	-
Купянский	1/18,7	20,9	0,251	0	0	8	0
Лозовской	1/16,7	22,9	0,364	1	0	11	2
Нововодолажский	1/20,4	33,6	0,273	0	0	19	4
Первомайский	1/21,6	16,2	0,32	0	0	13	0
Печенежский	1/39,2	24	0,187	0	0	-	-
Сахновщинский	1/18,3	22,3	0,314	3	0	-	-
Харьковский	1/13,5	127,7	0,590	4	2	-	-
Чугуевский	1/28,8	42,6	0,254	0	0	-	-
Шевченковский	1/16,3	23	0,303	0	0	7	1

следует ожидать, что когда интенсивность миграций между соседними субпопуляциями существенно превышает давление “дальних”, изоляция будет снижать внутрипопуляционное генное разнообразие.

Мониторинг генетического разнообразия генофондов субпопуляций — районов области, таким образом, можно начать с оценки плотности населения, плотности населенных пунктов как параметров их инфраструктуры. Кроме того, для всех районов области подсчитан такой показатель инфраструктуры, как плотность дорог на 1 км² площади, для чего была измерена протяженность автомобильных и железных дорог районов (табл. 1).

Достоверный коэффициент корреляции получен при анализе взаимосвязи удельной плотности дорог в районах области и плотности населения этих районов. Прямая средней степени корреляция, $r=0,58\pm 0,16$ ($\kappa=25$, $t_{\phi}=3,61$, $t_{\text{ст}}=2,06$, $p<0,05$) показывает очевидную предпочтительность жителей области проживать в населенных пунктах с более развитой инфраструктурой.

Однако недостоверность корреляции между такими параметрами, как удельная плотность дорог в районах области и плотности малых населенных пунктов, далее условно — сел, $r=0,22\pm 0,19$ ($\kappa=25$, $t_{\phi}=1,14$, $t_{\text{ст}}=2,06$, $p>0,05$), может свидетельствовать о недостаточном развитии как центральных, так и периферийных транспортных магистралей регионов области, что является изолирующим механизмом, приводящим к территориально-географической разобщенности субпопуляций.

Анализ многомерных корреляционных связей показал зависимость между 3 признаками: численностью больных моногенными дерматозами, плотностью дорог и плотностью сел для всех форм буллезного эпидермолиза и аутосомно-доминантного ихтиоза (табл. 2). Очевидно, чем выше плотность сел и плотность дорог, тем чаще мигрируют больные с более легкими доминантными формами исследуемых генодерматозов. Для тяжелого рецессивного буллезного эпидермолиза коэффициент множественной корреляции несколько ниже, и отмечается он в районах с пониженной плотностью сел и дорог, а все больные являются сегрегантами в семьях фенотипически здоровых родителей. Для Х-сцепленного рецессивного ихтиоза не обнаружено множественной корреляции с исследуемыми параметрами инфраструктуры.

Таблица 2

**Параметры множественной корреляции между 3 признаками
“генодерматоз — плотность дорог — плотность сел”**

Генодерматоз	Тип наследования	r	t _ф	t _{ст}	κ	p
Буллезный эпидермолиз	Аут-доминант	0,49	2,76	2,06	24	<0,05
	Аут-рецессив	0,39	2,10	2,06	24	<0,05
Ихтиоз	Аут-доминант	0,47	2,20	2,11	17	<0,05
	Х-сцепл рецессив	0,43	2,00	2,11	17	>0,05

Примечание: r — коэффициент множественной корреляции, κ — число степеней свободы, t — критерий Стьюдента, p — уровень значимости.

В то же время отмечаются парные отрицательные слабые линейные корреляции между числом больных этой формой ихтиоза и плотностью сел, $r = -0,28 \pm 0,22$, между числом больных X-сцепленного ихтиозом и плотностью дорог, $r = -0,35 \pm 0,22$.

Полученные результаты позволяют заключить, что варьирование в отягощенности населения Харьковской области аутосомно-доминантными, аутосомно-рецессивными и X-сцепленными рецессивными формами генодерматозов как маркеров наследственной патологии в значительной степени объясняется различиями в инфраструктуре субпопуляций, которая непосредственным образом влияет на уровень их генетической подразделенности. Такие же тенденции ранее были отмечены для сельских популяций Средней Азии и Северной Европы, характеризующихся высокими значениями параметров генетического груза. Для решения подобных проблем общей и личной генетической безопасности населения можно воспользоваться результатами проведенного анализа, указывающими на возможные пути снижения частоты рецессивной патологии за счет развития коммуникационных сетей региона.

Литература

1. *Атраментова Л.А.* Брачная структура населения г. Харькова в отношении генетически значимых социально-демографических признаков // Генетика. — 1991. — Т.27, №5. — С. 920–927.
2. *Вилькер А.Л.* Генетико-демографічні процеси в популяціях малих міст та сіл Східної України: автореф. дис. канд. біол. наук: 03.00.15 — Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна. — Х., 2001. — 18 с.
3. *Ревазов А.А., Парадеева Г.М., Ельчинова Г.И.* Медико-генетическое изучения населения Костромской области // Генетика. — 1988. — Т. XXIV, №11. — С. 2035–2041.
4. *Федота А.М., Козлов А.Н.* Исследование уровня генетической безопасности городского населения // Цитология и генетика. — 2005. — Т.39, №4. — С. 41–44.
5. *Рыжко П.П., Федота А.М., Воронцов В.М.* Генодерматозы: буллезный эпидермолиз, ихтиоз, псориаз. — Харьков: Фолио. — 2004. — 334 с.
6. *Атраментова Л.О., Утевська О.М.* Статистичні методи в біології. — Х., 2007. — 288 с.
7. Динамика популяционных генофондов при антропогенных воздействиях / Под ред. Ю.П. Алтухова. — М.: Наука. — 2004. — 619 с.

Резюме

Показано влияние элементов инфраструктуры, как одной из причин генетической подразделенности малочисленных популяций, на отягощенность субпопуляций наследственной патологией с использованием моногенных дерматозов как маркеров в Харьковской области.

Показано вплив елементів інфраструктури, як фактора генетичної підрозділеності малочисельних популяцій, на обтяженість субпопуляцій спадковою патологією з використанням моногенних генодерматозів як маркерів у Харківській області.

It has shown that genetical subdivision of subpopulations is dependent on geographical and some other factors and on the load of monogenic genodermatoses as markers in the Kharkov province.

ФИЛИПЦОВА О.В.¹, ЛУЧКО Е.Н.², АТРАМЕНТОВА Л.А.²

¹*Национальный фармацевтический университет,
Украина, 61002, Харьков, ул. Пушкинская, 53*

²*Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина,
Украина, 61077, Харьков, пл. Свободы, 4, e-mail: ekaterina_luchko@mail.ru*

ПОПУЛЯЦИОННО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПОКАЗАТЕЛЕЙ АГРЕССИВНОСТИ И ЭМПАТИИ У ЧЕЛОВЕКА

В человеке заложены способности как к просоциальному, так и к антисоциальному поведению. Высшей формой проявления антисоциального поведения является агрессивность. Признано, что человек по своей биологической природе — существо весьма агрессивное и эта агрессивность обусловлена самой эволюцией *Homo sapiens* как биологического вида. Агрессивное поведение — один из видов мотивационного поведения — вызывает постоянный интерес, время от времени обостряющийся. Особенно это относится к агрессивному поведению человека, которое может включать не только нападение как таковое, но и элементы психологического порядка. Агрессия может быть физической (удар в лицо), вербальной (словесное оскорбление) и непрямой (повреждение собственности жертвы), проактивная, если она происходит в отсутствие провокации, и реактивной, если она является реакцией на предшествующую провокацию. Объективное знание о природе агрессивности необходимо социологам, воспитателям, управленцам и др. Познав природу агрессивности, генетический контроль её физиолого-биохимических механизмов, можно найти способы управлять ею в позитивном смысле. Агрессивному поведению человека посвящено множество работ зарубежных учёных. В нашем отечестве (бывшем СССР) тема агрессивности человека считалась епархией обществоведов, идеологов, а на биологические исследования этого явления был наложен негласный запрет.

Высшей формой проявления просоциального поведения является эмпатия, которая представляет собой способность к сопереживанию и сочувствию. Эмпатия означает временное проживание в жизни другого человека, осторожное перемещение в ней без того, чтобы делать какие-то оценки. Актуальность данного вопроса заключается в том, что эмпатия как эмоциональная единица была введена сравнительно недавно и является тем понятием, которое недостаточно изучено в области экспериментальной психологии и генетики. Современные исследователи, придерживающиеся теории множественного интеллекта, считают, что эмпатия является неотъемлемой составляющей эмоционального интеллекта. Учёные не пришли к единому мнению, являются ли эмпатические реакции врождёнными или они приобретаются в ходе развития, но их раннее появление в онтогенезе не подлежит сомнению. В области терапевтической психологии и подготовки консультантов об эмпатии написано очень много. Однако в современной литературе по генетике поведения имеется очень скудная информация о данной проблеме.

Как любой признак, если его рассматривают генетики, агрессивность и эмпатия представляют собой продукты взаимодействия наследственности и среды, однако, работ, посвященных генетическим основам эмпатии в мировом банке данных мы, к сожалению, не обнаружили. В бывшем СССР изучение агрессивности и эмпатии человека с позиций генетики не проводилось по идеологическим причинам. Большинство работ по генетике агрессивности и эмпатии выполнены зарубежными исследователями. Зная природу агрессивности и генетический контроль её физиолого-биохимических механизмов можно найти способы управлять ею в позитивном смысле. Такие исследования в Украине важны широкому кругу специалистов (криминологом, психиатрам, социологам) для решения практических задач, а также в теоретическом плане, так как пополнят банк мировых данных по этому вопросу. Все вышеуказанное свидетельствует об актуальности психогенетических исследований про- и антисоциальных форм поведения в украинском населении.

Целью исследования — получить коэффициенты наследуемости показателей агрессивности и эмпатии и выполнить регрессионный анализ в населении Харьковской области.

Материалы и методы

В исследовании приняли участие 741 мужчина и 1501 женщина в возрасте от 14 до 72 лет, жителей Харькова и Харьковской области, давших информированное согласие на исследование. Проверку распределения изучаемых количественных признаков на соответствие нормальному закону проводили методом Колмогорова-Смирнова. Связь между признаками в зависимости от характера их распределения оценивали с помощью коэффициента корреляции Пирсона (r) и Спирмена (ρ). Показатель наследуемости рассчитывали с использованием коэффициентов корреляции между родственниками с поправкой на коэффициент брачной ассортативности [Фалконер]. Проверку статистических гипотез проводили с использованием критериев t и χ^2 . База данных сформирована в программе Microsoft Excel. Расчёты выполнены в программе Biostat.

Результаты и обсуждение

Генетической характеристикой признака сложной наследственной природы служит коэффициент наследуемости. Он показывает, в какой степени фенотипические различия между индивидами обусловлены разницей в их генотипах, и в какой — от комплекса факторов, обозначаемых как средовые.

Результаты регрессионного анализа имеют значение для индивидуального прогнозирования признака потомка в зависимости от его выраженности у родителя. В повседневной жизни большинство обращений в медицинские и образовательные учреждения в связи с проблемами детей осуществляется матерями, поэтому выполнить прогноз потомства по матери проще. Кроме этого, современные семьи нередко неполные, и воспитанием ребёнка занимается именно мать, что также может усиливать сходство потомков с ней, вне зависимости от того, какой оно больше природы — генетической либо средовой.

Таблица 1

Результаты регрессионного анализа для прогноза поведенческих признаков в парах “родитель-потомок”

Вид агрессивности	Мать-дочь		Отец-дочь	
	<i>A</i>	<i>b</i>	<i>A</i>	<i>B</i>
Реактивная	3,3	0,34	1,9	0,52
Физическая	2,7	0,34	3,6	0,40
Косвенная	3,6	0,28		
Вербальная	5,1	0,26	4,7	0,36
Общая (по Ассингеру)	28,5	0,25		

Примечание. *a*, *b* — коэффициенты уравнения регрессии $y = a + bx$, *y* и *x* — значение признака и у потомка и у родителя соответственно.

Таблица 2

Результаты компонентного разложения фенотипической дисперсии

Поведенческий признак	G_A , %	G_D , %	G_{int} , %	E , %
Спонтанная агрессивность	26		26	74
Реактивная агрессивность	72		72	28
Физическая агрессия	56	28	84	16
Косвенная агрессия	44	4	48	52
Вербальная агрессия	30	8	38	62
Общая агрессия (по Ассингеру)	34		34	66
Эмпатия (по Меграбяну-Эпштейну)	36	100	100	

Примечание. G_{tot} — общий генетический компонент, G_A — аддитивная составляющая генетического компонента, G_D — доминантная составляющая генетического компонента, E — средовый компонент.

Поскольку в настоящем исследовании больше участвовало женщин, то соответственно, выполнение регрессионного анализа было возможным для пар “мать — дочь”, которых было большинство, а также “отец — дочь”. Результаты регрессионного анализа приведены в табл. 1.

Результаты корреляционного анализа и выполненной на его основе оценки наследуемости в отношении про- и антисоциальных форм поведения можно трактовать следующим образом. Формальный расчёт аддитивной и доминантной составляющей дал бы нам значение коэффициента наследуемости эмпатии, равное 1,40, т.е. превышающее 1, что лишено генетического смысла. В то же время известны работы западных генетиков, в которых обнаружены ассоциации альтруистического поведения с геном хромосомы 11, кодирующим один из рецепторов дофамина (Ebstein, 1996).

По полученным нами результатам фенотипические различия по уровню агрессивности в изученном населении примерно от трети до трёх четвертых зависят от генетических различий между людьми (табл. 2). По результатам многочисленных зарубежных исследований, наследуемость агрессивности

составляет от 44% до 72% (Bergeman, 1998). Фенотипические различия по уровню агрессивности в изученном населении примерно от трети до трёх четвёртых зависят от генетических различий между людьми.

Выводы

В результате популяционно-генетического исследования населения Харьковской области получены коэффициенты наследуемости, выведены коэффициенты регрессии.

1. Наследуемость спонтанной агрессивности составляет — 26%, реактивной — 72%, физической — 84%, косвенной — 48%, вербальной — 38%, общей агрессивности — 34%. Наследуемость эмпатии практически 100%.

2. Полученные уравнения регрессии в парах “родитель — потомок” могут использоваться для прогноза этого признака в следующем поколении.

Литература

1. *Бэрн Р., Ричардсон Д.* Агрессия.— СПб.: Питер, 2001.— 352 с.
2. *Сидоренко Е.В.* Методы математической обработки в психологии.— СПб: ООО “Речь”, 2001.— 350 с.
3. *Лоренц К.* Агрессия (так называемое “зло”).— М., 1994.— 269 с.
4. *Малых С.Б., Егорова М.С., Мешкова Т.А.* Основы психогенетики.— М, 1998.
5. *Фалконер Д.С.* Введение в генетику количественных признаков / Пер. С англ. А.Г. Креславского и В.Г. Черданцева.— М.: ВО “Агропромиздат”, 1985.— С. 486.
6. *Bergeman C.S., Seroczynski A.D.* Genetic and environmental influences on aggression and impulsivity / In: *Neurobiology and Clinical Views on Aggression and Impulsivity*, edited by Maes M., Coccaro E.F.— Chichester, UK, Wiley, 1998, pp. 63–80.
7. *Malaspina D., Reichenberg A., Weiser M. et al.* Paternal age and intelligence: implications for age-related genomic changes in male germ cells // *Psychiatr. Genet.*— 2005.— Vol.15.— P. 117–125.
8. *Rogers C.R.* A way of being // Boston: Houghton Mifflin.— 1980.
9. *Rogers C.R.* Empatic: an unappreciated way of being // *The Counseling Psychologist.*— 1975.— Vol.5, №2.— P. 2–10.
10. *Micrek K.A., Maxson S.C., Fish E.W.* Aggressive behavioral phenotypes in mice // *Behavior brain.*— 2001.— Vol.125, №1-2.— P. 167–181.

Резюме

В бывшем СССР изучение агрессивности и эмпатии человека с позиций генетики не проводилось. Большинство работ по генетике агрессивности и эмпатии выполнены зарубежными исследователями. Такие исследования в Украине важны широкому кругу специалистов для решения практических задач, и в теоретическом плане, так как пополняют банк мировых данных по этому вопросу.

У колишньому СРСР вивчення агресивності і емпатії людини з позицій генетики не проводилося. Більшість робіт з генетики агресивності і емпатії виконані закордонними дослідниками. Такі дослідження в Україні важливі широкому колу фахівців (кримінологам, психіатрам, соціологам) для рішення практичних задач, і у теоретичному плані, тому що поповнюють банк світових даних по цьому питанню.

In the former USSR the study of human aggression and empathy from genetics positions was not conducted. Majority of research on genetics of aggression and empathy is made by the foreign scientists. Such research in Ukraine is important for broad circle of the experts (criminologists, psychiatrists, sociologists) for the practical problems solution, and in the theoretical plan, as it will supplement world data bank on this problem.

ШАПОШНИК Л.А., ЛИЛО В.В., ЛУКАШ Л.Л.

*Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,
Україна, 03680, Київ-143, вул. Акад. Заболотного, 150,
e-mail: lukash@imbg.org.ua*

ОПТИМІЗАЦІЯ МЕТОДІВ ЛІКУВАННЯ ОНКОЛОГІЧНИХ ЗАХВОРЮВАНЬ В ЗАЛЕЖНОСТІ ВІД РІВНЯ ЕКСПРЕСІЇ O⁶-АЛКІЛГУАНІН-ДНК АЛКІЛТРАНСФЕРАЗИ У КЛІТИНАХ ПУХЛИНИ

Різноманітні алкілувальні сполуки, як природні, так і штучно синтезовані, надзвичайно поширені у навколишньому середовищі. Одним з найнебезпечніших їхніх впливів на спадковий матеріал є алкілування O⁶-позиції гуаніну в клітинній ДНК. При подальшій реплікації це призводить до помилкового розпізнавання такого гуаніну ДНК-полімеразою як тиміну і спарювання із аденіном, що призводить до мутації ГЦ→АТ типу транзиції. У відновленні таких пошкоджень важливу роль відіграє фермент O⁶-алкілгуанін-ДНК алкілтрансфераза (АГТ, MGMT) [1]. Якщо на цьому етапі ензим з якихось причин не виконує своєї функції, то, з високою долею ймовірності, клітина втягуватиметься в апоптоз або онкогенну трансформацію [2]. Таким чином, чутливість клітини до алкілюючих агентів залежить від рівня експресії та активності АГТ. Це має велике значення при лікуванні злоякісних пухлин, тому що найбільш поширені групи хіміопрепаратів (похідні нітрососечовини, хлоретилуючі сполуки) мають саме алкілувальний механізм дії [3]. Отже, вивчення індивідуальних особливостей експресії АГТ допоможе оптимізувати схеми лікування таких захворювань.

Про фермент АГТ, що кодується геном *MGMT*, відомо вже досить багато. Ген картований на довгому плечі 10 хромосоми [4]. Розшифрована структура ензиму у різних класів живих організмів. АГТ виявляється у ядрі і цитоплазмі клітини. Він взаємодіє з ДНК, не порушуючи її структуру, переносить алкілну групу від гуаніну на свій активний цистеїновий залишок, внаслідок чого незворотньо інактивується.

Численні дослідження виявили, що вміст ензиму у різних людей та у різних органах і тканинах однієї людини неоднаковий: найвищий — у печінці, найнижчий — у нервовій тканині та кістковому мозку. Рівень експресії АГТ у злоякісних клітинах часто відрізняється від рівню експресії у нормальних клітинах данного організму і подібних пухлинних клітин інших пацієнтів [5]. За ознакою наявності експресії виділяють АГТ-позитивні та АГТ-негативні генотипи (Mer⁺ та Mer⁻ відповідно). Доля пухлин, що не експресують ензим, найбільша серед гліом (33–40%) та колоректальних карцином (40%) [6, 7]. Інактивацію гена *MGMT* найчастіше пов'язують із гіперметилуванням промотора, особливо сайту 25 CpG. В 43% АГТ-дефіцитних клітин виявлено метилування більш, ніж 50% сайтів промотора, тоді як серед АГТ-позитивних клітин таких лише 9% [8–12]. Відомо безліч факторів, що впливають на експресію гена *MGMT*. Серед таких зазначаються

одноланцюгові розриви ДНК, мутації у промоторі. Важливу роль у регуляції експресії гена відіграє білок p53 [13, 14]. А нещодавно встановлено, що, наприклад, наявність ядерного фактору NF-kB в ядерному матриксі спричиняє експресію MGMT у гліомах і культурах пухлинних клітин незалежно від метилування промотора [15]. Фосфорилування інгібує ензим, дефосфорилювання лужними фосфатами — підвищує його активність [16].

Пухлини, клітини яких не експресують MGMT, високочутливі до хіміопрепаратів із алкілувальним механізмом дії. Але значний відсоток пухлин виявляє дуже високі рівні активності ензиму, не характерні для жодної з нормальних тканин [17]. У таких випадках проблему підвищення ефективності лікування намагаються вирішити за допомогою різних інгібіторів активності ензиму (псевдосубстратів). Вони мають високу спорідненість до АГТ і після введення в організм зв'язуються з ензимом та інактивують його. Здатність цих речовин проникати через гематоенцефалічний бар'єр важлива для лікування мозкових пухлин [18]. При їх комбінації з хіміопрепаратами досягаються значно кращі результати. На цей час синтезовано багато псевдосубстратів, які відрізняються за активністю і токсичністю [19]. До фази клінічних випробовувань дійшов поки тільки O⁶-бензилгуанін. Істотним недоліком всіх інгібіторів активності є їхня невибірковість. В першу чергу від виснаження запасів АГТ страждають тканини з низьким рівнем ферменту (гемопоетичні клітини, особливо — клони з коротким мітотичним циклом CD34⁺). Активність фермента у них знижується майже до нуля [20]. Це робить кістковий мозок значно чутливішим до шкідливої дії хіміопрепаратів — дозозалежна мієлосупресія з'являється при введенні нижчих доз, частіше виникають вторинні пухлини, в т.ч. гострі мієлоїдні лейкози.

Зараз ведеться пошук псевдосубстратів із більш вибірковою дією. Нині вони ще не знайдені, тому пригнічення гемопоезу намагаються уникнути за допомогою методів генної інженерії та клітинної терапії [21]. Для цього використовують мутантні форми АГТ, які не зв'язуються з O⁶-бензилгуаніном (G156A, Y158H, I140K). Гемопоетичні клітини з таким геном трансплантуються хворим і функціонують під час курсу хіміотерапії. Рівень активності АГТ в них не змінюється під впливом O⁶-бензилгуаніну, і клітини кісткового мозку значно менше уражуються через мутагенну та цитотоксичну дію алкілувальних препаратів [22–24].

Після закінчення курсу хіміотерапії виникає необхідність відновити активність АГТ, зокрема, шляхом стимуляції експресії гена. Зараз пропонуються різні методи, але вони поки що не набули широкого розповсюдження. Наприклад, підвищення рівня ензиму у людських лейкоцитах після використання O⁶-бензилгуаніну було отримано за допомогою попередників цистеїну (2-оксотіазолідін-4-карбоксильна кислота, N-ацетил-L- цистеїн), природних антиоксидантів (куркумін, сілімарин та ін.) [25], водних та спиртових екстрактів деяких лікарських рослин (орегано, м'ята, базилік, *Azadirachta indica*, *Osimum sanctum*, *Withania somnifera* та ін.) [26].

Література

1. Pegg A. E. Mammalian O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase: regulation and importance in response to alkylating carcinogenic and therapeutic agents // *Cancer Res.*— 1990.— №50.— P. 6119–6129.
2. Tong G.T., Kirk M.C., Ludlum D.B. Formation of the cross-link 1-N³-deoxycytidyl,2-[N¹-deoxyguanosinyl]ethane in DNA treated with N,N-bis(2-chloroethyl)-N-nitrosourea // *Cancer Res.*— 1982.— Vol.42, №8.— P. 3102–3105.
3. Drablos F., Hoppel C.L., Willson J.K.V. Alkylation damage in DNA and RNA-repair mechanisms and medical significance // *DNA Repair (Amst).*— 2004.— Vol.3, №4.— P. 1389–1407.
4. Natarajan A.T., Vermeulen S., Darroudi F., Valentine M.B., Brent T.P., Sankar Mitra A.S., Tano K. Chromosomal localization of human O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) gene by in situ hybridization // *Mutagenesis.*— 1992.— Vol.7, №1.— P. 83–85.
5. Citron M., Graver M., Schoenhaus M., Chen S., Decker R., Kleynerman L., Kahn L.B., White A., Fornace A.J., Yarosh D. Detection of messenger RNA from O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase gene MGMT in human normal and tumor tissues // *J. Natl. Cancer Inst.*— 1992.— Vol.84, №5.— P. 337–340.
6. Silber J.R., Blank A., Bobola M.S., Muelleri B.A., Kolstoe D.D., Ojemann G.A., Berger M.S. Lack of the DNA repair protein O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase in histologically normal brain adjacent to primary human brain tumors // *Biochemistry.*— 1996.— №93.— P. 6914–6946.
7. Herman J.G., Esteller M., Hamilton S.R., Burger P.C., Baylin S.B. Inactivation of the DNA repair gene O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia // *Cancer Res.*— 1999.— №59.— P. 793–797.
8. Zawlik I., Vaccarella S., Kitaa D., Mittelbronn M., Franceschia S., Ohgaki H. Promoter methylation and polymorphisms of the MGMT gene in glioblastomas: A population-based study // *Neuroepidemiology.*— 2009.— №32.— P. 21–29.
9. Karayan-Tapon L., Long L. Correlation of clinical features and methylation status of MGMT gene promoter in glioblastomas // *J. NeuroOncol.*— 2004.— Vol.68, №3.— P. 274–283.
10. Smith-Sorensen B., Lind G.E., Skotheim R.I., Fossa S.D., Fodstadl Q., Stenwig A.-E., Jakobsen K.S., Lothe R.A. Frequent promoter hypermethylation of the O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) gene in testicular cancer // *Oncogene.*— 2002.— Vol.21, №57.— P. 8878–8884.
11. Mollemann M., Wolter M., Jorg Felsberg J., Collins V.P., Reifemberger G. Frequent promoter hypermethylation and low expression of the MGMT gene in oligodendroglial tumors // *Intern. J. Cancer.*— 2004.— Vol.113, №3.— P. 379–385.
12. Ingold B., Schraml P., Stopatschinskaja S., Heppner F.L., Moc H. Frequent MGMT gene promoter methylation in brain metastases of melanoma, lung, breast and renal carcinoma // *J. Clin. Oncol.*— 2008.— №26.— P. 2063.
13. Ogino F., Shuji S.A., Hazra O., Aditi T., Tranah S.C., Gregory J., Kirkner G., Gregory J., Kawasaki D., Takako C., Noshio N., Katsuhiko B., Ohnishi N., Mutsuko A., Suemoto B., Yuko X., Meyerhardt F., Jeffrey A., Hunter, David J., Fuchs R., Charles S. MGMT germline polymorphism is associated with somatic MGMT promoter methylation and gene silencing in colorectal cancer // *Carcinogenesis.*— 2007.— №9.— P. 1985.
14. Grombacher T., Eichhorn U., Kaina B. p53 is involved in regulation of the DNA repair gene O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) by DNA damaging agents // *Oncogene.*— 1998.— Vol.17, №7.— P. 845–851.

15. Lavon I., Fuchs D., Zrihan D., Efroni G., Zelicovitch B., Fillig Y., Siegal T. Novel mechanism whereby nuclear factor kB mediates DNA damage repair through regulation of O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase // *Cancer Res.*— 2007.— Vol.67, №18.— P. 8952–8959.
16. Srivenugopal K.S. Mullapudi S.R.S., Shou J., Hazra T.K., Ali-Osman F. Protein phosphorylation is a regulatory mechanism for O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase in human brain tumor cell // *Cancer Res.*— 2000.— Vol.60, №2.— P. 282–287.
17. Bobola M.S., Berger M.S., Ellenbogen R.G., Roberts T.S., Geyer J.R., Silber J.R. O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase in pediatric primary brain tumors // *Clin. Cancer Res.*— 2001.— №7.— P. 613–619.
18. Dolan M.E., Moschel R.C., Pegg A.E. Metabolism of O⁶-benzylguanine, an inactivation of O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase // *Cancer Res.*— 1994.— Vol.91, №9.— P. 5123–5130.
19. Nelson M.E., Dowlati A., Haaga J., Remick S.C., Spiro S.L. 2-amino-O4-benzylpteridine derivatives: potent inactivators of O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase // *J. Med. Chem.*— 2004.— Vol.47, №15.— P. 3887–3891.
20. Gerson S.L., Phillips W., Kastan M., Dumenco L.L., Donovan C. Human CD34⁺ hematopoietic progenitors have low cytokine-unresponsive O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase and are sensitive to O⁶-benzylguanine plus BCNU // *Blood.*— 1996.— Vol.88, №5.— P. 1649–1655.
21. Licht T., Koc O.N., Davis B.M., Gupta E. *In vivo* drug-selectable genes: a new concept in gene therapy // *Stem Cells.*— 1997.— Vol.15, №2.— P. 104–111.
22. Wibley J.E., Pegg A.E., Moody P.C. Crystal structure of the human O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase // *Nucl. Acids Res.*— 1993.— Vol.32, №45.— P. 11998–12006.
23. Xu-Welliver M., Kanugula S., Pegg A.E. Isolation of human O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase mutants highly resistant to inactivation by O⁶-benzylguanine // *Cancer Res.*— 1998.— Vol.58, №9.— P. 1936–1945.
24. Rabik C.A., Njoku M.C., Dolan M.E. Inactivation of O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase as a means to enhance chemotherapy // *Cancer Treat. Rev.*— 2006.— №32.— P. 261–276.
25. Niture S.K., Velu C.S., Smith Q.R., Bhat G.J., Srivenugopal K.S. Increased expression of the MGMT repair protein mediated by cysteine prodrugs and chemopreventative natural products in human lymphocytes and tumor cell lines // *Carcinogenesis.*— 2007.— Vol.28, №2.— P. 378–389.
26. Niture S.K., Rao U.S., Srivenugopal K.S. Chemopreventative strategies targeting the MGMT repair protein: augmented expression in human lymphocytes and tumor cells by ethanolic and aqueous extract of several Indian medicinal plants // *Intern. J. Oncol.*— 2006.— №29.— P. 1269–1278.

Резюме

Данная работа посвящена рассмотрению работ, в которых показана зависимость эффективности химиотерапии от уровня экспрессии репаративного энзима АГТ.

Дана робота присвячена огляду робіт, в яких розглядається залежність ефективності хіміотерапії від рівня експресії репаративного ензиму АГТ.

This article deals with consideration of the works describing the dependence of chemotherapeutical efficiency on the expression level of the repair enzyme MGMT in tumor cells.

ШВАЧКО Л.П.

*Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины,
Украина, г. Киев, 03143, ул. Заболотного, 150, e-mail: l.p.shvachko@imb.org.ua*

ПРЕЖДЕВРЕМЕННОЕ РАЗДЕЛЕНИЕ ЦЕНТРОМЕР В РАННЕМ МЕХАНИЗМЕ АНЕУПЛОИДИЙ ПРИ ОНКОЛОГИЧЕСКОЙ ПРОГРЕССИИ

Анеуплоидия — аномальное изменение количества хромосом в кариотипе, ключевая стадия в цитогенетике рака (1–3). Анеуплоидии возникают при нарушении сегрегации реплицированных хромосом между двумя дочерними клетками. Существует целый ряд молекулярных механизмов, индуцирующих анеуплоидии (Gebhart, Liehr, 2000, Fenech, 2002, Leach et al., 2004, Gollin, 2005, Iarmarcovai et al., 2006). Центральное место в механизме анеуплоидий занимает дисфункция центромеры. При делении клетки именно к *центромерам* прикрепляются тянущие нити митотического веретена в ходе *разделения* набора хромосом на два генома, из которых в дальнейшем формируются ядра двух дочерних клеток (Wolfe, 1961; Kubai, 1975). Таким образом, дисфункции *центромеры и связанной с ней кинетохоры* способны вызывать отставание целых хромосом в митотическом делении клетки.

Нами показано, что нарушение функции центромеры при онкологическом процессе носит эпигенетический характер и проявляется в преждевременном разделении центромер и сестринских хроматид на стадии метафазы. Преждевременное разделение центромер можно отнести к скрытой и ранней хромосомальной нестабильности, при которой отсутствуют какие-либо цитогенетические перестройки и число хромосом в кариотипе остается, как правило, неизменным. Нами установлено, что феномен преждевременного разделения центромер при онкологическом процессе ассоциирован с нарушением эпигенетического ДНК метилирования, а именно, существенным деметилированием центромерной сателлитной ДНК.

Материалы и методы

Объектом исследования были соматические лимфоциты периферической крови у пациентов с солидным типом опухолей, карцинома щитовидной железы (n=100), колоректальный рак (n=75), нейробластома (n= 8) и опухоль Вильмса (n=6) у детей.

Контролем служили условно здоровые доноры (n=24), в возрасте от 25 до 40 лет.

Митогенстимулированную фитогемагглютинином (РНА “Р”, Sigma-Aldrich) культуру лимфоцитов получали как описано (4). Геномные ДНК из лимфоцитов крови получали стандартной фенол-хлороформной экстракцией (5). Метил-специфическую эндонуклеазную рестрикцию геномных ДНК с помощью HpaII рестриктазы и Саузерн — гибридизацию с флуоресцентным DIG-pUC(Alu) плазмидным зондом проводили (6). Для анализа использовали флуоресцентную и световую микроскопию, а также электрофорез и электрофоретический перенос на мембрану Hybond из 1,2% агарозного геля.

Результаты и обсуждение

Сателлитная ДНК в составе центромерного и перицентромерного гетерохроматина максимально метилирована и постоянно конденсирована (7), что определяет эти два процесса эпигенетическими и взаимно-обусловленными в механизме митотического деления клетки. Нами показано глобальное гипометилирование сателлитных ДНК повторов в составе центромерного — перицентромерного гетерохроматина при онкологической прогрессии. На рис. 1 методом метил-специфической HpaII-эндонуклеазной рестрикции геномной ДНК с последующей Саузерн-гибридизацией с флуоресцентным молекулярным зондом — DIG-pUC19 (Alu) приведено существенное деметилирование Alu (Sat2) повторов, консенсусных последовательностей, фланкирующих α -сателлитные центромерные ДНК (8, 9).

Как следствие деметилирования центромерной сателлитной ДНК нами обнаружена существенная деконденсация центромерного гетерохроматина метафазных хромосом у пациентов с солидным типом рака (рис. 2, а).

Было показано, что подобное эпигенетическое нарушение структуры центромерного гетерохроматина ассоциируется с видимой декомпактизацией центромер и нарушением их митотической функции как аномальное преждевременное разделение центромер сестринских хроматид на стадии метафазы клеточного цикла (рис. 2, б). С увеличением степени онкологической прогрессии наблюдали появление лимфоцитов с С-анафазным кариотипом (полным преждевременным разделением центромер метафазных хромосом в кариотипе) (рис. 2, с). Нами показано, что появление С-анафаз в популяции метафазных лимфоцитов имеет прогностическое значение в динамике онкологического процесса (10).

Таким образом, результаты исследования могут свидетельствовать о ключевой причинной роли эпигенетического гипометилирования сателлитной

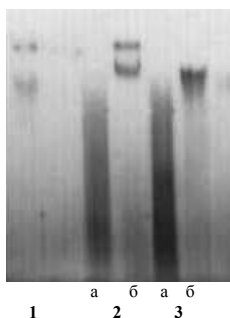


Рис. 1. HpaII-эндонуклеазная рестрикция геномных ДНК с последующей Саузерн-гибридизацией с центромерным Alu ДНК-повтором в составе DIG-pUC (Alu) плазмидного зонда:

1 — Контроль (геномная ДНК донора после HpaII-рестрикции); 2 — эмбриональная ДНК (а — после HpaII-рестрикции, б — до рестрикции); 3 — геномная ДНК пациента с колоректальным раком (а — после HpaII-рестрикции, б — до рестрикции)

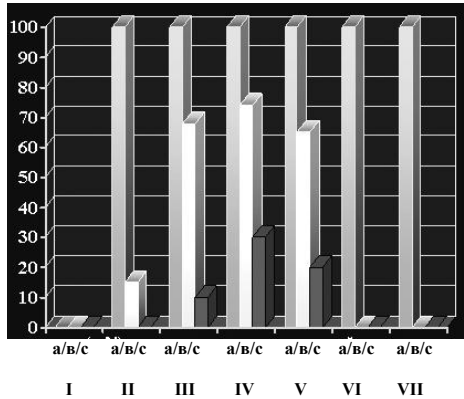


Рис. 2. Особенности нарушения хромосомальной организации центрального гетерохроматина в популяции соматических лимфоцитов периферической крови при солидном типе онкологического процесса:

а — деконденсация центрального гетерохроматина, в — преждевременное разделение центромер сестринских хроматид, с — С-анафазный кариотип на стадии метафазы. I — контроль (n=24); II — микрокарцинома щитовидной железы (n=90); III — карцинома щитовидной железы 1–2 стадии (n=60); IV — карцинома щитовидной железы 3–4 стадии (n=40); V — колоректальный рак (n=75); VI — нейробластома (n=8); VII — опухоль Вильямса (n=6)

ДНК в индукции деконденсации и декомпактизации центрального гетерохроматина и центральной нестабильности, связанной с феноменом преждевременного разделения центромер сестринских хроматид на стадии метафазы. Такой механизм ассоциативно связан с развитием анеуплоидий и их прогрессии при онкологическом процессе.

Литература

1. Duesberg P., Rausch C., Rasnick D., Haehlmann R. Genetic instability of cancer cells is proportional to their degree of aneuploidy // Proc. Natl. Acad. Sci.— 1998.— Vol.95, №6.— P. 13692–13697.
2. Duesberg P., Li R. Multistap carcinogenesis: a chain reaction of aneuploidization // Cell Cycle.— 2003.— Vol.2, №1.— P. 202–210.
3. Rajagopalan H., Lengauer C. Aneuploidy and cancer // Cancer Nature.— 2004.— Vol.432.— P. 338–341.
4. McGregor H.C., Varley J.M. Working with Animal chromosomes // Wiley, New York, 1983.— 280 p.
5. Анализ генома. Методы / Под ред. Дейвиса. Мир, 1990.— 246 с.
6. Маниатис Т., Фрич Э., Сембрук Дж. Молекулярное клонирование. Методы генетической инженерии // Москва: Мир, 1984.— 487 с.
7. Вайсертрейгер С.П., Подгорная О.И., Енукашвили Н.И. ДНК прицентромерных участков конститутивного гетерохроматина деметилирована и деконденсирована в клетках MRC5 и A431 // Цитология.— 2007.— Т.49, №1.— С. 1–5.

8. *Cooper K.F., Fisher R.B., Tyler-Smith C.* Structure of the sequences adjacent to the centromeric alphoid satellite DNA array on the human Y chromosome // *J. Mol. Biol.*— 1993.— Vol.230, N3.— P. 787–799.

9. *Ten Hagen K.G., Gilbert D.M., Willard H.F., Cohen S.N.* Replication timing of DNA sequences associated with human centromeres and telomeres // *Mol. Cell. Biol.*— 1990.— Vol.10, N12.— P. 6348–6355.

10. *Швачко Л.П., Бух И.Г., Степаненко А.П., Гульчий Н.В., Цымбалюк С.Н., Процик В.С., Кыкоть В.А., Климяк Г.И.* Способ ранней диагностики злокачественных опухолей // Декларационный патент Украины на изобретение, 2007, UA 64533.

Резюме

Показано, на уровне лимфоцитов периферической крови при солидной онкопатологии, что принципиальным фактором в индукции центромерной нестабильности — появлении преждевременного разделения центромер сестринских хроматид на стадии метафазы, является потеря эпигенетического метилирования сателлитной ДНК и связанной с этим деконденсации и декомпактизации центромер при онкологическом процессе. Преждевременное разделение центромер рассматривается как механизм канцер-ассоциированных анеуплоидий.

The centromeric heterochromatin can be identified by associated with high DNA methylation of centromeric satellite DNA and its highly condensed. On the level of somatic peripheral blood lymphocytes from the patients with some certain solid cancers have been commonly shown that crucial centromeric satellite DNA demethylation causal linked with centromere decondensation and decompactization resulting in the centromeric instability as the premature centromere division of the metaphase chromosomes as early predisposition to cancer aneuploidy.

ШТАНДЕЛЬ С.А.

ГУ “Институт проблем эндокринной патологии

им. В.Я.Данилевского АМН Украины”,

Украина, 61002, Харьков, ул. Артема, 10, e-mail: shtandel@mail.ru

ЕСТЕСТВЕННЫЙ ОТБОР И САХАРНЫЙ ДИАБЕТ 2 ТИПА. РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ И ГЕТЕРОГЕННОСТЬ

Естественный отбор — процесс, который, будучи наиболее важным фактором эволюции, способствует повышению приспособленности и предотвращает разрушительные последствия всех остальных процессов [1]. При рассмотрении больших популяций человека различают следующие типы отбора: 1) внутригрупповой, основанный на межиндивидуальных различиях в приспособленности (дифференциальное размножение генотипов) и 2) межгрупповой, принимающий во внимание различия в средней приспособленности популяций (дифференциальный естественный прирост отдельных групп) [2–4]. Изменение давления внутригруппового отбора путем успеш-

ного лечения мультифакториальных заболеваний приводит к изменению кривой распределения предрасположенности к данному заболеванию и, следовательно, к увеличению его распространенности. Однако количественная оценка таких изменений затруднена. Сахарный диабет (СД) 2 типа является полигенным признаком [5–7]. Это заболевание, согласно гипотезе J. V. Neel [8–10] возник в результате существования особых генов бережливости, позволяющих человеку эффективно использовать ограниченные пищевые ресурсы, которые в условиях изобилия пищи приводят к развитию диабета. В настоящее время во всем мире отмечается бурный рост распространенности СД 2 типа [11]. Для возникновения такого увеличения частоты СД 2 типа в популяциях помимо факторов внешней среды, способствующих росту распространенности этого заболевания, по всей видимости, необходимо и увеличение популяционной частоты генных комплексов предрасположенности к этому типу диабета. Кроме того, следует отметить и повсеместное распространение тяжелого варианта течения СД 2 типа с развитием абсолютной инсулиновой недостаточности (АИН), вызванную истощением остаточной секреторной функции β -клеток поджелудочной железы и их последующим апоптозом [12, 13]. Результаты исследований свидетельствуют и о повышенном семейном накоплении СД 2 типа у больных СД 2 типа с развившейся АИН [14].

Целью настоящей работы было изучить взаимосвязь направленности отбора на динамику распространенности СД 2 типа и структуру гетерогенности его клинических форм.

Материалы и методы

Был изучен акушерский анамнез у женщин в пострепродуктивном периоде (старше 45 лет): 2106 здоровых жительниц г. Харькова и 537 больных СД 2 типа. Сведения о родственниках 1-й и 2-й степени родства изучены у 45 больных СД 2 типа с длительной инсулинонезависимостью (ДИНЗ) с длительностью заболевания более 20-ти лет и 160 пациентов с СД 2 типа и АИН. Динамика распространенности СД оценивалась по данным официальной статистики [15–17]. “Накопленная” заболеваемость рассчитывалась на основании данных о возрасте начала заболевания согласно 532 историй болезни лиц, находившихся на лечении в ГУ “Институт проблем эндокринной патологии им. В.Я. Данилевского АМН Украины” [18]. Выборка формировалась по первичному обращению в период 2007 г. Показатели “накопленной” заболеваемости СД 2 типа за 1973 г. оценивались по данным о возрасте начала заболевания согласно сведениям из 402 историй болезни за 1973 г., структура клинических вариантов течения СД 2 типа в определялась по данным историй болезни, полученных из архива противозобного диспансера г. Харькова и ГУ “Институт проблем эндокринной патологии им. В.Я. Данилевского АМН Украины”. Рассчитывались относительная адаптивность (w) и коэффициент отбора (s) [19]. Анализ генетического взаимодействия двух вариантов течения СД 2 типа — стабильной инсулинозависимости (ДИНЗ) и формы с развитием АИН проводился путем тестирования

моделей T. Reich'a [20, 21]. Статистическая оценка достоверности различий в сравниваемых группах проводилась при помощи критерия χ^2 [22].

Результаты и обсуждение

Данные, акушерского анамнеза, показатели относительной адаптивности и коэффициентов отбора приведены в таблице 1. Сравнимые группы здоровых и больных СД 2 типа женщин достоверно отличались по количеству родов. Анализ выживаемости потомков здоровых женщин и матерей с СД 2 типа не зафиксировал высокой смертности среди потомков, и был несколько ниже такового у детей здоровых женщин. Представленные в табл. 1 данные указывают на более высокую относительную адаптивность больных СД 2 типа по сравнению со здоровым фенотипом.

Величина коэффициента отбора в группе СД 2 типа была значительно ниже, чем среди здоровых женщин Харьковской области. Таким образом, проведенное исследование показывает, что имеет место положительная направленность отбора СД 2 типа — больные СД 2 типа оставляют больше потомков, чем здоровые, при их практически одинаковой выживаемости, что, в свою очередь и ведет к увеличению в популяции частоты генов предрасположенности к этому типу заболевания.

Для оценки динамики вероятности заболеть на протяжении жизни СД в популяции Харьковской области были рассчитаны показатели “накопленной” заболеваемости в 1973, 1995 и 2007 гг. Повозрастные показатели “накопленной заболеваемости” СД 2 типа среди населения Харьковской области представлены в табл. 2. Увеличение заболеваемости СД 2 типа в равной мере затронуло все возрастные группы. Это свидетельствует о том, что в развитии эффекта участвуют как изменение давления отбора, так и улучшение доступа к медицинской помощи и ее качества. Полученные

Таблица 1

Значения плодовитости ($\bar{x} \pm S_x$) и выживаемости потомков

Показатели		Популяция	СД 2 типа
Беременности		4,06±0,07	4,01±0,11
Роды		1,41±0,02	1,59±0,04*
Спонтанные аборты		0,08±0,01	0,10±0,02
Внематочные беременности		0,03±0,01	0,03±0,01
Женщины, не имеющие детей (%)		12,35±0,72	10,24±1,31
Дети, дожившие до 25 лет (p_s)		0,972	0,966
Дети, умершие до 25 лет (p_d)		0,028	0,034
Относительная адаптивность (w)	Компонента плодовитости	0,887	1
	Компонента выживаемости	1	0,988
	Суммарная приспособленность	0,887	0,988
Коэффициент отбора (s)		0,113	0,012*

Примечание. * — достоверность различий по сравнению с популяцией ($p < 0,001$).

Таблица 2

Повозрастные показатели “накопленной” заболеваемости СД 2 типа среди населения Харьковской области, %

Возрастная группа, годы	1973 год	2007 год
0-9 лет	0,019	0,023
10-19 лет	0,027	0,029
20-29 лет	0,044	0,137
30-39 лет	0,102	0,638
40-49 лет	0,221	1,641
50-59 лет	0,432	2,255
60-69 лет	0,900	2,564
70-79 лет	1,100	2,940
80 лет и старше	—	3,03

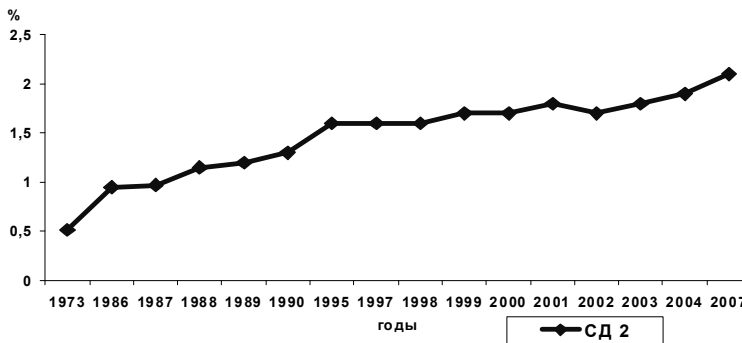


Рис. 1 Динамика распространенности СД 2 типа в популяции Харьковской области

данные подтверждаются сведениями о значительном увеличении распространенности СД 2 типа в популяции Харьковской области за тридцать четыре года с 1973–2007 гг. (рис. 1 и табл. 2). Следовательно, отбор в пользу СД 2 типа позволяет прогнозировать дальнейший рост распространенности этого заболевания в популяциях и с точки зрения генетики объясняет причины резкого роста распространенности этого типа СД в мире.

Увеличение в популяции частоты генов предрасположенности к СД 2 типа, вызванное положительной направленностью отбора, может также быть причиной, обуславливающей клиническую гетерогенность СД 2 типа и вызывающей изменение соотношения вариантов течения заболевания среди всех его случаев на протяжении ряда лет. Для исследования этого аспекта действия отбора рассмотрим особенности генетической гетероген-

Таблица 3

Семейное накопление СД у больных СД 2 типа при наличии и отсутствии АИН

Заболевание у родственников	Класс родственников	Обследуемые больные					
		СД 2 типа со ДИНЗ			СД 2 типа с АИН		
		всего	больные	%	всего	больные	%
СД 2 типа	Родители	88	8	9,09±3,08	319	45	14,11±1,95
	Сибсы	86	6	6,98±2,76	299	26	8,70±1,63
	Деды (бабки)	116	0	0,00±0,85	492	8	1,63±0,57
	Дяди (тети)	200	2	1,00±0,71	863	41	4,75±0,72*
	Всего	490	16	3,27±0,80	1973	120	6,08±0,54*
СД 1 типа	Родители	88	2	2,27±1,60	319	9	2,82±0,93
	Сибсы	86	1	1,16±1,16	299	4	1,34±0,67
	Деды (бабки)	116	0	0,00±0,85	492	4	0,81±0,40
	Дяди (тети)	200	3	1,50±0,86	863	12	1,39±0,40
	Всего	490	6	1,22±0,50	1973	29	1,47±0,27
СД 2 типа с АИН	Родители	88	0	0,00±1,12	319	7	2,19±0,82
	Сибсы	86	0	0,00±1,15	299	8	2,68±0,58
	Деды (бабки)	116	0	0,00±0,85	492	0	0,00±0,20
	Дяди (тети)	200	0	0,00±0,50	863	4	0,46±0,23
	Всего	490	0	0,00±0,20	1973	19	0,96±0,22

* — достоверность различий ($p < 0,02$) по сравнению с больными СД 2 типа со ДИНЗ.

ности СД 2 типа и динамику структуры клинических форм среди всех случаев СД 2 типа.

В последнее время отмечен рост удельного веса варианта течения заболевания с развитием АИН среди всех больных СД 2 типа. Так, если в 1984 г. процент больных с АИН среди всех больных СД 2 типа составлял 22,65%, то в 2007 г. этот показатель вырос до 33,48 % ($\chi^2=10,729$; $p=0,001$). Данные семейного накопления клинических форм СД среди больных с АИН и ДИНЗ (табл. 3) свидетельствуют о большей доле родственников больных СД 2 типа при АИН по сравнению с больными с ДИНЗ. Так как наследование СД 2 типа соответствует параметрам пороговой полигенной модели наследования [5, 6], то необходима проверка возможности существования различных с генетической точки зрения форм патологии, в данном случае ДИНЗ и АИН.

При тестировании вариантов модели Т. Reich'a (табл. 4) соответствие исходным данным показала изокорреляционная модель ($r_g=0,771\pm 0,680$), предполагающая, что из двух изучаемых форм одна является более отягощенной. Согласно исходным данным в качестве "менее отягощенной" можно формально рассматривать форму ДИНЗ, а "более отягощенной" — СД 2 типа

Таблица 4

Анализ взаимосвязи между подверженностями к различным клиническим формам СД 2 типа

Форма СД у пробанда	Форма СД у родителей			Распространенность в популяции, %	Соответствие изокорреляционной модели Т.Reich'a
	ДИНЗ "wide form"	АИН "narrow form"	Всего		
ДИНЗ	2	1	88	0,18	$r_G=0,771\pm 0,680$
АИН	2	7	319	0,77	

с АИН. Следовательно, рост популяционной частоты генов предрасположенности к СД 2 типа, обусловленный положительной направленностью отбора, повышает вероятность их высокой концентрации у пробанда и, таким образом, создает условия для формирования более тяжелого клинического варианта течения СД 2 типа, а также способствует увеличению распространенности АИН среди всех случаев заболевания.

Выводы

Положительная направленность отбора полигенных заболеваний, к которым относится СД 2 типа формирует предпосылки для роста распространенности заболевания в популяции, увеличения в структуре патологии клинических вариантов течения, характеризующихся большим семейным накоплением (АИН при СД 2 типа). Отбор оказывает влияние на динамику распространенности и влияет на формирование гетерогенности полигенных заболеваний, к которым относится и СД 2 типа.

Литература

1. Алтухов Ю.П. Динамика генофондов при антропогенных воздействиях // Вестник ВОГиС.— 2004.— Т.8, №2.— С. 40–59.
2. Курбатова О.Л. Демографическая генетика мегапопуляций: изменчивость параметров отбора // Материалы третьих антропологических чтений к 75-летию со дня рождения академика В.П. Алексеева "Экология и демография человека в прошлом и настоящем". Москва, 15–17 ноября 2004 г.— М., 2004.— С. 259–262.
3. Bodmer W.F., Cavalli-Sforza L.L. Genetics, Evolution, and Man. WH Freeman and Company, San Francisco.— 1976.— 965 p.
4. Фогель Ф., Мотульски А. Генетика человека.— М.: Мир.— 1990.— Т.2.— 378 с.
5. Mc Carthy M., Froguel P., Hitman G.A. The genetics of non-insulindependent diabetes mellitus: tools and aims // Diabetologia.— 1994.— Vol.37.— P. 959–968.
6. Штандель С.А., Атраментова Л.А., Финозенова С.А., Геворкян А.Р. Генетический анализ эндокринных заболеваний щитовидной и поджелудочной желез // Цитология и генетика.— 2000.— Т.34, №3.— С. 34–42.
7. Frayling T.M., McCarthy M.I. Genetic studies of diabetes following the advent of the genome-wide association study: where do we go from here? // Diabetologia.— 2007.— Vol.50, №11.— P. 2229–2233.
8. Neel J.V. Diabetes Mellitus: A "Thrifty" Genotype Rendered Detrimental by "Progress"? // Am. J. Hum. Genet.— Vol.14, №4.— P. 353–362.

9. Knowler W.C., Pettitt D.J., Bennett P.H., Williams R.C. Diabetes mellitus in the Pima Indians: Genetic and evolutionary considerations // *Am. J. Phys. Anthropol.* 1983.— Vol.62, №1.— P. 107–114.
10. Zimmet P., Serjeantson S., King H. et al. The genetics of diabetes mellitus // *Austr. a. N.Z.J. Med.*— 1986.— №3.— P. 419–424.
11. Zimmet P., McCarty D. The NIDDM epidemic: global estimates and projections — a into the crystal ball // *IDF Bulletin.*— 1995.— P. 39–42.
12. U.K. Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33) // *Lancet.*— 1998.— Vol.352.— P. 837–853.
13. Мкртчян А.М. Пероральная терапия сахарного диабета 2 типа // *Лечащий врач.*— 2003.— №10.— С. 32–35.
14. Великих Н.Е., Штандель С.А., Караченцев Ю.И. Семейное накопление сахарного диабета и развитие абсолютной инсулиновой недостаточности у больных сахарным диабетом 2 типа // *Эндокринология.*— 2006.— Т.11, №2.— С. 169–174.
15. Черкасов И.А., Бален С.А., Боровик Л.Н. Основные показатели состояния эндокринологической службы УССР за 1973 год. Харьков.— 1974.— 51 с.
16. Основные показатели специализированной эндокринологической помощи населению Украинской ССР в 1989–1990 гг. Киевский Научно-исследовательский институт эндокринологии и обмена веществ. Киев, 1991.— 30 табл.
17. Тронько М.Д., Чорнобров А.Д. Основні показники діяльності ендокринологічної служби України за 2007 рік. Київ, 2008.— 31 табл.
18. Боярский А.Я. Население и методы его изучения.— М.: Статистика, 1975.— 264 с.
19. Айала Ф., Кайгер Дж. Современная генетика. М.: Мир, 1988.— Т.3.— 335 с.
20. Reich T., James J.W., Morris C.A. The use of multiple thresholds in determining the mode of transmission of semicontinuous traits // *Ann. Human Genet.*— 1972.— V.36.— P. 163–184.
21. Reich T., Rice J., Cloninger C.R. The use of multiple thresholds and segregation analysing the phenotypic heterogeneity of multifactorial traits // *Ann. Human Genet.*— 1979.— V.42, №3.— P. 371–390.
22. Лакин Г.Ф. Биометрия. М.: Высшая школа, 1990.— 352 с.

Резюме

Показатели отбора СД 2 типа изучены по данным акушерского анамнеза 2106 здоровых женщин и 537 СД 2 типа. Показано, что положительная направленность отбора для СД 2 типа является первопричиной увеличения его распространенности в популяции. Изменение в популяции частот генов предрасположенности к СД 2 типа привело к увеличению в структуре заболевания формы с развитием абсолютной инсулиновой недостаточности у больных СД 2 типа, более отягощенной формы этого типа СД.

Показники добору ЦД 2 типу досліджені за даними акушерського анамнезу 2106 здорових жінок та 537 хворих на ЦД 2 типу. Показано, що позитивна спрямованість добору для ЦД 2 типу є першопричиною збільшення його розповсюдженості в популяції. Змінення в популяції частот генів схильності до ЦД 2 типу призвело до зростання в структурі захворювання форми з розвитком абсолютної інсулінової незалежності у хворих на ЦД 2 типу, більш обтяженої форми цього типу ЦД.

Type 2 diabetes mellitus selection coefficients were obtained on the data about 2106 health and 537 type 2 diabetes mellitus women fertility indexes. It has been shown, that positive direction of type 2 diabetes mellitus selection types is an original cause of its prevalence in population increasing. Change in gene population of frequencies of predisposition to type 2 diabetes mellitus has led to increase in structure of disease of the form with development absolute insuline deficiency at type 2 diabetes mellitus patients , more burdened form of this type of diabetes.

DOMINA EMILIIA

*R.E.Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology
National Academy of Sciences of Ukraine, Ukraine, 03022, Kyiv, Vasilkivska str., 45,
e-mail: edjomina@ukr.net*

THE CYTOGENETIC APPROACHES TO THE PREVENTION OF RADIOGENIC CANCER

Introduction

It has been recognized that only prophylactic activity through the implementation of the relevant social and national policy can prevent the growth of cancer morbidity rates. Such a strategy of health promotion is applied successfully in the prevention programmes of the European region and must be dominant in connection with the Chernobyl catastrophe [1–3]. Otherwise we will be further bound to eliminate its consequences (treating patients) rather than prevent the rise of cancerous diseases, part of which develop under the influence of the radiation factor of the Chernobyl disaster. Therefore the issue of studying the effects of low dose radiation on human organism currently has a clear practical orientation as a large part of population has been affected or are being affected by the radiation factor of the Chernobyl disaster. Furthermore, Ukraine has 15 active nuclear power generating sets which represent one of the major nuclear power programmes in Europe. The abovementioned circumstances prompt scientists to conduct thorough study and purposeful modification (attenuation) of the medical and biological effects of low dose radiation.

One of the fundamental aspects problem of low doses is the evaluation of genetic apparatus structure and function destabilization, as radiation-induced genome damage can cause the development of immunodeficiency, carcinogenesis, reproductive problems and a range of other negative long-term effects, primarily in people with radiation hypersensitivity. Objective information on the condition of the human somatic cells genetic apparatus can be obtained through the analysis of chromosome aberration and genome damages in peripheral blood lymphocytes. In accordance with the recommendations of the World Health Organization, these indices are objective biodosimeters and the most sensitive indicators of the mutagenic effect of radiation.

Objective information on the condition of the human somatic cells genetic apparatus can be obtained through the analysis of chromosome aberration and genome damages in peripheral blood lymphocytes. In accordance with the recommendations of the World Health Organization, these indices are objective biosimeters and the most sensitive indicators of the mutagenic effect of radiation.

With the aim of preventing the negative effects of low dose ionizing radiation on human organism, drugs activating the immune and repair system and thereby increasing genome stability are used. Efficient modifiers include inosine (trade name “riboxine”) widely used in cardiology, which supports energetic balance in tissues. By increasing ATP (adenosine triphosphate) level this drug stimulates the postradiational rehabilitation processes, as well as other systemic metabolic processes.

Goals: to study the modification effect of inosine on the frequency of the radiation-induced cytogenetic effects in human somatic cells.

Methods

The irradiation of lymphocytes *in vitro* received from healthy donors had been done on therapeutic apparatus “Rockus” (with ^{60}Co source) in range 0.1–1.0 (0.1; 0.2; 0.3; 0.4; 0.5; 1.0) Gy. The inosine was added to the cell culture in the concentration of 0,01 mg/mL of blood 30 min before the irradiation. With the aim of determining individual radiation sensitivity of the persons under study, lymphocyte culture was exposed to irradiation during the 46th hour of cell incubation, i.e. at the G₂-stage of cell cycle — the most irradiation-sensitive period with the dosage of 1.5 Gy according to G₂-radiation sensitivity assay [4]. Intact cell cultures for each donor were used for control (for the evaluation of the spontaneous chromosome aberration level). The metaphase analysis of chromosome aberrations had been carried out with group karyotyping.

Results

First working stage — using inosine as antimutagen.

The effects of inosine on spontaneous chromosome aberrations level in human lymphocytes have been investigated. It has been established that under the influence of inosine, general chromosome aberration frequency in lymphocyte culture of conditionally healthy donors decreases 2.6 times, and chromatid type aberration frequency decreases 1.7 times; chromosome type aberrations “disappear“ under the influence of inosine (Fig. 1).

Second working stage — using inosine as radioprotector.

The highest radioprotective effect of inosine is observed when the cell culture is irradiated in the range between 0.1–0.2–0.3 Gy. The level of chromosome aberration decreases from 6.06 ± 0.6 ; 7.06 ± 1.6 ; 7.76 ± 1.0 to 1.6 ± 0.1 ; 2.6 ± 0.4 ; 2.2 ± 0.6 respectively and reaches the meanings of spontaneous level of genetic damages of human’s cells. During this the coefficient of modification equals to 2.7–3.8. With a further increase in radiation up to 1.0 Gy, the radioprotective effect of inosine decreases and the coefficient of modification equals to 1.2 (Fig. 2).

It has been established that inosine ambiguously affects ‘dose-effect’ calibration curves:

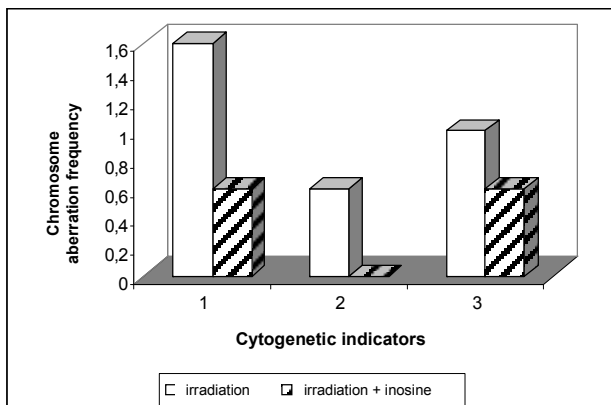


Fig. 1. Modifying effect of inosine on spontaneous aberrations level in PBL of conditionally healthy donors.

Keys: 1 — total amount of chromosome aberrations, 2 — chromosome type aberrations frequency, 3 — chromatid type aberrations frequency (mean group values)

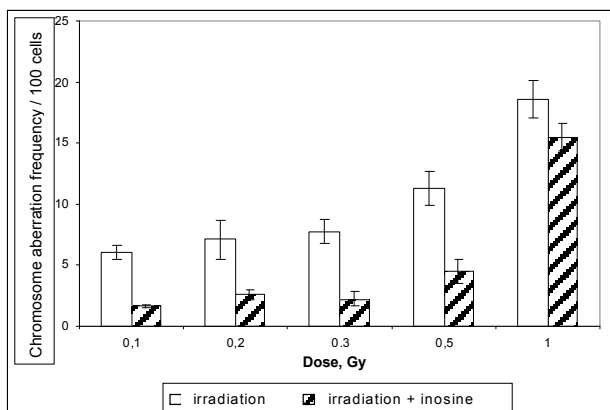


Fig. 2. Modifying effects of inosine on radiation induced chromosome aberrations frequency

— under the influence of inosine, the dose curve built on the basis of mean group values of chromosome aberration rates is located below the calibration curve, plateau remaining in the same dose range of 0.1–0.3 Gy observed in one irradiation. This is primarily indicative of inosine efficiency; secondly, inosine does not fundamentally affect the abnormal form of the ‘dose-effect’ curve;

— for certain values of donor’s individual radiation sensitivity, the dose-independent section (plateau) can increase up to the upper limit of the low dose range (0.5 Gy).

As the increase in the level of chromosome change in cell population is considered potentially carcinogenic, using inosine as radioprotector under low dose radiation is relevant with the aim of radiogenic cancer primary prevention.

Conclusions

The protective effect of inosine has been established on the genetic level of human somatic cells by using low doses of radiation. Inosine does not affect the abnormal form of the 'dose-effect' curve. Obtained data regarding inosine effect on human genome stability should be taken into account for the primary prevention of radiogenic tumor development as a remote negative effect of the Chernobyl disaster.

References

1. *Garber J.* Genetics in cancer prevention.— European Journal of Cancer. Supplements.— 2010.— V.8, N2.— P. 2.
2. *Rennert G.* Commonly used medications associated with reduced risk of cancer — evidence and pitfalls.— European Journal of Cancer. Supplements.— 2010.— V.8, N2.— P. 5.
3. *Заридзе Д.Г.* Профилактика рака.— М.: ИМА-ПРЕСС.— 2009.— 224 с.
4. *Дьоміна Е.А., Дружина М.О., Рябченко Н.М.* Індивідуальна радіочутливість людини.— Київ: Логос.— 2006.— 126 с.

Резюме

The antimutagenic and radioprotective effect of inosine has been established on the chromosomal level of human cells. Inosine should be used in order to prevent the emergence of radiogenic cancer.

На хромосомном уровне клеток человека установлен антимуtagenный и радиозащитный эффект препарата инозин, который целесообразно использовать с целью профилактики возникновения радиогенного рака.

На хромосомному рівні клітин людини встановлено антимуtagenний та радіозахисний ефект препарату инозин, який доцільно використовувати з метою профілактики виникнення радіогенного раку.

ПИТАННЯ ВИКЛАДАННЯ ГЕНЕТИКИ, ЕВОЛЮЦІЇ ТА БІОТЕХНОЛОГІЇ

КАРШОК Т.В.

*ФГОУ ВПО Красноярский государственный аграрный университет
Россия, 660049, г. Красноярск, проспект Мира, 90, e-mail: info@kgau.ru*

МЕТОДИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЭФФЕКТИВНОГО ПРЕПОДАВАНИЯ КУРСА “ИСТОРИЯ ЭВОЛЮЦИОННОГО УЧЕНИЯ” В КРАСНОЯРСКОМ ГОСУДАРСТВЕННОМ АГРАРНОМ УНИВЕРСИТЕТЕ

Дисциплина “История эволюционного учения” представляет собой составную часть общей подготовки студентов биологических и технических специальностей наряду с другими общеобразовательными курсами.

Целью введения в образовательные программы ФГОУ ВПО “КрасГАУ” дисциплины “История эволюционного учения” является повышение биологической грамотности и заполнение пробела в общем, фундаментальном естественнонаучном образовании студентов.

Курс по выбору “История эволюционного учения” носит мировоззренческий характер и построен таким образом, чтобы вводить необходимые базовые естественнонаучные понятия для создания представлений об истории эволюционных идей, о многообразии взглядов на проблему происхождения жизни на Земле.

В этом курсе приводятся основные сведения о доказательствах эволюции органического мира, закономерностях микро- и макроэволюции, о происхождении и развитии жизни на Земле, рассматривается теория антропогенеза.

Задачи курса следующие:

— познакомить студентов с историей эволюционных идей, изучить основные группы доказательств органического мира;

— изучить понятие вида и его критерии, выяснить механизмы репродуктивной изоляции в природе, познакомиться со структурой вида, изучить элементарные эволюционные факторы и их роль в эволюции, рассмотреть механизмы возникновения адаптаций и видообразования;

— изучить главные направления органической эволюции и пути достижения биологического прогресса; выявить основные пути филогенеза групп организмов; изучить современную систему органического мира;

— познакомить студентов с многообразием взглядов на проблему происхождения жизни на Земле, изучить сущность современной теории происхождения жизни, рассмотреть основные этапы эволюции растительного и животного мира на нашей планете;

— рассмотреть движущие силы антропогенеза, показать взаимосвязь биологических и социальных факторов антропогенеза, изучить

основные этапы в эволюции человека, доказать существование одного вида *Человек разумный*, представленного расами.

Материалы и методы

Объектом исследования данной работы является учебно-воспитательный процесс, осуществляемый в КрасГАУ. Предметом исследования являются различные организационные формы и методы обучения.

Результаты и обсуждение

Одним из свойств активного восприятия учебной информации учащимся является ее комплексная подача. Полученные при соблюдении указанных условий знания закрепляются в памяти длительное время. Это делает педагогический процесс более продуктивным. Для повышения качества и эффективности занятий, усиления его обучающей, воспитательной и развивающей функций необходимо выполнение ряда методических условий по организации и проведению занятий.

Все занятия по дисциплине “История эволюционного учения” по дидактической цели можно сгруппировать на вводные, занятия изучения нового учебного материала, обобщающие и зачетные.

Вводные занятия проводятся в начале изучения курса, перед изучением зачетных разделов, а иногда перед изучением отдельных тем. На вводном занятии преподаватель устанавливает уровень подготовленности учащихся к изучению данного раздела, выявляет пробелы в знаниях, и определяет вопросы, подлежащие повторению, дает индивидуальные задания. Одна из важных задач вводного занятия заключается в постановке перед учащимися проблемных вопросов, которые будут решаться в процессе изучения зачетного раздела.

Большинство занятий сводится к изучению нового материала. На них изучается новый материал, в связи с ним повторяется ранее пройденный, в конце темы проводится обобщение. Занятия этого типа наиболее разнообразны и разноплановы. Они различаются по целевой установке, содержанию, применяемым методам и методическим приемам, характеру использования и номенклатуре наглядных средств. Использование лекционного метода в процессе преподавания особенно эффективно в сочетании с семинарскими занятиями. Семинарские занятия особенно полезно проводить после изучения учебного материала зачетного раздела или после тем, по которым применялся лекционный метод.

Основная цель всех обобщающих занятий состоит в повторении и систематизации знаний. Такие занятия проводятся после изучения материала зачетного раздела и служат целям подготовки студентов к зачетам. Существенное значение имеет выявление пробелов в знаниях. Перед обобщающим занятием преподаватель уточняет по журналу и своим записям, что не доработано каждым из них. Имея полную картину подготовленности по зачетному разделу, можно заготовить индивидуальные карточки-задания и провести короткую самостоятельную работу по ним. На таком занятии возможно и проведение письменной зачетной работы.

Зачетные занятия проводятся после изучения каждого зачетного раздела. На них осуществляется учет знаний учащихся и выставляется зачетная оценка. Вопросы, применяемые при опросе на зачетах, не могут быть такими же, как на текущем опросе. При опросе на зачете вопросы должны формулироваться так, чтобы студенты могли в своем ответе шире использовать материал тем зачетного раздела. Вопросы должны отражать сущность учебного материала. При опросе целесообразно использовать вопросы трех типов:

1. Вопросы, выясняющие знания учащимися теоретического материала.
2. Вопросы, выясняющие знание основных научных фактов, которые легли в основу соответствующих теорий, законов и т.д.
3. Вопросы, выясняющие интеллектуальные и учебные умения, умения применять знания в практической деятельности, умения делать обобщения и выводы.

Зачет обычно включает письменную и устную форму проверки. Письменной проверке целесообразно подвергнуть знания фактического материала, а также понимание основных закономерностей и умение применять их в анализе предложенных примеров и решении простых задач. Вопросы к письменному зачету должны предусматривать краткие и точные ответы. Комплексный зачет требует большой подготовки как студента, так и преподавателя. Иногда приходится ограничиваться только письменным зачетом. В исключительных случаях, чтобы облегчить учащимся сдачу зачета, зачет принимается по частям. Дифференцированный подход должен иметь место в процессе обучения и выравнивания знаний учащихся. Но при проверке знаний студенты должны быть поставлены в равные условия и знания их оценены максимально объективно.

Правильно поставленная система подготовки учащихся к зачету и методика его проведения позволяют глубоко проверить их знания и создать нормальную рабочую обстановку в процессе зачета.

Выводы

После завершения курса “История эволюционного учения” студенты имеют представление об основных доказательствах эволюции органического мира, о микро- и макроэволюции, о сущности современной теории происхождения жизни, основных этапах эволюции растительного и животного мира на нашей планете.

Литература

1. *Верзилин Н. М.* Проблемы методики преподавания биологии.— М.— 1974.— 156 с.
2. *Верзилин Н.М., Корсунская В.М.* Общая методика преподавания биологии.— М.— 1983.— 54 с.
3. *Гамезо М.В., Матюхина М.В., Михальчик Т.С.* Возрастная и педагогическая психология.— М.— 1984.— 238 с.
4. *Кравцова Д.И., Шубкина Л.С.* Хрестоматия по методике преподавания биологии.— М.— 1984.— 288 с.
5. *Лейтес Н.С.* Психология одаренности детей и подростков.— М.— 1996.— 173 с.

6. *Лихачев Б.Т.* Педагогика. Курс лекций.— М.— 1999.— 386 с.
7. Методика преподавания химии / Под ред. Н.Е. Кузнецовой.— М.— 1984.— 48 с.
8. *Минский Е.М.* От игры к знаниям: Пособие для учителя. 2-е изд.— М.— 1987.— 96 с.
9. Неделя экологии в школе: Учебное пособие по методике преподавания биологии / Под ред. Л.Д. Бобылева, Л.И. Петрищева, Л.Ф. Скрылева.— Мичуринск.— 2001.— 67 с.
10. *Немов Р.С.* Психология. В трех книгах. Книга 2. Психология образования.— М.— 1999.— 608 с.

Резюме

Заняття по дисципліні “Історія еволюційного учіння” можна сгрупувати на ввідні, заняття вивчення нового навчального матеріалу, обобщаючі і зачетні. Правильно поставлена система підготовки учасників дозволяють глибоко перевірити їх знання. В результаті студенти мають необхідне уявлення про еволюцію органічного світу.

The lessons in discipline “History of evolution” can be divided in introduction, studying of new material, common lessons and term paper. Correctly chosen system training of students allows to check their knowledge. As the result students have necessary knowledge about evolution of organic world.

ОПАЛКО О.А.¹, ОПАЛКО А.І.^{1,2}

¹ *Національний дендрологічний парк „Софіївка” НАН України
Україна, 20300, Умань, Черкаської обл., вул. Київська,
12А, e-mail: opalko_a@ukr.net*

² *Уманський національний університет садівництва
Україна, 20305, Умань, Черкаської обл., п/в “Софіївка-5”,
e-mail: usau@usau.ic.ch.ua*

ДИДАКТИЧНІ ПРОБЛЕМИ СЕЛЕКЦІЙНО-ГЕНЕТИЧНОЇ ТЕРМІНОЛОГІЇ

Термінологія — це мова науки, складова частина метамови. Вона включає елементарні (з одного слова) і складені (поєднання слів і їхніх еквівалентів) терміни. Слово “термін” походить від латинського “*Terminus*”, що за давньоримською міфологією означає ім’я бога-охоронця кордонів і межових знаків. Давньоримські селяни 23 лютого навіть святкували День терміналії [16]. Тому кожен термін має підпорядковуватись значенню слова *межа*, тобто обмежувати багатозначність і суб’єктивність та вживатись у чітко обмеженій певній області значень. Усі дослідники для визначення ідентичних понять повинні користуватись тільки ідентичними термінами. Терміни можуть утворюватись зі слів, які не вживаються у загальній лексиці і здебільшого вводяться в науку внаслідок калькування/перекладу з латини або різних

мов-першоджерел інформації чи зі слів рідної мови, які у певній науковій області набувають особливого значення [7]. Правильне використання термінів завжди було й залишається нині основою дидактики [19, 21].

Для пересічного студента складність селекційно-генетичної термінології пояснюється тим, що більшість її термінів мають іншомовне походження. Терміни, що утворені зі слів рідної мови, сприймаються з меншими труднощами, однак не завжди вживаються правильно. До аграрних університетів і коледжів (в ідеалі) мають зараховуватись ті випускники середніх закладів освіти, що у межах програми середньої школи вже засвоїли базові біологічні, в тім числі селекційно-генетичні, терміни. Однак первинні тестування студентів, які розпочинають вивчення цитології, генетики, біотехнології, селекції і насінництва, здебільшого свідчать про недостатнє знання та/або розуміння термінології цих навчальних дисциплін.

Саме незнання термінів найбільше обмежує можливості студентів щодо опанування передбаченими вузівськими програмами знаннями стосовно цитогенетичних механізмів вдосконалення культурних рослин у процесі селекції та забезпечення успадковування ознак при розмноженні новостворюваних генотипів; каріології, геномного складу і механізмів функціонування та взаємодії генів у процесах морфогенезу; цитогенетичних особливостей ресинтезу існуючих і синтезу нових видів; цитогенетики статевої організації гермафродитних, одно- та дводомних роздільностатевих рослин, вміння аналізувати якість пилку, оцінювати рівні статевої (при схрещуваннях) і тканинної (при щепленнях) само- і перехресної несумісності; спроможності розуміти генетичні, цитологічні і молекулярні механізми та застосовувати біометричні методи дослідження гетерозису окремих культурних рослин, оцінювати внесок окремих елементів взаємодії генотип-середовище в загальний ефект гетерозису; а також отримувати практичні навички аналізу й прогнозування безпосередніх і віддалених наслідків втручання в генотип рослини при гібридизації, індукуванні мутацій, поліплоїдизації та застосуванні ДНК-технологій; вміння підбирати та/або розробляти схеми селекційно-генетичних досліджень, що відповідають потребам селекційної практики [10–12]. Більшість вжитих у генетиці й селекції термінів запозичені з мов, якими публікували результати своїх досліджень першовідкривачі описуваних явищ і закономірностей, тому й здаються незвичними для українського (так само й російського) студента. Крім того, за різкого збільшення україномовних наукових видань і прискореного переходу на викладання українською мовою рівнобіжно зросла кількість невдалих калькувань/перекладів з російської, що трапляються не тільки у тезах доповідей (які не редагуються) чи Інтернет-виданнях, а й у науковій періодиці і підручниках [4, 8, 9, 14, 15, 18].

Тому актуальність уніфікації селекційно-генетичної термінології, а також очищення її від невдалих калькувань і запозичень постійно зростає.

Матеріали і методи

Дослідження виконували у 1980–2009 рр. на кафедрі генетики, селекції рослин та біотехнології Уманського національного університету садівництва

зі студентами факультетів “Агрономія” та “Флодоовочівництво і виноградарство”. Моніторинг динаміки засвоєння студентами окремих термінів з генетики й селекції проводили впродовж активованих різними засобами лекцій, семінарів, внаслідок перевірки, виконаних за індивідуальними семестровими завданнями письмових робіт, аналізу доповідей студентів на засіданнях наукового студентського гуртка кафедри тощо, з урахуванням рекомендацій фахівців з педагогіки і психології [5, 6, 11, 19, 21].

Результати та обговорення

Виконані дослідження показали найбільші прогалини в однозначному розумінні таких термінів як *бекрос*, *зворотні схрещування*, *наслідування*, *зверхдомінування* та ін.

Почнемо з класичного визначення терміну *бекрос*. Англо-російський тлумачний словник генетичних термінів [1] пропонує таке визначення:

— **backcross** — возвратное скрещивание. Скрещивание гибрида первого поколения с одной из родительских форм; также “backcross” — бэккросс, т.е. организм, полученный в результате **В.с.** (бэккроссирования).

Загальнодоступні україномовні Інтернет-словники тлумачать термін *бекрос* по-різному. У Словнику англіцизмів зі Словопедії [3] читаємо:

— бекрос — “вид схрещування” — *англ.* back “зворотний” і *англ.* crossing “схрещування”.

У такому визначенні нічого не можна заперечити стосовно перекладу слова *crossing*, яке дійсно означає англійською *схрещування*, однак слід визнати за неоднозначний переклад слова *back*, що в англійській загальній лексиці має дуже багато значень, з яких термінологічно найближчі такі — задня (зворотна) сторона; виворіт, спід; підкладка; зворотний (про течію); назад, у зворотному напрямі; вказує на зворотну дію. Інші значення слова *back* не мають тлумачень близьких за змістом до схрещування. Тому складений термін *backcross* не слід було перекладати за побутовими значеннями його окремих компонентів, а відповідно до використання у науковій лексиці зробити так, як у вище цитованому Англо-російському тлумачному словнику генетичних термінів [1]. Укладачі розміщеного на Порталі української мови та культури Словнику *net* дипломатично обмежились калькою, уникнувши при цьому українського перекладу:

— бекрос — схрещування гібрида першого покоління з однією з вихідних батьківських форм [2].

Мабуть, зважаючи на потребу спрощення терміну, його слід було б викласти у такій редакції:

— бекрос — поворотне схрещування. Схрещування гібрида першого покоління з однією з вихідних батьківських форм.

Однак у деяких джерелах схрещування гібрида першого покоління з однією з вихідних батьківських форм неправильно називають *зворотними схрещуваннями* [4, 15], що порушує одну з найголовніших вимог творення термінів, а саме уникнення багатозначності. Справа в тім, що термін *зворотне схрещування* вже використовується як компонент *реципрокних*

схрещувань, тобто в системі схрещувань, що включає прямі (АЧБ) схрещування, у яких генотип А використовується як материнська, а генотип Б — як батьківська форма, та *зворотні* (БЧА), у яких вже генотип Б використовується за материнську, а генотип А — відповідно, за батьківську [10, 13]. До того ж переклад обох термінів з української мови на російську цілком відповідає принципів однозначності, за яким *поворотне схрещування* перекладаємо як *возвратное скрещивание*, тобто *backcross*, тоді як *зворотне схрещування* як альтернатива прямому — *обратное скрещивание*. В англійських публікаціях можна натрапити на таке вживання згаданих термінів як ...*hybrid progeny obtained by direct and reciprocal crossing of cultivars...* [20], що українською буде ...потомство отримане внаслідок *прямого* и *зворотного схрещування* сортів... Тут *reciprocal crossing* у парі з *direct* означає *зворотне схрещування*.

Ще більше неточностей допускається в селекційно-генетичних публікаціях за хибного вживання терміну *наслідування* у значенні *успадковування* [8, 9, 14]. У російській мові слово “наследование” вживане у таких значеннях — діставання (отримування) у спадщину (спадок), успадковування, (успадкування, спадкування). Співзвучне українське слово “наслідування” можна віднести до групи слів, які називають “поганими друзями перекладача”, тому що *наслідування* перекладається на російську — *подражание* (кому, чому). Саме у цьому значенні термін вживають не тільки пересічні українці, а й фахівці-психологи [5] й біологи [10, 17]. Так у Тестах до Розділу 1. Ботаніка на стор. 606 у прикладах відповіді на завдання 2808 натрапимо на однозначне і цілком слухне використання терміну *наслідування*:

Для мімікрії характерно:

- 1) *наслідування* забарвлення чи форми добре захищених організмів погано захищеними;
- 2) модель і імітатор мешкають в одній місцевості;
- 3) кілька захищених видів нагадують одне одного за забарвленням і формою;
- 4) не має значення для імітатора місце проживання моделі;
- 5) *наслідування* моделями поведінкових рефлексів.

На жаль, в окремих публікаціях на селекційно-генетичну тематику можна натрапити на протилежні приклади неправильного використання цього терміну:

— ...знаючи елементарні правила *наслідування* Менделя... [8], замість *успадковування*;

— ...аналіз *наслідування* окремих контрастних (альтернативних) ознак... [9], замість *успадкування*;

— ...ознаками та *наслідування* їх в потомстві... [14], замість *успадковування*.

Невдалий переклад з російської терміну *сверхдоминирование* як *зверхдомінування* [18] менш поширене і його можна визнати за погану кальку, якої слід уникати, адже більш точний переклад цього терміну *наддомінування* давно використовується в україномовних наукових джерелах і підручниках [10, 13].

Висновок

Впорядкування селекційно-генетичної термінології є одним з визначальних засобів швидкого засвоєння студентами біологічних спеціальностей запланованої навчальними програмами фахової інформації і сприятиме підвищенню якості підготовки фахівців для аграрного сектора економіки і аграрної науки.

Література

1. *Арефьев В.А., Лисовенко Л.А.* Англо-русский толковый словарь генетических терминов; за науч. ред. Л.И. Пагрушева.— М.: ВНИРО, 1995.— 407 с.
2. *Бекрос* // Словник.net: Портал української мови та культури.— 2006–2010.— Режим доступу: <http://www.slovnuk.net/index.php?swrd=%C1%C5%CA%D0%CE%D1>
3. *Бекрос* // Словopedia: Словник англiцизмiв.— Режим доступу: <http://slovo-pedia.org.ua/46/53393/301182.html>
4. *Берко Й.М., Грицина М.Р.* Морфологічні особливості гібриду *Verbascum thapsiforme* Schrad.×*Verbascum nigrum* L. флори Львівської області // Український ботанічний журнал.— 2006.— Т.63, №5.— С. 654–660.
5. *Винославська О.В., Бреусенко-Кузнецов О.А., Зликов В.Л.* та ін. Психологія: навч. посібник; за наук. ред. О.В. Винославської.— К.: ІНКОС, 2005.— 352 с.
6. *Волкова Н. П.* Педагогіка: посіб.— К.: Академія.— 2001.— 576 с.
7. *Гудба Р.* Мова науки або як мислимо, так і живемо // Культура.— 26.04.2007.— Режим доступу: <http://h.ua/story/39351/>
8. *Гольмец О.С.* Професійне розведення гуппі; пер. з нім.: О. Гриньової.— Режим доступу: <http://aquaforum.lviv.ua/forum/showthread.php?t=2562>
9. *Дубінін С.І., Ковтуновський П.М., Пілюгін В.О.* та ін. Структурно-функціональна організація молекулярно-генетичного та клітинного рівнів // Методичні рекомендації з медичної біології, паразитології та генетики для студентів та викладачів ВНМЗ.— Полтава, 2006.— 103 с.
10. *Лобашев М.Ю., Ватні К.В., Тихомирова М.М.* Генетика з основами селекції; пер. з рос. К.К. Панчула.— К.: Вища шк., 1974.— 368 с.
11. *Опалко А.І.* Елементи інтерактивного навчання у викладанні загальної і прикладної генетики у вищих аграрних закладах освіти // Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології: Зб. наук. пр. Укр. т-ва генет. і селекц. ім. М.І. Вавилова; редкол.: Кунах В.А. (голов. ред.) та ін.— К.: Логос, 2007.— Т.1.— С. 587–591.
12. *Опалко А.І. та ін.* Прикладна генетика з основами цитології / Опалко А.І., Балабак А.Ф., Заплічко Ф.О., Гонтар В.Т., Мойсейченко Н.В., Косенко І.С., Опалко О.А. // Програма навчальної дисципліни для підготовки спеціалістів спеціальності 7.130.103.— “Плодоовочівництво і виноградарство” у вищих навчальних закладах III–IV рівнів акредитації Мінагрополітики України.— К.: Аграрна освіта, 2006.— 12 с.
13. *Опалко А.І., Опалко О.А.* Тлумачник вжитих термінів // Селекція плодкових і овочевих культур. Практикум: навч. посібник / А.І. Опалко, А.О. Яценко, О.А. Опалко, Н.В. Мойсейченко.— К.: Наук. світ, 2004.— С. 267–303.
14. *Опанасенко О.М.* Відомий учений у галузі картоплярства академік УААН Анастолій Андрійович Кучко (15.02.1950-2.01.1999) [Електронний ресурс] // Історія науки і біографістика.— 2006.— N1.— Режим доступу: <http://www.nbu.gov.ua/E-Journals/INB/2006-1/06oomaak.html>.
15. *Тарасенко О. М.* Розщеплення R_B-гетерозигот у зворотних схрещуваннях кукурудзи з молдавським типом цитоплазматичної чоловічої стерильності // Вісник

Дніпропетровського університету. Біологія. Екологія.— 2007.— Вип.15, т.1.— С. 175–182.

16. *Термин* // Мифы народов мира: мифологический словарь, образы античной мифологии в мировой поэзии.— 2002–2004.— Режим доступу: <http://narodov.mify.org/dic/t.shtml>

17. *Тести* до Розділу 1. Ботаніка.— 611 с. Режим доступу: <http://natcol.lviv.ua/ua/info/vst/vstup/biologija.doc>

18. *Ходак В.О.* Програма з дисципліни “Інтродукція і селекція винограду”: для студентів спеціальності 7.130103 “Плодоовочівництво і виноградарство” // Цикл загально-професійних і професійно-орієнтовних дисциплін.— 01.2010.— Режим доступу: http://www.univ.uzhgorod.ua/dep/biolog/bio_biblio/normativni/Plodoovoch/Program.htm

19. *Хуторской А.В.* Современная дидактика: уч. пособие. 2-е изд.— М.: Высшая школа, 2007.— 639 с.

20. *Milutinovic M., Miljkovic J., Nikoli D., Rakonjac V., Fotiri M.* Inheritance of some grapevine properties in progeny from direct and reciprocal crossing of cultivars ‘Smederevka’ and ‘Red Traminer’ // Acta Horticulturae.— 2009.— Vol.827.— P. 497–500.

21. *Silberman M.* Active strategies // 101 strategies to teach active learning.— Boston; London etc., 1996.— P. 2–5.

Резюме

Впорядкування селекційно-генетичної термінології є одним з визначальних засобів швидкого засвоєння студентами біологічних спеціальностей запланованої навчальними програмами фахової інформації і сприятиме підвищенню якості підготовки фахівців для аграрного сектора економіки і аграрної науки.

Упорядочение селекционно-генетической терминологии является одним из определяющих средств быстрого усваивания студентами биологических специальностей запланированной учебными программами профессиональной информации и будет способствовать повышению качества подготовки специалистов для аграрного сектора экономики и аграрной науки.

The necessity to coin and standardize of Ukrainian terminology used in genetics, breeding and seed farming are discussed. Further perfection of term formation and definition for quick learning scheduled professional information by students will promote to raise the specialist quality for agrarian sector of economic and agrarian science.

**ПІСКУН Р.П., НІКОЛАЄНКО О.О., ВАЦУК А.А., ШЕВЧУК Т.І.,
ГОРБАТЮК С.М.**

*Вінницький національний медичний університет ім. М.І.Пирогова,
Україна, 21021, Вінниця -21, вул. Пирогова, 56, e-mail: piskyn2006@mail.ru*

ВИКЛАДАННЯ МЕДИЧНОЇ ГЕНЕТИКИ В МЕДИЧНОМУ ВУЗІ В СВІТЛІ БОЛОНСЬКОГО ПРОЦЕСУ

Найбільш важливою для практичних завдань охорони здоров'я галуззю генетики людини є медична генетика. Іноді її розглядають не як розділ генетики людини, а як самостійну галузь загальної генетики. Медична генетика

досліджує поширення, етіологію, патогенез, перебіг спадкових хвороб, розробляє системи діагностики, лікування, профілактики і реабілітації хворих спадковими захворюваннями і диспансеризацію їх родин, а також вивчає роль і механізми спадкової схильності при захворюваннях людини. Але велике значення для медицини мають і інші генетичні дисципліни. Перш за все, це пов'язано з біологічною універсальністю фундаментальних законів і положень генетики, вперше встановлених на експериментальних об'єктах і підтверджених клінічними спостереженнями і дослідженнями для людини.

В нашому медичному університеті згідно з Болонським процесом генетика викладається для студентів медичних факультетів в I семестрі в рамках залікового кредиту — Модуля II: “Організмний рівень організації життя. Основи генетики людини” включає 2 змістових модуля, які безпосередньо стосуються генетики і мають наступну структуру (табл. 1) [1].

В межах третього змістового модуля розглядаються методи, які використовуються генетикою і які можна умовно поділити на дві групи — власне генетичні методи і методи суміжних біологічних і медичних дисциплін, застосування яких в генетиці обумовлено спадковими ознаками, які вивчаються біохімічними, анатомічними, фізіологічними, психічними тощо. Центральне місце серед власне генетичних методів займає генетичний аналіз: комплексний метод, призначений для виявлення закономірностей передачі від батьків до нащадків тих чи інших ознак і прояв їх в онтогенезі. Головним принципом генетичного аналізу є кількісний облік ознак, які вивчаються в групах особин, зв'язаних між собою певними ступенями родинності. В експериментальній генетиці це досягається при допомозі систем схрещувань і гібридологічного аналізу, а в медичній генетиці — з допомогою генеалогічного аналізу [3]. В генетичному аналізі використовують і багато інших методів: онтогенетичний, імуногенетичний, порівняльно-морфологічний та порівняльно-біохімічні методи, методи біотехнології, різноманітні математичні методи тощо.

До спеціальних видів генетичного аналізу відносять хромосомний аналіз, при якому вивчення становлення структурно-функціональних ознак організмів поєднується з аналізом структури і поведінки окремих хромосом. В зв'язку з розвитком методів генетичної інженерії і біотехнології можливості аналізу генетичних структур і процесів на молекулярному рівні істотно розширились. Генетичний аналіз широко використовує статистичні (біометричні) методи, без яких неможливо достовірно встановити характер передачі спадкової інформації.

Підсумовуючи знання з медичної генетики на останньому занятті перед тим, як студенти здають практичні навички з “Закономірностей спадковості та мінливості”, “Методів вивчення спадковості людини. Спадкових хвороб” викладачі знайомлять їх з найбільш поширеним і ефективним методом профілактики спадкових хвороб і вроджених вад розвитку — медико-генетичним консультуванням, яке направлене на попередження появи в сім'ї хворих дітей. Використовуючи вивчений матеріал ми покажемо як лікар-генетик

Структура залікового кредиту — модуля 2:
 “Організовий рівень організації життя. Основи генетики людини”

Тема	Лекції	Практичні заняття	Самостійна робота студента	Індивідуальна робота
Змістовий модуль 2 “Закономірності спадковості та мінливості”				
10. Організовий рівень реалізації генетичної інформації. Прояви основних закономірностей успадкування на прикладі менделюючих ознак людини (моно-, ди- та полігбридне схрещування)	1	2	1	
11. Взаємодія алейльних і неалельних генів. Явище плейотропії. Множинний алейзм. Генетика груп крові	2	2	2	
12. Зчеплене успадкування. Генетика статі	1	2	1	
13. Мінливість у людини як властивість життя і генетичне явище: фенотипова та генотипова мінливість	2	2	1	
<i>Всього за змістовий модуль 2</i>	6	8	5	
Змістовий модуль 3 “Методи вивчення спадковості людини. Спадкові хвороби ”				
14. Основи медичної генетики. Методи вивчення спадковості людини. Генеалогічний, близнюковий, дерматогліфічний методи	1	2	1,5	Підготовка огляду наукової літератури, розв’язування ситуаційних задач
15. Хромосоомні хвороби. Цитогенетичний метод їх діагностики	1	2	1	
16. Молекулярні хвороби. Біохімічний метод і ДНК-діагностика	1	2	1,5	
17. Популяційно-статистичний метод. Медико-генетичне консультування	1	2	1	
18. Практичні навички змістових модулів 2 і 3 “Закономірності спадковості та мінливості”, “Методи вивчення спадковості людини. Спадкові хвороби”	-	2	1	
<i>Всього за змістовий модуль 3</i>	4	10	6	

Таблиця 2

Структура залікового кредиту модуля: “Сучасні проблеми молекулярної біології”

Тема	Лекції	Семінарські заняття	СРС	Індивідуальна СРС
Змістовий модуль 1. Молекулярні основи спадковості				Огляд наукової літератури, написання рефератів, науково-дослідницька робота в генетичних лабораторіях, підготовка наукових доповідей на засіданнях наукового гуртка і студентській науковій конференції, участь у міжвузівських олімпіадах з медичної біології тощо.
Тема 1. Предмет і задачі молекулярної біології	2		2	
Тема 2. Макромолекули, як об'єкти вивчення молекулярної біології	4	2	10	
Тема 3. Експресія генів та її регуляція	2	2	4	
Тема 4. Організація геномів неклітинних та клітинних організмів	2	2	8	
Змістовий модуль 2. Молекулярні основи спадкових захворювань				
Тема 5. Молекулярні механізми генних, хромосомних та геномних мутацій	2	2	6	
Тема 6. Регуляція клітинного циклу. Апоптоз. Онкогенетика	2		2	
Змістовий модуль 3. Сучасні питання генних технологій				
Тема 7. Дослідження нуклеїнових кислот. Методи ДНК-діагностики	2	2	5	
Тема 8. Методи генної інженерії		2	3	
Тема 9. Клонування організмів та клітин			5	
Індивідуальна самостійна робота за вибором			6	
Тема 10. <i>Контроль засвоєння модуля “Сучасні проблеми молекулярної біології”</i>		2	9	
ВСЬОГО ГОДИН	16	14	60	
КРЕДИТИВ ECTS — 3				
Аудиторна робота — 33%; СРС — 67%				

розраховує ризик народження дитини з важкою спадковою патологією і дає рекомендації щодо подальшого дітонародження в даній сім'ї.

Таким чином, застосування досягнень генетики в практичній медицині сприяє попередженню народження дітей з спадковими захворюваннями і вродженими вадами розвитку, ранньою діагностикою і лікуванням хворих.

В наш час спадковість вивчається на всіх рівнях: молекулярному, клітинному, організменому і популяційному. Сучасна генетика характеризується поглибленням всіх її розділів до молекулярного рівня дослідження, розвитком сітки міждисциплінарних підходів, особливо в контакт з фізико-хімічною біологією, кібернетикою, проникненням генетичної методології і підходів в усі біологічні науки, а також в антропологію та загальну патологію людини.

В зв'язку з цим на нашій кафедрі в II семестрі студентам читається елективний курс “Сучасні проблеми молекулярної біології”, який має таку структуру (табл. 2) [2].

В основі знань молекулярної біології і медицини лежать базові теоретичні уявлення про будову, властивості і функції білків та нуклеїнових кислот, сутності генетичного коду, механізмів транскрипції і трансляції.

Одним з найважливіших висновків вивчення геному людини є швидкий розвиток молекулярної генетики — генетики, основаної на діагностиці, лікуванні і профілактиці захворювань за допомогою нуклеїнових кислот та білків. На даний момент формування висококласного спеціаліста медичного і стоматологічного профілю неможливе без знання сучасних методів, можливостей та перспектив розвитку молекулярної генетики і її практичного застосування — генної терапії.

Генна терапія не просто усуває певні симптоми захворювання, а коректує функції клітин і організму в цілому. Її терапевтичний ефект може досягатися різними шляхами: заміна “хворого” гена на “здоровий”, направлена корекція структури і, відповідно, функції “хворого” гена, часткове або повне пригнічення “хворого” гена [4].

Першочерговим завданням медичної генетики стали оцінка і наступне тривале динамічне спостереження (моніторинг) за можливими негативними генетичними наслідками застосування хімікатів та інших техногенних факторів, присутніх в навколишньому середовищі, як для самої людини, так і для тварин, рослин і мікроорганізмів екологічного середовища людини [5]. Значення генетичного моніторинга факторів навколишнього середовища тим більш значне, що мутагенез поряд з тератогенезом і канцерогенезом складає основний комплекс віддалених небезпечних наслідків підвищеної концентрації біологічно активних факторів в біосфері. Тому генетико-гігієнічне нормування змісту подібних факторів в навколишньому середовищі є обов'язковим компонентом профілактики захворювань людини.

Література

1. Медична біологія. Програма навчальної дисципліни для студентів вищих медичних навчальних закладів III–VI рівнів акредитації.— Київ, 2005, 54 с.
2. Сучасні проблеми молекулярної біології. Програма навчальної дисципліни (курс за вибором) для студентів вищих медичних навчальних закладів III–VI рівнів акредитації.— Київ, 2005, 20 с.
3. Медична біологія: Підручник для студентів медичних спеціальностей ВУЗів III–IV рівнів акредитації / За ред. проф. В.П. Пішака та проф. Ю.І. Бажори.— Вінниця: Нова книга, 2009.— 630 с.

4. Генетическая медицина / Под ред. акад. АМН Украины В.Н. Запорожан, Одесса, Одесский государственный медицинский университет, 2008, 432 с.

5. Медицинская генетика / под ред. Бочкова Н.П.— М.: Мастерство, 2001, 525 с.

Резюме

На практичних заняттях з медичної генетики розглядаються як питання генетичного контролю механізмів функціонування організму людини на різних рівнях його організації так і застосування досягнень геноміки, генної терапії в діагностиці, лікуванні і профілактики захворювань.

На практических занятиях по медицинской генетики рассматриваются как вопросы генетического контроля механизмов функционирования организма человека на разных уровнях его организации так и применение достижений геномики, генной терапии в диагностике, лечении и профилактике заболеваний.

Both the questions of genetic control of human organism functioning mechanisms at various levels of its organization and application of genomics, genetic therapy achievements in diagnosis, treatment and prophylaxis of diseases are highlighted at the medical genetic practical lessons.

З М І С Т

МОЛЕКУЛЯРНА СТРУКТУРА ТА ОРГАНІЗАЦІЯ ГЕНОМІВ

АНТОНЮК М.З., БОДИЛЬОВА М.В., ТЕРНОВСЬКА Т.К. УМОВИ ВИКОРСТАННЯ МІКРОСАТЕЛІТНИХ ЛОКУСІВ, ЯК МАРКЕРІВ ПРИ ІНТРОГРЕСІЇ ГЕНІВ <i>Pm</i> ДО М'ЯКОЇ ПШЕНИЦІ	3
БУБЛИК О.М., АНДРЕЄВ І.О., СПІРІДОНОВА К.В., КУНАХ В.А. МІНЛИВІСТЬ МІЖМІКРОСАТЕЛІТНИХ ДІЛЯНОК ГЕНОМУ (ISSR) У КУЛЬТУРИ ТКАНИН <i>UNGERNIA VICTORIS</i>	8
ВЕСЕЛОВ Д.С., АХИЯРОВА Г.Р. ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ АКВАПОРИНОВ У РАСТЕНИЙ КУКУРУЗЫ ПРИ ОСМОТИЧЕСКОМ СТРЕССЕ	12
ВИНИЧЕНКО Н.А., КИРИКОВИЧ С.С., ЛЕВИТЕС Е.В. ВЛИЯНИЕ ТРИТОНА X-100 НА БЕЛКОВЫЕ ПРОФИЛИ И ДИНАМИКУ ПРОРАСТАНИЯ СЕМЯН САХАРНОЙ СВЕКЛЫ	16
ГЕРАЩЕНКОВ Г.А., РОЖНОВА Н.А., АБРАМОВ С.Н., ГОРБУНОВА В.Ю. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ МАРКЕРОВ АПОМИКСИСА У ФОРМ <i>BOECHERA</i> И БЛИЖАЙШИХ РОДСТВЕННИКОВ ИЗ СЕМЕЙСТВА <i>BRASSICACEAE</i>	21
ГОРБАЛЬ Л.О., ОСТАШ Б.О., РЕБЕЦЬ Ю.В., РАБИК М.В., МИРОНОВСЬКИЙ М.Л., ЦИПІК О.В., ГРОМИКО О.М., ОСТАШ І.С., ЛУЖЕЦЬКИЙ А.М., БЕХТОЛЬД А., ФЕДОРЕНКО В.О. МЕРЕЖІ ГЕНІВ, ЗАДІЯНИХ У РЕГУЛЯЦІЇ БІОСИНТЕЗУ ПОЛКЕТИДНИХ АНТИБІОТИКІВ У СТРЕПТОМІЦЕТІВ	25
ЖУКОВ В.А., НЕМАНКІН Т.А., ОВЧИННИКОВА Е.С., КУЗНЕЦОВА Е.В., ЖЕРНАКОВ А.И., ТИТОВ В.С., ГРИШИНА О.А., СУЛИМА А.С., БОРИСОВ Я.Г., БОРИСОВ А.Ю., ТИХОНОВИЧ И.А. СОЗДАНИЕ СЕРИИ ГЕН-СПЕЦИФИЧНЫХ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ ДЛЯ СРАВНИТЕЛЬНОГО КАРТИРОВАНИЯ ГЕНОМОВ ГОРОХА ПОСЕВНОГО (<i>PISUM SATIVUM</i> L.) И ДИПЛОИДНОЙ ЛЮЦЕРНЫ (<i>MEDICAGO TRUNCATULA</i> GAERTN.)	30
КАВАЙ-ООЛ У.Н., ЕЖОВА Т.А. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ГЕНОВ <i>ABRUPTUS/PINOID</i> И <i>APETALA2</i> В РЕГУЛЯЦИИ РАЗВИТИЯ ЦВЕТКА <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i>	35
КАМЫШ Н.А., МИХАЙЛОВА М.Е., ВОЛЧОК Н.М., ТИХАНОВИЧ Н.И. ИССЛЕДОВАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ ПОПУЛЯЦИЙ СВИНЕЙ ПО ГЕНУ РИАНОДИНОВОГО РЕЦЕПТОРА <i>RYR1</i> , АССОЦИИРОВАННОМУ С ПОВЫШЕННОЙ СТРЕССЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬЮ	39

КИРИКОВИЧ С.С., ЛЕВИТЕС Е.В.

ВЛИЯНИЕ ТРИТОНА X-100 И КОЛХИЦИНА НА ЭКСПРЕССИЮ
ФЕРМЕНТНЫХ ГЕНОВ В НЕПРОРАСТАЮЩИХ СЕМЕНАХ
САХАРНОЙ СВЕКЛЫ 44

ЛЕВИТЕС Е.В., КИРИКОВИЧ С.С.

НАСЛЕДУЕМЫЙ ЭФФЕКТ ВОЗДЕЙСТВИЯ ТРИТОНА X-100
НА ЭКСПРЕССИЮ ЛОКУСА *Gpi2* У САХАРНОЙ СВЕКЛЫ 50

**МОРГУН Б.В., ЛЕВЧУК О.Б., РУМЯНЦЕВА А.С., ЮЗВЕНКО Л.В.,
ЛОЗОВА О.Й., ДІДЕНКО Л.Ф., КУЧУК М.В., СПИВАК М.Я.**

КЛОНУВАННЯ ТА АНАЛІЗ ПОСЛІДОВНОСТЕЙ ГЕНОМНОЇ РНК
ВІРУСУ ОПІКУ ГРЕЧКИ 55

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

ПОГЛЯД НА ЕВОЛЮЦІЮ *NOMINOIDEA* НА ОСНОВІ РОЗПОДІЛУ
IS-ФРАГМЕНТІВ У мтДНК 60

**РЕЗНИКОВА И.С., СТЕПУРА В.В., ШЕЛЕВ А.В., СПИРИДОНОВ В.Г.,
МЕЛЬНИЧУК С.Д., АЛЫМОВ С.И.**

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ДВУХ ПОПУЛЯЦИЙ БЕЛОГО ТОЛСТОЛОБА
(*Hypophthalmichthys molitrix* Val.) И КАРПА (*Cyprinus carpio* L.)
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ МАРКЕРОВ 64

**МЕХАНІЗМИ ВЗАЄМОДІЇ
ТА ЕКСПРЕСІЇ ГЕНЕТИЧНИХ СИСТЕМ**

**ДУБОВЕЦ Н.И., БОНДАРЕВИЧ Е.Б., СОЛОВЕЙ Л.А., ШТЫК Т.И.,
СЫЧЕВА Е.А.**

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТОВ ИНТРОГРЕССИИ ХРОМОСОМ D-ГЕНОМА
ПШЕНИЦЫ НА ПРОДУКТИВНОСТЬ КОЛОСА РЕКОМБИНАНТНЫХ ФОРМ
ГЕКСАПЛОИДНЫХ ТРИТИКАЛЕ 70

ДЬЯЧЕНКО Л.Ф., ТОПТИКОВ В.А., ТОЦКИЙ В.Н., СИЧКАРЬ В.И.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКИХ СПЕКТРОВ
ЭСТЕРАЗЫ ЛИСТЬЕВ В ОНТОГЕНЕЗЕ СОИ 75

КОВАЛЬЧУК М.В., ГУЛЬКО Т.П.

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ ЛИНИЙ ЛАБОРАТОРНЫХ МЫШЕЙ 80

**КОМАХИН Р.А., КОМАХИНА В.В., МИЛЮКОВА Н.А., ФАДИНА О.А.,
КИНАШ Е.А., ЖУЧЕНКО А.А.**

ГИБРИДЫ ТОМАТА, ЭКСПРЕССИРУЮЩИЕ ГЕНЫ *recA* И *NLS-recA-licBM3*,
КАК МОДЕЛЬ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ МЕЙОТИЧЕСКОЙ РЕКОМБИНАЦИИ
У РАСТЕНИЙ 84

МАЛЕЦКАЯ Е.И., ЮДАНОВА С.С. СЕМЕННАЯ ПРОДУКТИВНОСТЬ ГАПЛОИДНЫХ РАСТЕНИЙ САХАРНОЙ СВЁКЛЫ (<i>BETA VULGARIS</i> L.) ПРИ АПОЗИГОТИЧЕСКОМ СПОСОБЕ РАЗМНОЖЕНИЯ	89
МАНДРОВСЬКА Н.М., КРУГОВА О.Д., КОЦЬ С.Я. ГЕНЕТИЧНІ ОЗНАКИ І СИМБІОТИЧНІ ВЛАСТИВОСТІ TN5-МУТАНТА RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM BV. VICEAE M ₁	94
СМОЛИКОВА (АЛЕКСЕЙЧУК) Г.Н., СЛИВИНСКАЯ Э., ТЭЙЛОР А. АНАЛИЗ РЕПЛИКАЦИИ ДНК ПРИ ПРОРАСТАНИИ СЕМЯН КЛЕЩЕВИНЫ ...	99
ТРУБАЧЕЕВА Н.В., ПЕРШИНА Л.А. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ЯДЕРНЫХ И МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ ГЕНОМОВ В ПРОЦЕССЕ ФОРМИРОВАНИЯ АЛЛОПЛАЗМТИЧЕСКИХ ЛИНИЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ <i>T. AESTIVUM</i> L. (2n=42), НЕСУЩИХ ЦИТОПЛАЗМУ ДИКОРАСТУЩЕГО ЯЧМЕНЯ <i>H. MARINUM</i> SUBSP. <i>GUSSONEANUM</i> HUDSON (2n=28)	104
ШИЛИНА Ю.В., ГУЩА Н.И., ДЯЧЕНКО А.И., МОЛОЖАВАЯ О.С., МОРОЗ Ю.И. ЭКСПРЕССИЯ ФАКТОРОВ ПАТОГЕННОСТИ ФИТОПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ КАК НЕСПЕЦИФИЧЕСКАЯ АДАПТИВНАЯ РЕАКЦИЯ	107
ШИМКО В.Е., ГОРДЕЙ И.А. МОЛЕКУЛЯРНО-ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЦМС ФОРМ В СЕЛЕКЦИИ НА ГЕТЕРОЗИС ОЗИМОЙ РЖИ (<i>SECALE CEREALE</i> L.)	113
ЮДАНОВА С.С., ПОЗНЯК С.И., МАЛЕЦКАЯ Е.И. ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ ГОДА НА ЗАВЯЗЫВАЕМОСТЬ АГАМОСПЕРМНЫХ СЕМЯН И ПАРТЕНОКАРПИЧЕСКИХ ПЛОДОВ У САХАРНОЙ СВЕКЛЫ	119
TSYGANKOVA V.A. CICCADIAN RHYTHMS OF GENE EXPRESSION AT LEAVES OF VEGETATING PLANTS	124
ТЕХНОЛОГІЇ <i>IN VITRO</i>: ПРОБЛЕМИ ТА ПЕРСПЕКТИВИ	
БАВОЛ А. В., ДУБРОВНА О. В., ЛЯЛЬКО І. І., ЗІНЧЕНКО М. П. ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ ТИДІАЗУРОНУ НА ЧАСТОТУ УТВОРЕННЯ МОРФОГЕННОГО КАЛЮСУ ТА РЕГЕНЕРАЦІЮ ПАГОНІВ У КУЛЬТУРІ <i>IN VITRO</i> М'ЯКОЇ ПШЕНИЦІ	129
БЕЛОКУРОВА В.Б. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МАННИТОЛА И АБСЦИЗОВОЙ КИСЛОТЫ ДЛЯ ДЛИТЕЛЬНОГО ХРАНЕНИЯ <i>IN VITRO</i> РАСТЕНИЙ СЕМЕЙСТВА CARYOPHYLLACEAE	133

ВЛАСОВ В.Г., САВЕНКО Е.Г. ЦИТОЛОГО-ГИСТОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ АНДРОКЛИННОГО КАЛЛУСА РИСА В ОТНОГЕНЕЗЕ	138
ЗАХАРОВА Е.В., ВОРОНКОВ А.С., СКОРОБОГАТОВА И.В., КОВАЛЕВА Л.В. ГОРМОНАЛЬНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ <i>IN VITRO</i> ПРОРАСТАЮЩЕГО МУЖСКОГО ГАМЕТОФИТА ПЕТУНИИ: УЧАСТИЕ АКТИНОВОГО ЦИТОСКЕЛЕТА	142
КАРПЕЧЕНКО К.А., КАРПЕЧЕНКО Н.А., ЗЕМЛЯНУХИНА О.А., ДЖАНГИРОВ М.Ю., СКРЫПНИК И.А. ВЛИЯНИЕ КУЛЬТУРАЛЬНЫХ УСЛОВИЙ НА РЕГЕНЕРАЦИЮ ДУБА ЧЕРЕШЧАТОГО И ДУБА СКАЛЬНОГО <i>IN VITRO</i>	147
КОВТУН С.І., ЗЮЗІОН А.Б., ЩЕРБАК О.В., ГОНЧАРЕНКО Л.М. ДОСЛІДЖЕННЯ ЕФЕКТИВНОСТІ ФОРМУВАННЯ ЕМБРІОНІВ КРОЛІВ <i>IN VITRO</i>	152
КОЛОМІСЦЬ Ю.В., БУЦЕНКО Л.М. КАЛЮСОГЕНЕЗ <i>IN VITRO</i> ПШЕНИЦІ ЯРОЇ: ПЕРЕДУМОВИ КУЛЬТИВУВАННЯ КЛІТИН І РЕПРОДУКЦІЇ РОСЛИН-РЕГЕНЕРАНТІВ	156
КОЧУБЕЙ Т.О., ПІВЕНЬ О.О., АНДРІЄНКО В.І., КАРПОВА І.С., ЛУКАШ Л.Л. ІНДУКЦІЯ АПОПТИЧНИХ ЗМІН У КУЛЬТУРАХ ССАВЦІВ СУМАРНИМ ПРЕПАРАТОМ ФГА ТА ЙОГО ІЗОФОРМАМИ	161
КРИНИЦЫНА А.А., УСПЕНСКАЯ М.С., МУРАШЕВ В.В. ТЕХНОЛОГИЯ РАЗМНОЖЕНИЯ <i>IN VITRO</i> НЕКОТОРЫХ СОРТОВ <i>PAEONIA</i> <i>SUFFRUTICOSA</i> ANDREWS. СЕЛЕКЦИИ БОТСАДА МГУ	166
ЛЯХ Е.М. РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ КЛОНАЛЬНОГО МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ СОРТОВ СИРЕНИ ОБЫКНОВЕННОЙ	171
МАТВЕЕВА Н.А., КВАСКО Е.Ю. ВЛИЯНИЕ СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ НА СОДЕРЖАНИЕ ИНУЛИНА В КОРНЯХ ЦИКОРИЯ <i>CICHORIUM INTYBUS</i> L.	174
МЕДВЕДСВА Т.В., ТРЯПЦИНА Н.В. ЕЛІМІНАЦІЯ ВІРУСУ КУЩИСТОЇ КАРЛИКОВОСТІ МАЛИНИ МЕТОДОМ ХЕМОТЕРАПІЇ В КУЛЬТУРІ <i>IN VITRO</i>	178
ОСТАПОВЕЦЬ Л.І., ТРОЦЬКИЙ П.А. ВИКОРИСТАННЯ ГЕНЕТИКО-БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ МЕТОДІВ ОЦІНКИ ФУНКЦІОНАЛЬНОГО СТАНУ ООЦИТІВ КОРІВ І СВИНЕЙ <i>IN VITRO</i>	187
САВЕНКО Е.Г., ГЛАЗЫРИНА В.А., ШУНДРИНА Л.А. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЯНТАРНОЙ КИСЛОТЫ ДЛЯ КУЛЬТУРЫ ПЫЛЬНИКОВ РИСА <i>IN VITRO</i>	191

САМСОНОВА А.Е., МАШКИНА О.С., ТАБАЦКАЯ Т.М., ИСАКОВ Ю.Н. ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ <i>IN VITRO</i> ЦЕННЫХ ГЕНОТИПОВ БЕРЕЗЫ	194
СЕРГЕЕВА Л.Е., МИХАЛЬСКАЯ С.И., БРОННИКОВА Л.И., ГАМАЛЕЙ В.И. ДЕЙСТВИЕ ОКСИАНИОНОВ ВОЛЬФРАМА И ВАНАДИЯ НА СОДЕРЖАНИЕ НИТРАТОВ И РОСТ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР СОИ	200

БИОТЕХНОЛОГІЇ У МЕДИЦИНІ ТА СІЛЬСЬКОМУ ГОСПОДАРСТВІ

АДАМЧУК-ЧАЛАЯ Н.И., ТИТОВА Л.В., ИУТИНСКАЯ Г.А. ОСОБЕННОСТИ МИКРОБНОГО ПЕЙЗАЖА РИЗОСФЕРЫ СОИ ПРИ ПРИМЕНЕНИИ РАЗЛИЧНЫХ БИОПРЕПАРАТОВ	205
АХТЕМОВА Г.А., ШТАРК О.Ю., ПЕРШИНА Е.В., ПИНАЕВ А.Г., АНДРОНОВ Е.Е., БОРИСОВ А.Ю., ТИХОНОВИЧ И.А. СОЗДАНИЕ НОВЫХ МНОГОКОМПОНЕНТНЫХ МИКРОБНЫХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ АДАПТИВНОГО СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОГО ПРОИЗВОДСТВА	210
БЛИНСЬКА О.В., ТИМЧУК С.М., ДУЛЬНЄВ П.Г., ДЕРЕБІЗОВА О.Ю. ОЦІНКА МОРФОГЕНЕТИЧНОГО ЕФЕКТУ ПРИРОДНИХ І ХІМІЧНО МОДИФІКОВАНИХ КРОХМАЛІВ У СКЛАДІ СЕРЕДОВИЩ ДЛЯ ОТРИМАННЯ ГАПЛОЇДІВ ЯРОГО ЯЧМЕНЮ МЕТОДОМ КУЛЬТУРИ ПИЛЯКІВ <i>IN VITRO</i>	214
ВАГИНА И.Н., АНОПРИЕНКО О.В., ЗАХАРУК Е.А., СТРОКОВСКАЯ Л.И. ПЕРЕНОС ГЕНА β -ИНТЕРФЕРОНА В КЛЕТКИ МЛЕКОПИТАЮЩИХ РЕКОМБИНАНТНЫМ БАКУЛОВИРУСНЫМ ВЕКТОРОМ	219
ВАСИЛЕНКО М.Ю., КУЧУК М.М., ОВЧАРЕНКО О.О., КУЧУК М.В. ОТРИМАННЯ ТРАНСПЛАСТОМНИХ РОСЛИН <i>NICOTIANA BENTHAMIANA</i> ІЗ ГЕНАМИ МІКОБАКТЕРІЇ (<i>Mycobacterium tuberculosis</i>)	224
ВАСИЛЕНКО М.Ю., НІТОВСЬКА І.О., КУЧУК М.М., КУЧУК М.В. ЕКСПРЕСІЯ ХИМЕРНИХ ГЕНІВ <i>fbpB::gfp</i> ТА <i>fbpB(ΔTMD)::gfp</i> В РОСЛИНАХ <i>NICOTIANA TABACUM</i> ТА <i>NICOTIANA BENTHAMIANA</i>	229
ВОЛЧОК Н.М., МИХАЙЛОВА М.Е., БЕЛАЯ Е.В., КАМЫШ Н.А., ТИХАНОВИЧ Н.И., МЕДВЕДЕВА Ю.В. (-1689) ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА АЛЬФА-ЛАКТАЛЬБУМИНА (α -LA) И ЕГО ВЗАИМОСВЯЗЬ С ПРИЗНАКАМИ МОЛОЧНОЙ ПРОДУКТИВНОСТИ КРС ...	234
ВОРОНКОВ А.С., АНДРЕЕВ И.М., ТИМОФЕЕВА Г.В., КОВАЛЕВА Л.В. ГОРМОНАЛЬНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ <i>IN VITRO</i> ПРОРАСТАЮЩЕГО МУЖСКОГО ГАМЕТОФИТА ПЕТУНИИ: МЕДИАТОРНАЯ РОЛЬ Ca^{2+} И АФК В ИУК-ИНДУЦИРОВАННОЙ СТИМУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ H ⁺ -АТФазы ПЛАЗМАЛЕММЫ	238

ДМИТРУК К.В.

МЕТАБОЛІЧНА ІНЖЕНЕРІЯ ДРІЖДЖІВ *HANSENULA POLYMORPHA*
ТА *PICHA STIPITIS* ДЛЯ КОНСТРУЮВАННЯ ШТАМІВ
З ПОКРАЩЕНОЮ АЛКОГОЛЬНОЮ ФЕРМЕНТАЦІЄЮ КСИЛОЗИ 243

**ЖАРИКОВА Н.В., КОРОБОВ В.В., АНИСИМОВА Л.Г., ЯСАКОВ Т.Р.,
ЖУРЕНКО Е.Ю., МАРКУШЕВА Т.В.**

ВОЗМОЖНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ КУЛЬТУРЫ *GLUCONOBACTER*
OXUDANS 2Т В ОБЛАСТИ РЕМЕДИАЦИИ ПОЧВ ОТ ГЕРБИЦИДА 2,4,5-Т 248

ИВАНОВА Н.Н., МИТРОФАНОВА И.В., МИТРОФАНОВА О.В.

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПРИЕМЫ КЛОНАЛЬНОГО МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ
ПЕРСПЕКТИВНЫХ СОРТОВ *BEGONIA RIGER ELATOR* 252

ИНЬЮТКИНА А.Г., ЕГОРОВА Н.А.

ИНДУКЦИЯ КАЛЛУСО- И МОРФОГЕНЕЗА В КУЛЬТУРЕ ИЗОЛИРОВАННЫХ
ОРГАНОВ ПОЛЫНИ ЭСТРАГОН 257

КИЩЕНКО Е.М.

ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ РЕПОРТЕРНОГО ГЕНА β -ГЛЮКУРОНИДАЗЫ
ПОД КОНТРОЛЕМ 35S И *MII* ПРОМОТОРОВ В ТРАНСГЕННЫХ
РАСТЕНИЯХ 261

КЛОЧКО В.В., ЗЕЛЕНА Л.Б., САФРОНОВА Л.А., АВДЄЄВА Л.В.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ ПРОБІОТИЧНИХ ШТАМІВ
BACILLUS SUBTILIS УКМ В-5139 ТА УКМ В-5140 267

КОЛОДЯЖНАЯ Я.С.

СТРАТЕГИИ ИССЛЕДОВАНИЯ МЕХАНИЗМОВ УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ
К ТОКСИЧЕСКОМУ ВОЗДЕЙСТВИЮ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ 270

**КОМИСАРЕНКО А.Г., МИХАЛЬСКАЯ С.И., МОРГУН Б.В.,
МУЖАНОВСКАЯ О.В., КОЧЕТОВ А.В., ТИЩЕНКО Е.Н.**

ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ *AGROBACTERIUM*-ОПОСРЕДОВАННОЙ
ТРАНСФОРМАЦИИ ИНБРЕДНЫХ ЛИНИЙ ПОДСОЛНЕЧНИКА 274

КОРЗИНА Н.В., МИТРОФАНОВА О.В.

ИНДУЦИРОВАННЫЙ МОРФОГЕНЕЗ В КУЛЬТУРЕ ОРГАНОВ И ТКАНЕЙ
РАЙОНИРОВАННЫХ И ПЕРСПЕКТИВНЫХ СОРТОВ ЧЕРЕШНИ
(*PRUNUS AVIUM* L.) *IN VITRO* 280

**КРАСНОВ М.С., ЯМСКОВА В.П., РЫБАКОВА Е.Ю., КУЛИКОВА О.Г.,
МАРГАСЮК Д.В., ЯМСКОВ И.А.**

АКТИВНЫЕ В СВЕРХМАЛЫХ ДОЗАХ БИОРЕГУЛЯТОРЫ, ВЫДЕЛЕННЫЕ
ИЗ ПОДОРОЖНИКА И АЛОЭ, ОКАЗЫВАЮТ ПРОТЕКТОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ
НА КОЖУ В СИСТЕМАХ *IN VITRO* И *IN VIVO* 285

КРУГЛОВА А.Е., КРУГЛОВА Н.Н. МИКРОКЛОНАЛЬНОЕ РАЗМНОЖЕНИЕ <i>IN VITRO</i> РЕДКИХ И НАХОДЯЩИХСЯ ПОД УГРОЗОЙ ИСЧЕЗНОВЕНИЯ ВИДОВ РОДА <i>OXYTROPIS</i> ИЗ ФЛОРЫ ЮЖНОГО УРАЛА КАК БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ СПОСОБ ИХ СОХРАНЕНИЯ	290
КУЛИКОВА О.Г., ЯМСКОВА В.П., ИЛЬИНА А.П., МАРГАСЮК Д.В., ЯМСКОВ И.А. ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ БИОРЕГУЛЯТОРА, ВЫДЕЛЕННОГО ИЗ ЛУКА РЕПЧАТОГО <i>ALLIUM CEPA</i> L.	293
ЛЕСНИКОВА-СЕДОШЕНКО Н.П., МИТРОФАНОВА О.В., ГОРИНА В.М. СЕЛЕКЦИЯ <i>IN VITRO</i> АБРИКОСА, СЛИВЫ И АЛЫЧИ НА ИММУНИТЕТ К ВИРУСУ ШАРКИ (<i>PLUM POX VIRUS</i>)	298
МАЛЬЦЕВ Д.И., ЯМСКОВА В.П., ИЛЬИНА А.П., МАРГАСЮК Д.В., ЯМСКОВ И.А. ИССЛЕДОВАНИЕ БИОРЕГУЛЯТОРОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ТКАНИ ПЕЧЕНИ МЛЕКОПИТАЮЩИХ	303
МАТВЕЕВА А.Ю., КОРЖ Л.П., ХРИСТАН О.О., МОРГУН Б.В., ТИЩЕНКО Е.Н. АНАЛИЗ КОМПЕТЕНЦИИ К <i>AGROBACTERIUM</i> -ОПОСРЕДОВАННОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ МОРФОГЕННОГО КАЛЛУСА ИНБРЕДНЫХ ЛИНИЙ КУКУРУЗЫ	308
МЕЛИХОВА Г.И., МИТРОФАНОВА И.В. ОСОБЕННОСТИ ВВЕДЕНИЯ СЕГМЕНТОВ ПОБЕГА И ИНДУКЦИИ МОРФОГЕНЕЗА <i>IN VITRO</i> МАСЛИНЫ ЕВРОПЕЙСКОЙ (<i>OLEA EUROPAEA</i> L.) ...	313
НЕБИКОВ М.В., СЕРЖУК О.П. РОЗМНОЖЕННЯ ПРЕДСТАВНИКІВ РОДУ <i>CRATAEGUS</i> L. У КУЛЬТУРИ <i>IN VITRO</i>	318
ОСТАШ Б.О., МАКІТРИНСЬКИЙ Р.П., РАБИК М.В., ЗАБУРАННИЙ Н.В., ОСТАШ І.С., УОКЕР С., ФЕДОРЕНКО В.О. ГЕНЕТИЧНІ ЕЛЕМЕНТИ, ЩО РЕГУЛЮЮТЬ ПРОДУКЦІЮ МОЕНОМІЦІНІВ У <i>STREPTOMYCES GHANAENSIS</i>	322
САХНО Л.А., ОСТАПЧУК А.Н., КЛОЧКО В.В., БАННИКОВА М.А., КУЧУК Н.В. ИЗМЕНЕНИЯ В СОСТАВЕ ЖИРНЫХ КИСЛОТ У ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ РАСТЕНИЙ РАПСА, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ ГЕН <i>CYP11A1</i> ЦИТОХРОМА P450 _{scc} ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ	327
СЕЛЬДИМИРОВА О.А., КРУГЛОВА Н.Н. СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ НАЧАЛЬНЫХ ЭТАПОВ ЭМБРИОИДОГЕНЕЗА В КАЛЛУСАХ АНДРОКЛИННОГО И ЗАРОДЫШЕВОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ ЯРОВОЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ	331

СПИВАК Н.Я., СИНДАРОВСКАЯ Я.Р., ЛОЗОВАЯ О.И., САХНО Л.А., ГЕРАСИМЕНКО И.М., ОЛЕВИНСКАЯ З.М., ДИДЕНКО Л.Ф., ШЕЛУДЬКО Ю.В., КУЧУК Н.В.	
ИССЛЕДОВАНИЕ РЕПРОДУКЦИИ ВИРУСА ОЖОГА ГРЕЧИХИ В ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЯХ ТАБАКА, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ ГЕН ИНТЕРФЕРОНА АЛЬФА 2Ь ЧЕЛОВЕКА	336
СУПРУН С.М., ДОНЧЕНКО Г.В., ПАРХОМЕНКО Ю.М., КУРЧЕНКО И.Н., ХАРКЕВИЧ Е.С., НОГИНА Т.М., КУЧМЕРОВСКАЯ Т.М.	
БИОТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ КОФЕРМЕНТА А (CoA)	341
ТРЕТЬЯКОВА И.Н.	
ЭВОЛЮЦИОННЫЕ АСПЕКТЫ РЕПРОДУКТИВНОГО ПРОЦЕССА ХВОЙНЫХ <i>IN VIVO</i> И В КУЛЬТУРЕ <i>IN VITRO</i>	345
ФИЛИПЕНКО Е.А., СИДОРЧУК Ю.В., ЗАГОРСКАЯ А.А., ЖАРИКОВ Т.Ю., ДЕЙНЕКО Е.В.	
АНАЛИЗ СПЕКТИНОМИЦИН-УСТОЙЧИВЫХ КАЛЛУСНЫХ ЛИНИЙ МОРКОВИ (<i>DAUCUS CAROTA</i>), ВЫДЕЛЕННЫХ ПРИ ХЛОРОПЛАСТНОЙ ТРАСФОРМАЦИИ	351
ФОМЕНКО Т.И., КУЗОВКОВА (ЛЕНЕЦ) А.А., БЕРДИЧЕВЕЦ Л.Г., РЕШЕТНИКОВ В.Н.	
ЭФФЕКТ РАЗНОУРОВНЕВОЙ ЭКСПРЕССИИ БАКТЕРИАЛЬНОЙ β-1,4-ГЛЮКАНАЗЫ В ЛИСТОВЫХ ТКАНЯХ <i>NICOTIANA TABACUM</i> НА КАЛЛУСОГЕННУЮ АКТИВНОСТЬ И МОРФОГЕННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ	356
ЧМЕЛЕВА С.И., ТЕПЛИЦКАЯ Л.М., ЮРКОВА И.Н., ПАНОВ Д.А., БУГАРА И.А., ОМЕЛЬЧЕНКО А.В., ТАЙКОВА В.П.	
ПОЛУЧЕНИЕ И ОПТИМИЗАЦИЯ КАЛЛУСНЫХ КУЛЬТУР ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ И ИХ БИОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ	361
ЧУРИКОВА О.А.	
ПОДДЕРЖАНИЕ И ВОЗОБНОВЛЕНИЕ КОЛЛЕКЦИИ СОРТОВОЙ СИРЕНИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРИЕМОВ	365
ШЕЛУДЬКО Ю.В., САХНО Л.А., ГЕРАСИМЕНКО И.М., СИНДАРОВСКАЯ Я.Р., КЛОЧКО В.В., ОСТАПЧУК А.Н., ГОЛДЕНКОВА-ПАВЛОВА И.В.	
ГЕТЕРОЛОГИЧЕСКАЯ ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ АЦИЛ-ЛИПИДНЫХ ДЕСАТУРАЗ ЦИАНОБАКТЕРИЙ В РАСТЕНИЯХ	369
ЩЕРБАК Н.Л., САХНО Л.А., КОМАРНИЦКИЙ И.К.	
ИЗУЧЕНИЕ <i>LOX</i> -ОПОСРЕДОВАННОЙ ЭКСПРЕССИИ В ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЯХ	374

BORISJUK N.V., ANDRIANOV V., POGREBNIYAK N., BRINKER A., DIXON J., FLYNN J., MATYSZCZUK P., ANDRYSZAK K., LAURELLI M., SPITSIN S., GOLOVKIN M., KOPROWSKI H. METABOLIC ENGINEERING OF PLANT BIOMASS PRODUCTION OF BIOFUEL	379
--	-----

ГЕНЕТИКА ЛЮДИНИ ТА МЕДИЧНА ГЕНЕТИКА

АТРАМЕНТОВА Л.А., КАРАЧЕНЦЕВ Ю.И., ГОРШУНСКАЯ М.Ю., ТЫЖНЕНКО Т.В., КРАВЧУН Н.А., ПОЧЕРНЯЕВ А.К., БАРБУЛ О.П., ПОЛТОРАК В.В. О РЕГИОНАЛЬНОМ РЕГИСТРЕ МАРКЁРОВ САХАРНОГО ДИАБЕТА 2 ТИПА	384
БАГАЦЬКА Н.В., КОВАЛЬОВА В.І., НЕФІДОВА В.С., МЕДЗЯНОВСЬКА О.В. ОЦІНКА СТАНУ ХРОМОСОМНОГО АПАРАТУ ХВОРИХ ДІТЕЙ ТА ПІДЛІТКІВ З РІЗНИМИ МУЛЬТИФАКТОРІАЛЬНИМИ ХВОРОБАМИ	388
БОЛТІНА І.В. ВИКОРИСТАННЯ ПОКАЗНИКІВ ТРИВОЖНОСТІ ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ ЦИТОГЕНЕТИЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ	393
ГЕНИК-БЕРЕЗОВСЬКА С.О. ДОСЛІДЖЕННЯ СТАНУ РЕПРОДУКЦІЙНОЇ ФУНКЦІЇ У ЖІНОК ГРУПИ РИЗИКУ ЩОДО ВРОДЖЕНИХ ВАД РОЗВИТКУ ЗА ДАНИМИ РЕЄСТРУ МОДЕЛЬНИХ ВВР ТА У ЖІНОК ІЗ СІМЕЙ ЛІКВІДАТОРІВ АВАРІЇ НА ЧАЕС НА МОДЕЛІ ПОПУЛЯЦІЇ ЛЬВІВСЬКОЇ ОБЛАСТІ	398
ГУЛЬКО Т.П., ДЕРЯБИНА Е.Г., РЫМАРЬ С.Е., РУБАН Т.А., СУХОРАДА Е.М., МАСЛОВА О.А., ЛИХАЧЕВА Л.И., ДАХОВНИК А.В., КОРДЮМ В.А. ИЗУЧЕНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ РАЗВИТИЯ МЫШИНЫХ БЛАСТОЦИСТ ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ	403
ДИБКОВ М.В., МАЛЮТА С.С., ТЕЛЕГЕЄВ Г.Д. ВИЯВЛЕННЯ МУТАЦІЇ V617F В ГЕНІ <i>jak2</i> ХВОРИХ НА ХРОНІЧНІ МІСЛОПРОЛІФЕРАТИВНІ НЕОПЛАЗМИ ЗА ДОПОМОГОЮ T-ARMS ПЛР	408
ЗЕЛЕНЬКИЙ С.Б., БОБЫК В.И., МАНДРЫК С.Я., СИДОРИК Л.Л., ПОГРЕБНОЙ П.В. ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ПОЛИКЛОНАЛЬНЫХ МОНОСПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ ПРОТИВ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНОГО, НИЗКОИММУНОГЕННОГО И ВЫСОКОКАТИОННОГО ПЕПТИДА <i>HVD-2</i> ...	411
ЗУЕВА М.И., АТРАМЕНТОВА Л.А. ПОЛИМОРФИЗМ 1258G/A ГЕНА <i>SPINK-5</i> ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ КРАСНОЙ ВОЛЧАНКЕ	416

ЛИЛО В.В., КОЦАРЕНКО К.В., МАНЬКО В.Г., МАЦЕВИЧ Л.Л., РУБАН Т.А., ЛУКАШ Л.Л. ЦИТОКИНИ ЯК ПОТЕНЦІАЛЬНІ МОДУЛЯТОРИ РЕПАРАЦІЇ ПЕРВИННИХ УШКОДЖЕНЬ, ІНДУКОВАНИХ АЛКЛЮЮЧИМИ СПОЛУКАМИ	420
МАЧУЛИНА С.А., ФИЛИПЦОВА О.В. ИЗУЧЕНИЕ БРАЧНОЙ АССОРТАТИВНОСТИ ПО ЛИЧНОСТНЫМ ХАРАКТЕРИСТИКАМ ЧЕЛОВЕКА	424
ПАВЛОВИЧ С.А. ПОПУЛЯЦИОННОЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ЛИЧНОСТНЫХ ХАРАКТЕРИСТИК ЖИТЕЛЕЙ ЦЕНТРАЛЬНОЙ УКРАИНЫ И АНАЛИЗ ЭФФЕКТА ЭТНИЧЕСКОЙ ЭНДО-ЭКЗОГАМИИ	429
ПВЕНЬ О.О., МАЦЕВИЧ Л.Л., КОСТЕЦЬКИЙ І.Є., РЕДІС Г., ЛУКАШ Л.Л. РОЛЬ N-КАДЕРИН/КАТЕНИНОВОГО КОМПЛЕКСУ У КАРДИОГЕНЕЗІ ССАВЦІВ	433
ПОЛТАВСКАЯ О.А., ЗЕЛЕНАЯ Л.Б., КОВАЛЕНКО Н.К., ШАТИЛО В.Б. ВИДОВОЕ РАЗНООБРАЗИЕ БИФИДОБАКТЕРИЙ ПИЩЕВАРИТЕЛЬНОГО ТРАКТА ЛЮДЕЙ ПОЖИЛОГО ВОЗРАСТА	438
СЕНЧЕНКО Т.В., БОЛТІНА І.В., КОСТИК О.Л., ТКАЧУК О.М., ЛЕПЬОШКІН І.В., КРАВЧУК О.П. ОСОБЛИВОСТІ ВИКОРИСТАННЯ КОРОТКОСТРОКОВИХ ТЕСТІВ ДЛЯ ДОСЛІДЖЕННЯ МУТАГЕННОЇ АКТИВНОСТІ ПЕСТИЦИДІВ	443
ТАЛАН О.О., ШЕМЕТУН О.В., ПЕДАН Л.Р., ПЛІНСЬКА М.А. ВПЛИВ ВІКУ НА ЧАСТОТУ СПОНТАННИХ АБЕРАЦІЙ ХРОМОСОМ В ЛІМФОЦИТАХ ПЕРИФЕРИЧНОЇ КРОВІ ЛЮДИНИ	447
ТЕЛЕГЄЄВ Г.Д., МІРОШНИЧЕНКО Д.О., ДИБКОВ М.В., МАЛЮТА С.С. ВИВЧЕННЯ ВПЛИВУ DN/RN ДОМЕНІВ БІЛКА BCR НА СУБКЛІТИННУ ЛОКАЛІЗАЦІЮ ОНКОПРОТЕЇНУ <i>BCR-ABL</i>	451
ТЕРПИЛЯК О.І., ЗАСТАВНА Д.В., ЗАГАНЯЧ Я.Ю., ГЕЛЬНЕР Н.В. АСОЦІАЦІЇ МІЖ ГЕНЕТИЧНИМИ ПОЛІМОРФІЗМАМИ ПРОМОТОРНОЇ ДІЛЯНКИ 1L-10 ТА РЕПРОДУКТИВНИМИ ВТРАТАМИ У ЖІНОК	455
ФЕДОТА А.М., ГАВИЛЕЙ Н.С., ПОЛТАВСКАЯ А.Ю. ГЕНОДЕРМАТОЗЫ КАК МАРКЕРЫ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ОТЯГОЩЕННОСТИ ПОДРАЗДЕЛЕННЫХ ПОПУЛЯЦИЙ С РАЗЛИЧНЫМИ ПОКАЗАТЕЛЯМИ ИНФРАСТРУКТУРЫ	459
ФИЛИПЦОВА О.В., ЛУЧКО Е.Н., АТРАМЕНТОВА Л.А. ПОПУЛЯЦИОННО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПОКАЗАТЕЛЕЙ АГРЕССИВНОСТИ И ЭМПАТИИ У ЧЕЛОВЕКА	464

ШАПОШНИК Л.А., ЛИЛО В.В., ЛУКАШ Л.Л. ОПТИМІЗАЦІЯ МЕТОДІВ ЛІКУВАННЯ ОНКОЛОГІЧНИХ ЗАХВОРЮВАНЬ В ЗАЛЕЖНОСТІ ВІД РІВНЯ ЕКСПРЕСІЇ O ⁶ -АЛКІЛГУАНІН-ДНК АЛКІЛТРАНСФЕРАЗИ У КЛІТИНАХ ПУХЛИНИ	468
ШВАЧКО Л.П. ПРЕЖДЕВРЕМЕННОЕ РАЗДЕЛЕНИЕ ЦЕНТРОМЕР В РАННЕМ МЕХАНИЗМЕ АНЕУПЛОИДИЙ ПРИ ОНКОЛОГИЧЕСКОЙ ПРОГРЕССИИ	472
ШТАНДЕЛЬ С.А. ЕСТЕСТВЕННЫЙ ОТБОР И САХАРНЫЙ ДИАБЕТ 2 ТИПА. РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ И ГЕТЕРОГЕННОСТЬ	475
DOMINA E. THE CYTOGENETIC APPROACHES TO THE PREVENTION OF RADIOGENIC CANCER	482

ПИТАННЯ ВИКЛАДАННЯ ГЕНЕТИКИ, ЕВОЛЮЦІЇ ТА БІОТЕХНОЛОГІЇ

КАРПЮК Т.В. МЕТОДИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЭФФЕКТИВНОГО ПРЕПОДАВАНИЯ КУРСА “ИСТОРИЯ ЭВОЛЮЦИОННОГО УЧЕНИЯ” В КРАСНОЯРСКОМ ГОСУДАРСТВЕННОМ АГРАРНОМ УНИВЕРСИТЕТЕ	486
ОПАЛКО О.А., ОПАЛКО А.І. ДИДАКТИЧНІ ПРОБЛЕМИ СЕЛЕКЦІЙНО-ГЕНЕТИЧНОЇ ТЕРМІНОЛОГІЇ	489
ПІСКУН Р.П., НІКОЛАСНКО О.О., ВАЩУК А.А., ШЕВЧУК Т.І., ГОРБАТЮК С.М. ВИКЛАДАННЯ МЕДИЧНОЇ ГЕНЕТИКИ В МЕДИЧНОМУ ВУЗІ В СВІТЛІ БОЛОНСЬКОГО ПРОЦЕСУ	494

НАУКОВЕ ВИДАННЯ

**ФАКТОРИ
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ
ЕВОЛЮЦІЇ ОРГАНІЗМІВ**

Збірник наукових праць

ТОМ 9

Технічний редактор *М.С. Чабан*
Комп'ютерна верстка *І.В. Шмушковича*
Коректура автора
Художнє оформлення *Є.Ю. Музиченка*

Підписано до друку 20.07.2010. Формат 60×84 ¹/₁₆. Папір офс. № 1.
Гарнітура “Таймс”. Друк офс. Ум. друк. арк. 30,0. Обл.-вид. арк. 32,8.
Наклад 300 прим. Зам. 340.

Видавництво “ЛОГОС”
Свідоцтво ДК № 201 від 27.09.2000 р.
01030, Київ-30, вул. Богдана Хмельницького, 10, тел. 235-60-03