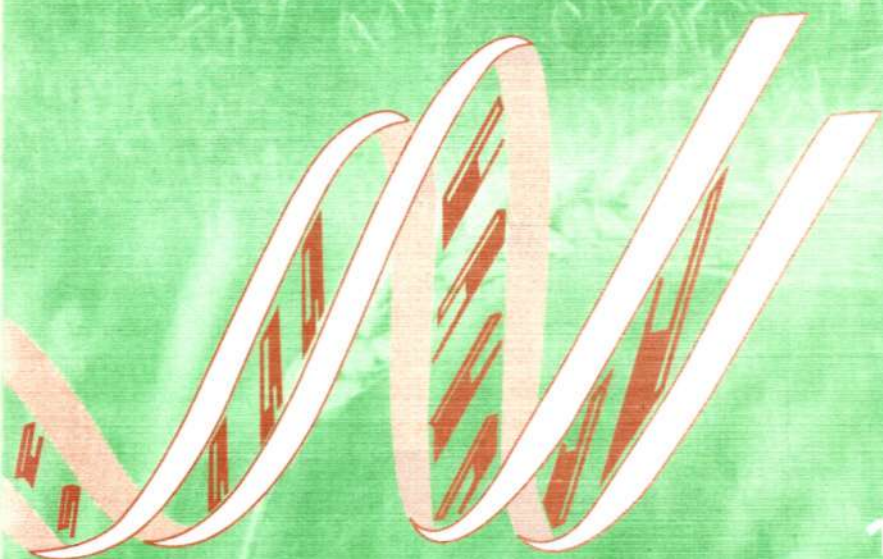


ISSN 1810-7834

# ВІСНИК

УКРАЇНСЬКОГО ТОВАРИСТВА  
ГЕНЕТИКІВ І СЕЛЕКЦІОНЕРІВ



ТОМ 4

1 · 2006

### **Редакційна колегія:**

Шеф-редактор **М. В. РОЙК**  
Головний редактор **В. А. КУНАХ**  
Заступники головного редактора:  
**В. П. БУРКАТ, Л. Л. ЛУКАШ**

**І. Р. БАРИЛЯК**  
**Я. Б. БЛЮМ**  
**Н. Г. ГОРОВЕНКО**  
**М. В. ЗУБЕЦЬ**

**Л. Є. КОВАЛЬЧУК**  
**М. В. КУЧУК**  
**С. С. МАЛЮТА**  
**В. В. МОРГУН**  
**В. Г. МИХАЙЛОВ**

**Л. А. НАЛЕСКІНА**  
**Т. В. НОВАК**  
**М. А. ПИЛІНСЬКА**  
**Ю. М. СИВОЛАП**  
**В. О. ФЕДОРЕНКО**

### **Редакційна рада:**

**А. АТАНАСОВ (Болгарія)**  
**Б. В. ДЗЮБЕЦЬКИЙ**  
**В. А. ДРАГАВЦЕВ (Росія)**  
**Н. А. КАРТЕЛЬ (Білорусь)**  
**В. В. КИРИЧЕНКО**  
**Г. І. ЛАЗЮК**

**Б. П. МАЦЕЛЮК**  
**М. Д. МЕЛЬНИЧУК**  
**О. О. СОЗИНОВ**  
**А. А. СИБІРНИЙ**  
**Г. В. СКИБАН**  
**А. Х. СТЕЛЬМАХ**

**В. П. ПАТИКА**  
**В. М. ТОЦЬКИЙ**  
**В. К. ШУМНИЙ (Росія)**  
**Т. М. ЧЕЧЕНЄВА**  
**Г. ФЕДАК (Канада)**

Відповідальний секретар **О. О. ПОРОННИК**

*Адреса редакції:*

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України  
вул. Акад. Заболотного, 150, Київ, 03143  
E-mail: kunakh@imbg.org.ua

### **Editorial board**

Chief editor **M. V. ROIK**  
editor-in-Chief **V. A. KUNAKH**  
Deputy editors: **V. P. BURKAT, L. L. LUKASH**

**I. P. BARYLYAK**  
**Ya. B. BLUME**  
**N. G. GOROVENKO**  
**M.V. ZUBETS**

**L.Ye. KOVALCHUK**  
**M. V. KUCHUK**  
**S. S. MALYUTA**  
**V. V. MORGUN**  
**V. G. MYKHAILOV**

**I. A. NALESKINA**  
**T. V. NOVAK**  
**M. A. PYLINSKA**  
**Yu. M. SIVOLAP**  
**V. O. FEDORENKO**

### **Editorial Council:**

**A. ATANASOV (Bulgaria)**  
**B. V. DZYUBETSSKIY**  
**V. A. DRAGAVTSEV (Russia)**  
**N. A. KARTEL (Belarus)**  
**V. V. KYRYCHENKO**  
**G. B. LAZIUK (Belarus)**

**B. P. MATSELYUKH**  
**M. D. MELNYCHUK**  
**O. O. SOZINOV**  
**A. A. SIBIRNIY**  
**G. V. SKYBAN**  
**A. F. STELMAKH**

**V. P. PATYKA**  
**V. M. TOTSKIY**  
**V. K. SHUMNY (Russia)**  
**T. M. CHECHENEVA**  
**G. FEDAK (Canada)**

Responsible secretary **O. O. PORONNYK**

Editorial office address:  
Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine  
150, Acad. Zabolotnogo str., Kyiv, 03143  
E-mail: kunakh@imbg.org.ua

# ВІСНИК

## УКРАЇНСЬКОГО ТОВАРИСТВА ГЕНЕТИКІВ І СЕЛЕКЦІОНЕРІВ

ТОМ 4

№ 1

2006

The Bulletin of the Ukrainian Society for Genetics and Selections

ВИХОДИТЬ ДВІЧІ НА РІК \* КИЇВ

### ЗМІСТ

#### Експериментальні роботи

Бублик О. М., Андреев І. О., Спіридонова К. В.,  
Можилевська Л. П., Кунах В. А. Вивчення ге-  
номної мінливості культури тканин *Ungernia*  
*victoris* за допомогою RAPD-маркерів

Дерев'яно О. О., Луцик А. П., Бабаянц О. В.,  
Кожухова Н. Е., Сиволап Ю. М. ПЛР-аналіз  
внутрішньовидового поліморфізму *Fusarium*  
*oxysporum* v. *orthoceras*

Єфименко В. Г., Кожухова Н. Е., Сиво-  
лап Ю. М. Молекулярно-генетична харак-  
теристика генотипів кукурудзи за складом  
мікросателітних локусів

Галаєв О. В., Сиволап Ю. М. Особливості  
змін геному *Triticum aestivum* внаслідок  
гібридизації з *Aegilops cylindrica*

Кнута Ю. Ф., Андреев І. О., Спіридоно-  
ва К. В., Мірюта Н. Ю., Адонін В. І., Кунах В. А.  
Особливості змін геному *Crepis capillaris* в  
культури *in vitro* на цитологічному та моле-  
кулярному рівні

Лобанова К. І., Жосонар М. В., Ігнатова С. О.  
Шляхи реалізації регенераційного потенці-  
алу в культурі пиляків у різних генотипів озимі  
м'якої пшениці

Майданюк Д. Н., Андреев І. О., Спиридо-  
нова К. В., Чеченева Т. Н., Кунах В. А. Ге-  
номная изменчивость линии кукурузы

### CONTENTS

#### Experimental works

3 Bubyk O. M., Andreev I. O., Spiridonova K. V.,  
Mozhylevska L. P., Kunakh V. A. Studies on  
the genome variability in *Ungernia victoris*  
tissue culture through RAPD-markers

12 Derevyanko O. A., Lucick A. P., Kozhukho-  
va N. E., Babayants O. V., Sivolap Yu. M. PCR-  
analysis of *Fusarium oxysporum* v. *orthoceras*  
intraspecific polymorphism

21 Yefimenko V. G., Kozhukhova N. E., Sivo-  
lap Yu. M. Molecular-genetic characterization  
maize genotypes by microsatellite loci com-  
position

31 Galaev A. V., Sivolap Yu. M. Peculiarity of  
change genome *Triticum aestivum* as result  
hybridisation with *Aegilops cylindrica*

40 Knutova Yu. F., Andreev I. O., Spiridonova K. V.,  
Miryuta N. Yu., Adonin V. I., Kunakh V. A. The  
peculiarities of genome rearrangements on  
cytological and molecular level in *Crepis*  
*capillaris* tissues cultured *in vitro*

52 Lobanova K. I., Zhosonar M. V., Ignatova S. A.  
The way to realization regeneration potential  
in anther culture of different genotypes of  
winter soft wheat

58 Maidanyuk D. N., Andreev I. O., Spiridono-  
va K. V., Checheneva T. N., Kunakh V. A.  
Genome variability of maize line Black Mexican

Black Mexican Sweet Corn C456 в культурі тканин *in vitro*: результати RAPD-аналіза

Горовенко Н. Г., Недобой А. М., Ольхович Н. В., Іванова Т. П., Кочнева О. М., Пичкур Н. О., Грегуйль І. С. Визначення хітотриозидазної активності в плазмі крові як критерій підтверджуючої діагностики хвороби Гоше

Пінчук А. П., Чорнобров О. Ю. Особливості мікроклонального розмноження дуба звичайного (*Quercus robur* L.), кленів гостролистого (*Acer platanoides* L.) та псевдоплатанового (*Acer pseudoplatanus* L.)

Сорока А. І. Влияние состава питательной среды на регенерацию побегов из каллуса пыльников льна масличного

Страшнюк Н. М., Леськова О. М., Мельник В. М., Кунах В. А. Отримання та біохімічний аналіз культури тканин тирличу безстеблового (*Gentiana acaulis* L.)

Стрельникова В. В., Сорока А. І. Влияние фитогормонов на каллусогенез в культурі пыльников мака масличного

#### Огляди

Кок І. П., Строчковська Л. І., Козлов Е. А., Соломко О. П. Етапи розвитку в Україні молекулярної генетики бакуловірусів

Сиволал Ю. М. ДНК-технології в рослинництві України

#### Особистості

Малюта С. С. Три кити академіка С. М. Гершензона (до 100-ліття від дня народження)

Карпова І. С., Горовенко Н. Г., Подольська С. В., Россоха З. І., Корецька Н. В., Дмитренко В. В., Рymar С. Е. Інсерційний механізм ДНК-мутагенеза (к 100-літтю со дня рождення С. М. Гершензона)

#### Ювілеї

Віктор Анатолійович Кунах (до 60-ліття від дня народження)

Ярослав Борисович Блюм (до 50-ліття від дня народження)

#### Інформація

Кунах В. А. Стан та проблеми розвитку біотехнології в Україні (за результатами наукової конференції)

Правила для авторів

Sweet Corn C456 in tissue culture *in vitro*: RAPD-analysis results

68 Gorovenko N., Nedoboy A., Olkhovich N., Ivanova T., Kochneva O., Pichkur N., Hrehul I. Estimation of chitotriosidase activity in of plasma for correct diagnosis of Gaucher disease

76 Pinchuk A., Chornobrov O. Peculiarities of micropropagation of English oak (*Quercus robur* L.), Norway maple (*Acer platanoides* L.) and sycamore (*Acer pseudoplatanus* L.)

84 Soroka A. I. Contribution of nutrient medium composition to shoot regeneration from anther callus of Line oil-yielding

89 Strashniuk N. M., Les'kova O. M., Mel'nyk V. M., Kunakh V. A. Obtainment and biochemical analysis of the *Gentiana acaulis* L. tissue culture

96 Strelnikova V.V., Soroka A. I. Contribution of phytohormones to callusogenesis in anther culture of Poppy oil-yielding

#### Reviews

101 Кок І. П., Строчковська Л. І., Козлов Е. А., Соломко О. П. Етапи розвитку в Україні молекулярної генетики бакуловірусів

111 Sivolap Yu. M. DNA technology in plant production of Ukraine

#### Personalities

118 Malyuta S. S. Three whales of academician S. M. Gershenson (to centenary after birthday)

124 Karpova I. S., Gorovenko N. G., Podolskaya C. V., Rossokha Z. I., Koretskaya N. V., Dmytrenko V. V., Rymar S. E. Insertional mechanism of DNA-mutagenesis (to centenary after S. M. Gershenson's birthday)

#### Jubilee

130 Viktor A. Kunakh (to 60-th anniversary)

133 Yaroslav B. Blume (to 50-th anniversary)

#### Information

135 Kunakh V. A. State and problems of biotechnology development in Ukraine

138 Rule for authors

УДК 575.22: 582.573.21 + 576.5

## ВИВЧЕННЯ ГЕНОМНОЇ МІНЛИВОСТІ КУЛЬТУРИ ТКАНИН *UNGERNIA VICTORIS* ЗА ДОПОМОГОЮ RAPD-МАРКЕРІВ

О. М. БУБЛИК, І. О. АНДРЕЄВ, К. В. СПІРІДОНОВА,  
Л. П. МОЖИЛЕВСЬКА, В. А. КУНАХ

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,  
Україна, 03143, Київ, вул. Акад. Заболотного, буд. 150,  
kunakh@imbg.org.ua

Методом RAPD ПЛР досліджено шість дев'ятирічних клітинних ліній калюсних культур спільного походження, які тривалий час вирощували на різних за складом живильних середовищах та дві інтактні рослини унгернії Віктора. Генетична відстань за Неєм між двома дослідженими рослинами склала 29,93%, що може свідчити про високу мінливість геному унгернії у природі. Майже у 20 разів нижчим виявилось середнє значення генетичних відстаней для різних клітинних ліній, воно становило 1,64%. Не виявлено помітного впливу компонентів живильних середовищ, у тому числі фітогормонів, на рівень соматоклональної мінливості. Отримані дані свідчать про низьку мінливість геному унгернії Віктора за досліджених умов вирощування в культурі тканин *in vitro*.

Ключові слова: *Ungernia victoris*, соматоклональна мінливість, RAPD-ПЛР, культура тканин рослин

**В**ступ. Унгернія Віктора, *Ungernia victoris* Vved. ex Artjushenko (родина амарилісових *Amarylidaceae*) – багаторічна цибулинна рослина, ендемік, що зустрічається лише в горах Таджикистану та Узбекистану. Лікувальні властивості унгернії Віктора обумовлені ізохіноліновими алкалоїдами, що містяться в її цибулинах, коренях та листках. Крім основного алкалоїду галантаміну, ця рослина містить алкалоїди лікорин, гіппеастрин, горденін, нарведин, танцетин та панкратин. У медицині галантамін використовують як засіб, що знімає залишкові явища поліомієліту, поліневриту, радикуліту; при травматичних ушкодженнях чуттєвих і рухових нервів, при міастенії, прогресивній м'язовій дистрофії; для лікування атонії кишечника і сечового міхура; у функціональній рентгенодіагностиці при захворюваннях шлунка і кишечника та як відхаркувальний засіб при захворюваннях легень і бронхів. Алкалоїд лікорин володіє бронхолітичною дією, застосовується як відхаркувальний засіб при запальних процесах у легенях та бронхах, бронхіальній астмі [1].

© О. М. БУБЛИК, І. О. АНДРЕЄВ, К. В. СПІРІДОНОВА, Л. П. МОЖИЛЕВСЬКА, В. А. КУНАХ, 2006

На сьогоднішній день природна сировинна база унгернії є обмеженою, а її інтродукція не досягла успіху. Гостро стоїть проблема створення альтернативних джерел біомаси для отримання алкалоїдів та збереження генофонду цього ендеміка. Вирішення даних завдань покладають на культуру *in vitro*, яка забезпечує прискорене розмноження та нарощування біомаси, що не поступається властивостями тканинам інтактних рослин. Культура тканин *U. victoris* може слугувати джерелом отримання алкалоїдів [2], а також сполук антимуутагенної та радіопротекторної дії [3–7].

Перепоною для досягнення поставлених вище завдань з отримання альтернативної сировинної бази та збереження генофонду *U. victoris* може стати соматоклональна мінливість, яка виникає в процесі вирощування клітин і тканин рослин на штучних живильних середовищах *in vitro*. Ця мінливість (генетична та епігенетична) може бути однією з причин порушення синтезу вторинних метаболітів у культурі *in vitro*, що спостерігається в унгернії Віктора. У такому разі, підтримання геному у стані, властивому інтактній рослині, дозволить обійти цю проблему та стабілізувати синтез вторинних метаболітів [8].

У культурі тканин *in vitro* екзогенні фітогормони та інші компоненти живильних середовищ впливають на стабільність геному, викликаючи зміни, які можуть накопичуватися в процесі культивування [9–12]. Тому для дослідження впливу на геном *U. victoris* розроблених у нашій лабораторії біотехнологічних підходів та живильних середовищ та перевірки можливості їх довготривалого використання без шкоди для збереження генофонду ми обрали

культури з різним очікуваним рівнем мутацій. Методом RAPD ПЛР було вивчено геномні відмінності між шістьма клітинними лініями калюсних культур унгернії Віктора спільного походження, що культивувалися протягом дев'яти років на живильних середовищах різного складу. Для оцінки рівня соматоклональної мінливості її порівнювали із внутривидовим поліморфізмом, який визначали за наявністю відмінностей між двома інтактними рослинами.

### Матеріали і методи

Матеріалом для дослідження слугували шість отриманих від однієї вихідної рослини дев'ятирічних клітинних ліній калюсних культур та дві інтактні рослини *U. victoris*.

Досліджені рослини зібрані в районі природного ареалу на Памірі (Південні схили Гісарського хребта, Таджикистан). Калюсну тканину отримували із стерильних свіжих лусок цибулини, яку перед введенням в культуру *in vitro* витримували 2 роки в стадії спокою при температурі 5–8 °С.

Культури вирощували на середовищах з різною мінеральною основою, вмістом сахарози, фітогормонів і мікродобавок. Повний склад середовищ і умови культивування наведені в описі до патенту [13].

**Виділення ДНК.** Ядерну ДНК для RAPD-аналізу екстрагували зі свіжої тканини інтактних рослин і калюсів за допомогою ДСН і протеїнази К із попереднім виділенням ядер за [16]. Отриману ДНК розчиняли в буфері 1 × TE, її якість і концентрацію оцінювали за допомогою гель-електрофорезу [17].

**Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР).** Для аналізу застосовували метод полімеразної ланцюгової реакції з

випадковими праймерами (RAPD-ПЛР). Використано 29 десятичленних праймерів, назви, нуклеотидні послідовності і температура гібридизації яких наведені в табл. 1. Ампліфікацію проводили в термоциклері Терцик МС2 (Біотехнологія, Росія). Для реакції використовували реактиви фірми Ампли-Сенс, Росія. Реакційна суміш для проведення ПЛР об'ємом 20 мкл містила: 20 нг ДНК, 0,2 мМ dNTP, 1,25 U Taq-полімерази, 0,25 нМ праймера, 1 × буфер з 1,5 мМ MgCl<sub>2</sub>. Для перевірки чистоти реактивів як негативний контроль у реакційну суміш замість розчину ДНК додавали рівний об'єм води. На реакційну суміш нашаровували 15 мкл мінеральної олії.

Ампліфікацію проводили в наступному режимі: 95 °С – 2 хв, 5 × (94 °С – 30 с,

t<sub>гібридизації</sub> – 30 с, 72 °С – 1 хв), 35 × (94 °С – 20 с, t<sub>гібридизації</sub> – 20 с, 72 °С – 40 с), 72 °С – 2 хв. 30 с. (див. табл. 1)

Дослід повторювали щонайменше двічі, враховували тільки добре помітні і відтворювані у повторних реакціях амплікони. Продукти ампліфікації розділяли методом електрофорезу (3-4 В/см) у 1,7%-ному агарозному гелі, який містив 0,5 мкг/мл бромистого етідію, в 1 × TBE буфері і фотографували в проникаючому УФ світлі цифровим фотоапаратом з використанням фільтра "O-2,8×". Для визначення розміру фрагментів використовували ДНК-маркер "100 bp +1,5 Kb" (СибЭнзим, Росія).

Статистична обробка даних RAPD-аналізу. Для кількісної оцінки RAPD-поліморфізму дані були представлені у вигляді бінарної матриці, у якій наяв-

**Таблиця 1.** Нуклеотидна послідовність і температура гібридизації використаних праймерів

№	Праймер	Нуклеотидна послідовність (5'-3')	t <sub>гібридизації</sub> , °С	№	Праймер	Нуклеотидна послідовність (5'-3')	t <sub>гібридизації</sub> , °С
1	A01	CAGGCCCTTC	37	16	B05	TGCGCCCTTC	37
2	A02	TGCCGAGCTG	37	17	B06	TGCTCTGCC	37
3	A03	AGTCAGCCAC	37	18	B07	GGTGACGCAG	37
4	A04	AATCGGGCTG	37	19	B08	GTCCACACGG	37
5	A09	GGGTAACGCC	37	20	474	AGGCGGGAAC	42
6	A12	TCGGCGATAG	37	21	АН30	TGGTCACTGT	37
7	A14	TCTGTGCTGG	38	22	G1	CCTGTTAGCC	37
8	A16	AGCCAGCGAA	38	23	M06	CTGGGCAACT	37
9	A17	GACCGCTTGT	38	24	M14	AGGGTCGTTC	37
10	A18	AGGTGACCGT	37	25	NO15	CAGCGACTGT	37
11	A19	CAAACGTCGG	37	26	OPA04	AGTCAGCCAC	37
12	A20	GTTGCGATCC	37	27	OPC09	CTCACCGTCC	37
13	B01	GTTTCGCTCC	37	28	QR1	CGGTCACTGT	34
14	B02	TGATCCCTGG	37	29	QR2	CGGCCACTGT	34
15	B03	CATCCCCCTG	37				

ність чи відсутність у RAPD-спектрі однакових за розміром ампліконів позначали відповідно як "1" чи "0". Далі з використанням програми PopGen [18] за Неєм [19] була побудована матриця генетичних відстаней і проведений кластерний аналіз за методом UPGMA.

### Результати та обговорення

Первинний калюс унгернії було отримано у 1995 році на двох різних за вмістом фітогормонів варіантах середовищ з мінеральною основою за Волосовичем та ін. [14](середовища 5С

та 5С01). У процесі подальшого культивування отриманих калюсних тканин деякі з них були перенесені на інші, спрощені за складом живильні середовища, які відрізнялися за складом макроелементів, вмістом сахарози та біологічно-активних добавок (табл. 2). Після певного періоду адаптації були отримані нові клітинні лінії, здатні активно рости на середовищах з мінімальною кількістю органічних добавок. Зокрема, отримано лінію 9а, що тривалий час вирощується на середовищі 5С, яке містить окрім мінеральних компонентів лише тіамін і сахарозу (табл. 3).

Таблиця 2. Компоненти, за якими відрізнялися досліджені варіанти живильних середовищ

Назва середовища	Макроелементи	Сахароза, %	Фітогормони, мг/л	Вітаміни, мг/л	Органічні добавки, мг/л
5С1	5С	5	Кінетин – 0,1; 2,4-Д – 1.	Тіамін – 1; Піридоксин – 0,5; Нікотинова кислота – 0,5.	Гліцин – 2; Мезоінозит – 80; Гідролізат казеїну – 500
5С01			Кінетин – 1; α – НОК – 2.		
5С3Н			Кінетин – 0,02; α – НОК – 0,5.		
5С			–	Тіамін – 1	–
2С		2	–	Тіамін – 1	–
МСТ	МС	5	Кінетин – 1; α – НОК – 2.	Тіамін – 0,4	Мезоінозит – 80; Гідролізат казеїну – 500

Таблиця 3. Генеалогія вивчених клітинних ліній *U. victoris*

Лінія №	Використані для культивування живильні середовища і кількість пасажів на них (в дужках)
2	5С1(5) → 5С01(55)
3	5С1(5) → 5С01(20) → 5С3Н(32)
5	5С1(5) → МСТ(4) → 5С01(47)
6	5С01(59)
7	5С01(19) → 5С3Н(36)
9а	5С01(19) → 5С3Н(16) → 2С (2) → 5С (17)

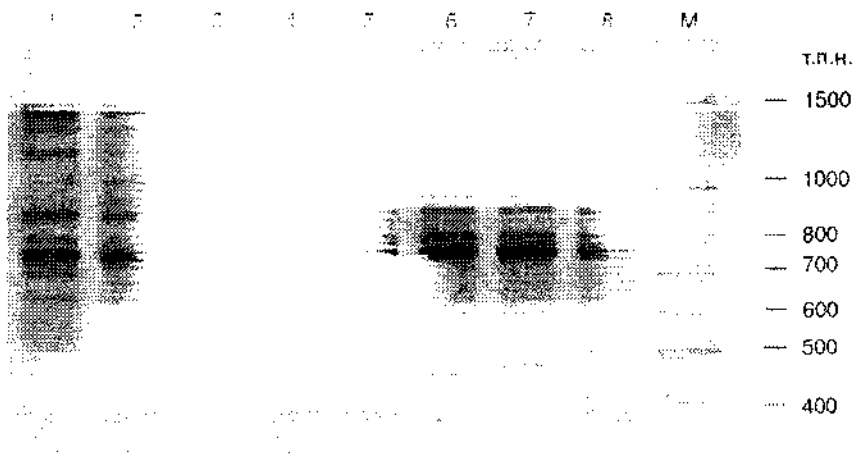


Протягом останніх 4–5 років вивчення отримані клітинні лінії ні морфологічно, ні за темпом росту суттєво не відрізнялися одна від іншої. Вони характеризуються стабільним неорганізованим типом та інтенсивним темпом росту. Вихід сирової (свіжої) біомаси з одного літра середовища на 50–60 добу росту складає 400–500 г, інколи до 550 г. У перерахунку на суху масу вихід складає 25–38 г/л за пасаж, а ростовий індекс коливається у межах 5–8.

Для роботи було обрано метод RAPD ПЛР, зважаючи на можливість його застосування для аналізу різних функціональних ділянок геному безпосередньо на рівні послідовності ДНК. Було досліджено геномний поліморфізм серед шести дев'ятирічних клітинних ліній калюсних культур, що мають спільне походження, та відмінності між двома інтактними рослинами унгернії.

Всього в роботі було випробувано 40 праймерів, 29 з яких забезпечували синтез чітких відтворюваних фрагментів і були відібрані для роботи. Ви-

користані праймери утворювали від 3 до 19 ампліконів (середнє значення – 10,9 на праймер), розміром у діапазоні 250–2000 п.н.. Загальна кількість врахованих ампліконів склала 317. Частина з них (а саме 172) були спільними для всіх об'єктів, інші 145 (45,74%) виявилися поліморфними. Крім якісних змін спектрів продуктів ПЛР, спостерігали також варіабельність за копієністю. Сім з використаних праймерів ампліфікували лише мономорфні для усіх об'єктів фрагменти, а 22-мономорфні для всієї групи калюсних ліній. Розходження у групі калюсних ліній виявили 8 із 239 характерних для неї ампліконів, тобто 3,35%. Сума врахованих для інтактних рослин фрагментів становила 276, з них варіабельних – 82 (29,71%). Отже за часткою варіабельних ампліконів внутрішньовидова мінливість перевищує варіабельність за довготривалого культивування *in vitro* майже у 9 разів, що свідчить про досить високу стабільність геному *U. victoris* в дослідженій культурі *in vitro* (рис. 1).



**Рисунок 1.** Типовий RAPD-спектр ДНК досліджених об'єктів: внутрішньовидовий поліморфізм та відсутність відмінностей у групі клітинних ліній (спектр отримано з праймером A02): 1 – інтактна рослина № 1, 2 – інтактна рослина № 2, 3 – клітинна лінія № 2, 4 – лінія № 3, 5 – лінія № 5, 6 – лінія № 6, 7 – лінія № 7, 7 – лінія № 9a, M – маркер молекулярної маси 100 bp + 1,5 Kb Ladder.

Генетичні відстані за Неєм між клітинними лініями (див. табл. 4) склали від 0,32% (для ліній № 6 і № 5, а також № 6 і № 7) до 1,91% (для ліній № 7 і № 9а). В той же час генетична відстань між двома дослідженими рослинами в природі мала значення 29,93%. Отримані результати наводять про думку про високу мінливість геному унгернії у природі. Така пластичність геному може бути наслідком адаптації і забезпечувати виживання цього виду в суворих умовах зростання (високогірні райони із значним сонячним опроміненням і різким коливанням температур, як добових так і річних). З іншого боку, вона може бути викликана особливостями його життєвого циклу і розмноження: унгернія – це багаторічна цибулинна рослина, яка має здатність до вегетативного розмноження.

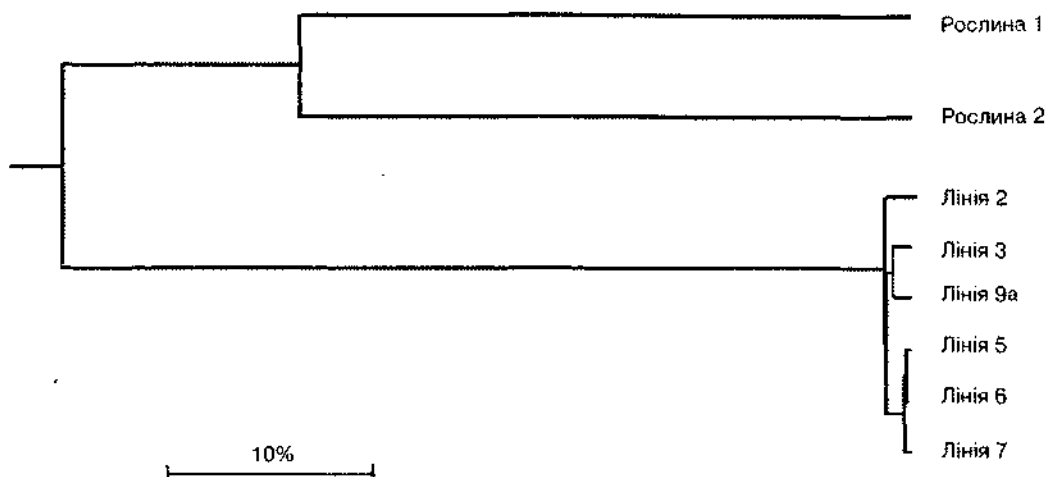
Відомо, що культивування *in vitro* викликає значні перебудови геному, що за своїм розмахом у раувольфії зміїної *Rauwolfia serpentina* порівняні з міжвидовими [20], а у женьшеня *Panax ginseng* – внутрішньовидовими [21]. Введення в культуру і подальше вирощування

в умовах ізолюваного росту *in vitro* є стресом для рослинної клітини. Цей стрес може індукувати зміни геному, на характер і рівень яких впливає склад живильного середовища, зокрема вміст фітогормонів. Разом з тим, при вивченні різних клітинних ліній унгернії, які тривалий час вирощувались на середовищах, що відрізнялися за складом мікроелементів, вмістом сахарози та біологічно-активних добавок, середнє значення генетичних відстаней становило лише 1,64%, що майже в 20 разів менше величини цього показника для досліджених інтактних рослин.

На дендрограмі генетичної подібності об'єктів (рис. 2) виявляються три найбільш віддалені точки, дві з яких представлені інтактними рослинами, третя – кластером клітинних ліній. Даний кластер утворює субкластер з ліній № 5, № 6 і № 7, що характеризуються найбільшим ступенем подібності. У другий підкластер калюсних культур увійшли лінії № 3 і № 9а, а лінія № 2 зайняла окреме віддалене положення. Явних закономірностей групування ліній за-

**Таблиця 4.** Генетичні відстані за Неєм [19] між дослідженими геномами унгернії Віктора за результатами RAPD-аналізу, %

		Інтактна рослина, №		Клітинна лінія, №					
		1	2	2	3	5	6	7	9а
Інтактна рослина, №	1	–							
	2	29,93	–						
Клітинна лінія, №	2	43,10	42,14	–					
	3	42,14	40,23	1,27	–				
	5	42,62	40,70	1,59	0,95	–			
	6	43,10	41,18	1,27	1,27	0,32	–		
	7	42,62	40,70	1,59	0,95	0,63	0,32	–	
	9а	43,59	41,66	1,59	0,95	1,27	1,59	1,91	–



**Рисунок 2.** Дендрограма генетичної подібності клітинних ліній та інтактних рослин, побудована UPGMA-методом за генетичними відстанями Нея.

лежно від історії культивування не виявлено. Попередні роботи з дослідження впливу компонентів живильних середовищ на геномну мінливість в культурі *in vitro*, виконані на томаті [22] і кактусі *Cereus peruvianus* [23], показали появу специфічних RAPD-профілів, характерних для калюсів, вирощуваних на живильних середовищах різного фітогормонального складу. Відомо, що підвищені дози фітогормонів володіють мутагенною дією, а низькі та близькі до оптимальних, навпаки, – захисною (антимутагенною) [11, 23, 24]. Отримані результати вказують на те, що використані в роботі варіанти живильних середовищ суттєво не відрізняються між собою за впливом на стабільність геному і не індукують значних геномних змін в культурі тканин унгернії Віктора. Отже, досліджені умови культивування тканин унгернії придатні для подальшого використання в біотехнологічній роботі, як для мікроклонального розмноження, так і для отримання штамів-продуцентів культивованих тканин.

## Висновки

Методом RAPD-аналізу проведено порівняльне дослідження мінливості геному різних клітинних ліній, які близько дев'яти років вирощували на різних за складом живильних середовищах, та інтактних рослин унгернії Віктора. Встановлено, що за генетичними відстанями за Несем мінливість в культурі тканин майже у 20 разів нижче внутрішньовидової. Не виявлено помітного впливу компонентів живильних середовищ, у тому числі фітогормонів на рівень соматоклональної мінливості. Отримані дані свідчать про низьку мінливість геному унгернії Віктора за досліджених умов вирощування в культурі тканин *in vitro*.

## Перелік літератури

1. Ходжиматов М. Дикорастущие лекарственные растения Таджикистана. – Душанбе: Гл. науч. ред. Тадж. Сов. Энциклопедии, 1989. – 368 с.
2. Александрова И. В., Гордонова Л. К., Тулакин В. Г., Усманов П. Д., Соложенкин П. М. Штамм культивируемых клеток растений *Ungernia victoris* – проду-

- цент алкалоидов группы галантамина и ликорина // Патент СССР № 18061188 А 3. МПК С12N5/04.– Оpubл. 30.03.1993, бюл. № 12.
3. Дворник А. С., Перерва Т. П., Кунах В. А. Скринінг препаратів, отриманих із культури тканин лікарських рослин, на антимутагенну активність у системі *Escherichia coli* – бактеріофаг  $\lambda$  // Цитология и генетика.– 2002.– 36, № 2.– С. 3–10
4. Кунах В. А., Можилевская Л. П., Музыка В. И., Колонина И. В. Культура тканей *Ungernia victoris* – перспективный источник биологически активных веществ // Биотехнология. Теория и практика (Алматы).– 1997.– № 3.– С. 78.
5. Кунах В. А., Музыка В. И., Можилевська Л. П., Колоніна І. В. Спосіб одержання біологічно активних речовин *Ungernia victoris* Vved. ex Artjuschenko // Деклар. патент України на винахід № 42982А. Оpubл. 15.11.2001. Бюл. № 10.
6. Можилевская Л. П., Адонин В. И., Дворник А. С., Музыка В. И., Колонина И. В., Кунах В. А. Культура тканей *Ungernia victoris* Vved. ex Artjuschenko. Получение, особенности и биологические эффекты экстракта // VIII International Conference "The Biology of Plant Cells In vitro and Biotechnology". September 9–13, 2003 (Saratov, Russia). Abstracts.– Saratov, 2003.– P. 215.
7. Дуган А. М., Бариліяк І. Р., Нестер Т. І., Дворник А. С., Кунах В. А. Дослідження антимутагенної активності екстрактів із біомаси культивованих клітин деяких лікарських рослин у тесті Еймса // Цитология и генетика.– 1999.– 33, № 6.– С. 19–25.
8. Аверьянова В. А., Александрова И. В., Быков В. А., Клицов С. В. Цитогенетические особенности начальной дедифференцировки культуры ткани ландыша майского (*Convallaria majalis* L.) // Генетика.– 1999.– 35, № 12.– С. 1674–1680
9. Rani V., Raina S. N. Genetic fidelity of organized meristem-derived micropropagated plants: a critical reappraisal // In Vitro Cell. Dev. Biol // Plant.– 2000.– 36, № 5.– P. 319–330.
10. Kaeppler S. M., Kaeppler H. F., Rhee Y. Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants // Plant molecular biology.– 2000.– 43.– P. 179–188.
11. Кунах В. А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи.– К.: Логос, 2005.– 724 с.
12. Jain S. M. Tissue culture-derived variation in crop improvement // Euphytica.– 2001.– 118.– P. 153–166.
13. Кунах В. А., Алпатова Л. К., Можилевська Л. П. Живильне середовище для одержання і вирощування калусних тканин рослин // Патент України № 10338А. Оpubл. 25.12.96. Бюл. № 4.
14. Воллосович А. Г., Пучинина Г. М., Николаева Л. А. Оптимизация состава макросолей для культуры тканей *Rauwolfia serpentina* Benth. // Растительные ресурсы.– 1979.– 15, № 4.– С. 516–526.
15. Murashige T., Skoog F. A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // Physiol. Plant.– 1962.– 15.– P. 473–497.
16. Генная инженерия растений. Лабораторное руководство (Под ред. Дж. Дрейпера, Р. Скотта, Ф. Армриджа, Р. Уолдена).– М.: Мир, 1991.– С. 252–257.
17. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование.– М.: Мир, 1984.– С. 411–412.
18. Yeh F. C., Boyle T. J. V. Population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits // Belgian Journal of Botany.– 1997.– 129.– P. 157.
19. Nei M. Estimation of Average Heterozygosity and Genetic Distance from a Small Number of Individuals // Genetics.– 1978.– 89.– P. 583–590
20. Соловьян В. Т., Спиридонова Е. В., Кунах В. А. Особенности геномной изменчивости культивируемых клеток *Rauwolfia serpentina* // Цитология и генетика.– 1994.– 30, № 5.– С. 21–25.
21. Козыренко М. М., Артюкова Е. В., Лауве Л. С., Журавлев Ю. Н., Реунова Г. Д. Генетическая изменчивость каллусных линий женьшеня *Panax ginseng* // Биотехнология.– 2001.– № 1.– С. 19–26.

22. Bogani P., Simoni A., Lio P., Germinario A., Buiatti M. Molecular variation in plant cell populations evolving in vitro in different physiological context // *Genome*. – 2001. – 44. – P. 549-558.
23. Mangolin C., Ottoboni L, Machado M. RAPD Markers to Evaluate Callus Tissue of *Cereus peruvianus* Mill. (*Cactaceae*) Maintained in Different Growth Regulator Combinations // *Biochemical Genetics*. – 2002. – 40, № 9, 10. – P. 351-358.
24. Кочиева Е. З., Хуссейн И. А., Легкобит М. П., Хадеева Н. В. Использование RAPD-анализа для выявления геномного полиморфизма у представителей рода *Stachys* // *Генетика*. – 2002. – 38, № 5. – С. 629-634.

Представлено М. В. Кучуком  
Надійшла 20.01.2006

#### ИЗУЧЕНИЕ ГЕНОМНОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ КУЛЬТУРЫ ТКАНЕЙ *UNGERNIA VICTORIS* С ПОМОЩЬЮ RAPD-МАРКЕРОВ

Е. Н. Бублик, И. О. Андреев,  
Е. В. Спиридонова, Л. П. Можилевская,  
В. А. Кунах

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины,  
Украина, 03143, Киев,  
ул. Акад. Заболотного, д. 150,  
kunakh@imbg.org.ua

Методом RAPD ПЦР исследованы шесть девятилетних клеточных линий каллусных культур общего происхождения, которые продолжительное время выращивались на разных по составу питательных средах и два интактных растения унгернии Виктора. Генетическое расстояние по Нею между двумя исследованными растениями составило 29,93%, что может свидетельствовать

о высокой изменчивости генома унгернии в природе. Почти в 20 раз меньшим оказалось среднее значение генетических расстояний для разных клеточных линий, оно равнялось 1,64%. Не выявлено заметного влияния компонентов питательных сред, в том числе фитогормонов, на уровень соматоклональной изменчивости. Полученные данные свидетельствуют о низкой изменчивости генома унгернии Виктора при использованных условиях выращивания в культуре тканей *in vitro*.

**Ключевые слова:** *Ungernia victoris*, соматоклональная изменчивость, RAPD-ПЦР, культура тканей растений.

#### STUDIES ON THE GENOME VARIABILITY IN *UNGERNIA VICTORIS* TISSUE CULTURE THROUGH RAPD-MARKERS

O. M. Bublyk, I. O. Andreev, K. V. Spiridonova,  
L. P. Mozhylevska, V. A. Kunakh

Institute of molecular biology and genetics of Natl. Acad. Sci. of Ukraine,  
Ukraine, 03143, Kiev,  
Akad. Zabolotnogo str., 150,  
kunakh@imbg.org.ua

Six nine year long callus culture cell lines to share joint origin as maintained for long time on the nutrient media differing by composition and two *Ungernia victoris* intact plants have been studied by RAPD PCR. Genetic distance mean value by Nei between the two plants evaluated made up 29,93% to suggest high natural *Ungernia victoris* genome variation. Genetic distance mean value for various cell lines appeared to be almost 20 times less than the later to account for 1,64%. The results obtained indicate low *Ungernia victoris* genome variability upon the *in vitro* tissue culture maintenance conditions involved.

**Key words:** *Ungernia victoris*, somaclonal variation, RAPD-PCR, plant tissue culture.

УДК: 575:633.15:113:027.2

## **ПЛР-АНАЛІЗ ВНУТРІШНЬОВИДОВОГО ПОЛІМОРФІЗМУ *FUSARIUM OXYSPORUM* V. *ORTHOCERAS***

О. О. ДЕРЕВ'ЯНКО<sup>1</sup>, А. П. ЛУЦИК<sup>1</sup>, О. В. БАБАЯНЦ<sup>2</sup>,  
Н. Е. КОЖУХОВА<sup>1</sup>, Ю. М. СИВОЛАП<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Південний біотехнологічний центр у рослинництві УААН і МОНУ,  
Україна, 65036, м. Одеса, Овідіопольська дор., 3,  
[natavolk@rambler.ru](mailto:natavolk@rambler.ru)

<sup>2</sup>Селекційно-генетичний інститут УААН,  
Україна, 65036, м. Одеса, Овідіопольська дор., 3,

Здійснено ПЛР-аналіз внутрішньовидового поліморфізму *Fusarium oxysporum* v. *orthoceras*. Рівень поліморфізму в межах вибірки склав 78 %. Це свідчить про широку мінливість досліджених об'єктів. Встановлено, що кластеризація за даними ПЛР-аналізу співпала з наявністю *skp1/skp2*-подібних фрагментів ретротранспозону *skippy* у складі геномів штамів.

Ключові слова: ПЛР-аналіз, внутрішньовидовий поліморфізм, *Fusarium oxysporum* v. *orthoceras*, ретротранспозон *skippy*

**Вступ.** Гриб *Fusarium oxysporum* v. *orthoceras* – фітопатоген, що викликає трахеомікозне в'янення (фузаріоз) паростків злакових рослин, серед яких є агрономічно важливі культури, такі як кукурудза, пшениця, ячмінь та інші [1, 2]. Як і більшість представників роду *Fusarium*, *F. oxysporum* v. *orthoceras* продукує токсини, які є небезпечними для людей та сільськогосподарських тварин [3–5]. У теперішній час дуже важливим є захист рослин та зерна від фузаріозів [6].

Генетичний матеріал грибів містить певний для кожного виду (штаму) потенціал патогенності. Зміна цього показника здійснюється завдяки обміну генетичною інформацією, а також внаслідок транспозиції у геномі грибів мобільних генетичних елементів (МГЕ, транспозибельні елементи), що є основною причиною спонтанних мутацій [7]. Встановлено, що близько 5 % від геному *F. oxysporum* складають транспозибельні елементи (ТЕ) [8–10]. Морфологічні та патогенні властивості популяції грибів можуть змінюватися внаслідок активування у геномі грибів МГЕ під впливом взаємодії з рослинами, що різняться за рівнем стійкості до патогенів, а також при використанні фунгіцидних препаратів.

Для того, щоб створити надійну та безпечну систему захисту рослин від фітопатогенних грибів, дуже важливим є вивчення поліморфізму грибного роду, виду, варіації чи окремого індивіду, встановлення шляхів мінливості та умов середовища, що викликають ці зміни, тобто необхідно розробити систему прогнозування розвитку хвороби залежно від зовнішніх умов. Сучасні технології ДНК-профілювання, зокрема на основі полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), дозволяють проводити детальне дослідження геномів різних об'єктів. Перевага ПЛР-методів перед традиційними (мікологічними) полягає у високій розподільчій здатності, можливості тестування на будь-якій стадії розвитку організму, відносній швидкості та легкості отримання результатів [11–13].

Мета даної роботи полягала в аналізі молекулярно-генетичної варіабельності штамів *Fusarium oxysporum v. orthoceras*, що вражають злакові культури Південного регіону України. Виходячи з поставленої мети, визначили наступні задачі: вивчення видового поліморфізму *F. oxysporum v. orthoceras* і пошук зв'язку між рівнем генетичної спорідненості серед штамів та їх патогенністю.

### **Матеріали і методи**

**Штами *Fusarium*.** Дослідження видової молекулярно-генетичної різноманітності проводили на вибірці 19 штамів *Fusarium oxysporum v. orthoceras*, відмінних за комплексом морфологічних ознак та за рівнем патогенності. Характеристику штамів, що досліджували, наведено у таблиці 1.

Штами виділені у чисту культуру з інфікованих качанів кукурудзи і зерен

пшениці [14]. Штами вирощували з однієї конідії. Кожний штам досліджували в трьох повторюваннях, тобто досліджували три моноспорові культури, які вирощували на картопляному агарі (1 л води, 500 г картоплі, 10 г глюкози, 20 г агару, рН 4,7) протягом 14 діб при 24 °С.

**Виділення ДНК** з міцелію проводили згідно СТАВ-протоколу [15].

**ДП-ПЛР** (довільно праймована ПЛР) здійснювали на ампліфікаторі "Терцик" ("ДНК-технологія", Росія) у наступному режимі: початкова денатурація — 93 °С, 2 хв; 30 циклів: 93 °С, 30 сек; 52 °С, 30 сек; 72 °С, 1 хв; заключна елонгація — 72 °С, 2 хв. Реакційна суміш об'ємом 20 мкл містила: буфер (50 mM KCl, 20 mM тріс-НСІ рН 8,4 (25 °С), 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,01 % твін-20); 0,2 mM кожного dNTP; 0,2 мкМ праймера; 20 нг ДНК; 1 одиницю ДНК-полімерази Taq. На реакційну суміш нашаровували 20 мкл мінерального масла. Кодування і послідовності праймерів наведені у таблиці 2.

**STS-ПЛР** (Sequence Target Site; спрямована ПЛР) здійснювали на ампліфікаторі "Терцик" ("ДНК-технологія", Росія) у наступному режимі: початкова денатурація — 93 °С, 2 хв; 25 циклів: 93 °С, 1,5 хв; 47 °С, 1,5 хв; 72 °С, 2,5 хв; заключна елонгація — 72 °С, 10 хв.

Склад реакційної суміші співпадає з таким для ДП-ПЛР, крім праймеру: замість 0,2 мкМ одного праймеру додавали по 0,1 мкМ *skp1* та *skp2* (табл. 2).

**Електрофоретичний розподіл** продуктів ампліфікації проводили у горизонтальному "підводному" агарозному гелі розміром 20,0 × 15,0 × 0,5 см у приладі фірми "Hofer Scientific Instruments" (США) з TBE-буфером, при 60 В чотири години за кімнатної температури. ДНК візуалізували фарбуванням

Таблиця 1. Морфологічна характеристика штамів *Fusarium oxysporum* v. *Orthoceras*

Номер штаму	Повітряний міцелій	Колір строми	Колір пігменту	Макрокондії	Мікрокондії	Хламідоспори	Патогенність
59	Тонкий, пухнастий	Від світло-рожевого до лілового	Від молочно-білого до світло-лілового	Одиничні	Рясні	Рідкі	Патогенний
60	Рясний, пухнастий	Від молочного до світло-рожевого	Молочно-білий		Теж саме	Рідкі	Слабопатогенний
61	Рясний, пухнастий	Лілова	Темно-ліловий	Одиничні	Теж саме	Рідкі	Патогенний
62	Рясний, плівчато-павутинний	Молочно-пурпурово-лілова	Від молочно-білого до лілового	Немає	Теж саме	Рясні	Непатогенний
63	Рясний, пухнастий	Лілова	Темно-ліловий	Немає	Теж саме	Рясні	Непатогенний
64	Плескато-пухнастий	Від світло-рожевого до пурпурового	Молочно-білий	Немає	Теж саме	Рідкі	Слабопатогенний
65	Тонко-павутинний	Лілово-пурпурна	Від лілового до лілово-помаранчевого	Одиничні	Теж саме	Рясні	Патогенний
66	Стелиться, плескато-павутинний	Від рожевого до пурпурного	Від помаранчевого до лілового	Немає	Теж саме	Рясні	Слабопатогенний
67	Рясний, пухнастий, повстяний	Від рожевого до красного	Від світло-жовтого до грязно-жовтого	Немає	Теж саме	Рясні	Слабопатогенний
71	Слабко-павутинний	Від світло-рожевого до пурпурного	Рожево-ліловий	Немає	Теж саме	Рясні	Слабопатогенний
72	Тонко-павутинний	Лілово-пурпурна	Від лілового до лілово-помаранчевого	Одиничні	Теж саме	Рідкі	Високопатогенний
73	Стелиться, плескато-тонко-павутинний	Лілово-пурпурна	Від лілового до лілово-помаранчевого	Немає	Теж саме	Рясні	Високопатогенний
74	Тонко-павутинний	Лілово-пурпурна	Від лілового до лілово-помаранчевого	Одиничні	Теж саме	Рясні	Високопатогенний
75	Стелиться, слабко-пухнастий	Від світло-рожевого до пурпурового	Рожево-ліловий	Немає	Теж саме	Рясні	Слабопатогенний



Продовження табл.

Номер штамму	Повітряний міцелій	Колір строми	Колір пігменту	Макро-конідії	Микро-конідії	Хламідоспори	Патогенність
713	Плескато-пухнастий	Від темно-рожевого до пурпурового	Від світло-помаранчевого до пурпурового	Немає	Теж саме	Рясні	Слабопатогенний
Мф 714к	Плескато-пухнастий	Від темно-рожевого до пурпурового	Від світло-помаранчевого до пурпурового	Одиничні	Теж саме	Рясні	Слабопатогенний
715	Плескато-пухнастий	Лілово-пурпурна	Від світло-помаранчевого до пурпурового	Одиничні	Теж саме	Рясні	Слабопатогенний
716	Степиться, плескато-лаутинний	Від темно-рожевого до пурпурного	Лілово-пурпурний	Немає	Теж саме	Рясні	Слабопатогенний
717	Степиться, плескато-тонко-лаутинний	Лілово-пурпурна	Від світло-рожевого до помаранчевого	Немає	Теж саме	Рясні	Високопатогенний

**Таблиця 2.** Праймери, що використовували у дослідженні

Код праймера	Олігонуклеотидна послідовність
p74	5' – tag cct att ggg cca ccc – 3'
p80	5' – tgg gaa gtc ctc gtg ttg ca – 3'
p83	5' – gcc gtg aag cct gat gcc – 3'
p93	5' – ggg tgg cgt ggg gtg – 3'
g	5' – (acc) <sub>6</sub> g – 3'
n	5' – (agc) <sub>6</sub> c – 3'
b	5' – (gtc) <sub>6</sub> a – 3'
skp1	5' – caa cgg atg gaa gaa – 3'
skp2	5' – ctg cgt tct gct gtt – 3'

бромистим етидієм; гелі фотографували з використанням світлофільтру ОС-12 в ультрафіолетовому світлі (300 нм) на плівку "Мікрат-300". Електрофоретичні профілі ампліфікованої ДНК оцінювали візуально і кодували бінарно: наявність/відсутність смуги позначали "1"/"0" відповідно.

Відеозображення електрофоретичних профілів ампліфікованої ДНК одержували за допомогою системи доку-

ментації і аналізу електрофорезних гелів "Image Master VDS" ("Amersham Pharmacia Biotech", Великобританія).

**Кластерний аналіз.** Встановлення генетичних дистанцій за мірою схожості NL і графічну побудову дендрограми генотипів за незважуваним парногруповим методом з арифметичним усередненням (Unweighted Pair-Group Method Analysis – UPGMA) на основі даних електрофоретичного розподілу

продуктів ампліфікації здійснювали за допомогою комп'ютерної програми "TREE 4.0" [16].

Рівень поліморфізму оцінювали у відсотках як відношення поліморфних ПЛР-ампліконів до загального числа ПЛР-ампліконів, що детектують.

$$P = n_p / n_p + n_{np} \times 100\%,$$

де  $n_p$  – число поліморфних ПЛР-ампліконів, а  $n_{np}$  – число неполіморфних ПЛР-ампліконів.

### Результати та обговорення

Аналіз внутрішньовидового поліморфізму *F. oxysporum v. orthoceras*. Молекулярно-генетичне дослідження внут-

рішньовидової різноманітності випадкової вибірки *F. oxysporum v. orthoceras* (19 штамів) шляхом ПЛР з 20 довільними праймерами показало, що тільки сім праймерів виявляли поліморфні фрагменти (табл. 2). Це стало достатнім для унікальної диференціації досліджених генотипів штамів. Спектри ампліфікованої ДНК включали від 9 до 18 компонентів, середня кількість ПЛР-фрагментів на праймер складала 14,3. Загальна кількість проаналізованих ампліконів, різних за молекулярною масою, становила 100, із яких 78 — поліморфних.

На дендрограмі досліджених штамів *F. oxysporum v. orthoceras* утворилося два кластери I і II (рис. 1).

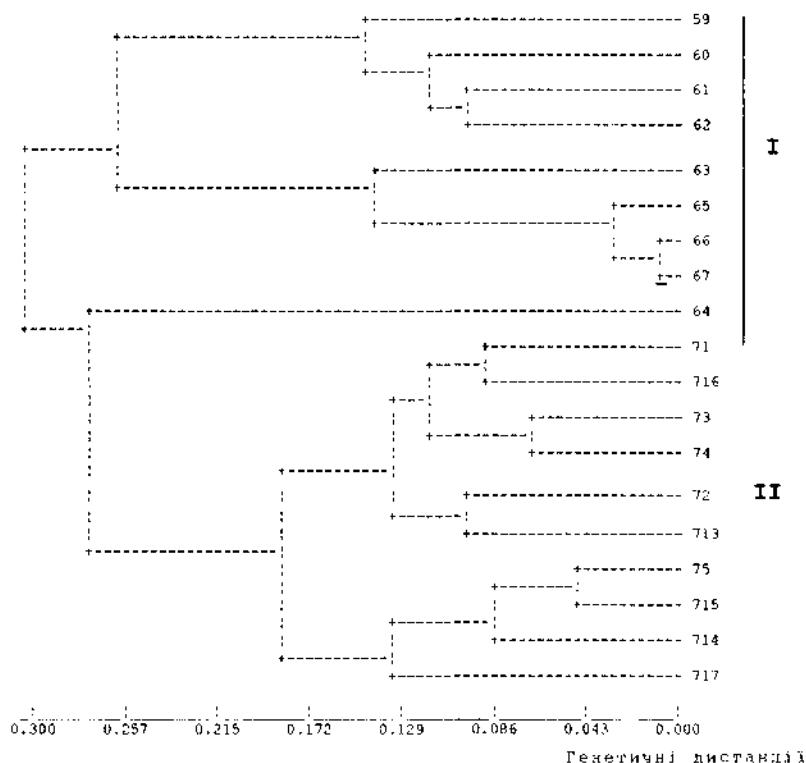


Рисунок 1. Дендрограма молекулярно-генетичної подібності штамів *Fusarium oxysporum v. orthoceras*, побудована за даними ПЛР-аналізу. 59, 60, 61, 62, 63, 65, 66, 67, 64, 71, 716, 73, 74, 72, 713, 75, 715, 714, 717 – номери штамів, що досліджували. I, II – кластери.

У перший кластер (I) увійшло два субкластери, один із яких містить слабкопатогенний штам 60, який характеризується рясним, пухнастим міцелієм, світло-рожевою стромою, молочно-білим кольором міцелію та пігменту у живильному середовищі, два патогенних штами: 59 (з тонким, пухнастим міцелієм, майже ліловою стромою, світло-ліловим пігментом) та 61 (з рясним, пухнастим міцелієм, ліловою стромою, темно-ліловим пігментом у середовищі), а також непатогенний штам — стимулятор росту сільськогосподарських рослин 62, який мав рясний, плівчато-павутинний міцелій, пурпурово-лілову строму та майже ліловий пігмент. В інший субкластер увійшли: два слабкопатогенні штами 66 та 67 з плескато-павутинним міцелієм, пурпуровою стромою, лілово-помаранчевим кольором пігменту та з рясним, пухнастим, повстяним повітряним міцелієм, красною стромою, грязно-жовтим пігментом відповідно; патогенний штам 65 (тонко-павутинний міцелій, лілово-пурпурова строма, лілово-помаранчевий пігмент) і непатогенний штам 63 з такими ж морфологічними ознаками як і у штаму 61, але є стимулятором росту рослин. Мінімальне значення генетичної дистанції у кластері I виявлено між генотипами 66 та 67 (0,013), а максимальне значення — між 59 та 67 (0,269).

Другий кластер (II) теж містить два субкластери. Перший з них містить три слабкопатогенні штами, строма яких має колір від світло-рожевого до пурпурового: 71 (слабко-павутинна структура міцелію, рожево-ліловий пігмент), 713 (міцелій — плескато-пухнастий, пігмент — змінюється до пурпурового кольору), 716 (міцелій стелиться, плескато-павутинний, фарбує середовище

у лілово-пурпуровий колір) та три високопатогенні штами 72, 73, 74, які дуже схожі за морфологічною характеристикою. Другий субкластер містить: три слабкопатогенні штами 75, мф714, 715 та один високопатогенний штам 717. Данні морфологічної оцінки штамів не асоціюються з результатами кластеризації. Значення генетичних дистанцій у кластері II варіювали від 0,052 до 0,285 між штамами 75 та 715 і 72 та 717 відповідно. Слабкопатогенний штам 64 не увійшов у жоден з субкластерів другого кластеру. За морфологічними ознаками даний штам різко не відрізняється від інших штамів кластеру, але генетична дистанція між ним та представниками кластера II складає 0,278.

У попередніх дослідженнях Дерев'яно О. О. та ін. [17] визначено внутрішньовидовий поліморфізм *F. moniliforme* v. *lactis* (18 ізолятів), що склав 49 % та *F. gibbosum* v. *acuminatum* (18 ізолятів), який склав 48 %. Чіткого розподілу штамів за рівнем патогенності не виявлено. У дослідженнях Assigbetse K. B. та ін. [18] встановлено внутрішньовидове різноманіття *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (46 ізолятів). Рівень поліморфізму серед них склав 55 %. Кластерний аналіз відобразив згрупування ізолятів у три кластери відповідно їх належності до рас та відповідно їх географічного походження, але чіткого групування штамів за рівнем патогенності не виявлено.

Між даними кластерного аналізу, морфологічними характеристиками та патогенністю штамів не виявлено чітких співвідношень, оскільки дендрограма базується на наявності чи відсутності певних послідовностей у гені об'єктів, що досліджували і не може відобразити їх активність та фенотиповий прояв.

Порівняння даних кластерного аналізу зразків *F. oxysporum v. orthoceras* з наявністю фрагментів від ретротранспозону *skippy*. ПЛР-аналіз геномної ДНК 19 штамів *Fusarium oxysporum v. orthoceras*, що досліджували з використанням пари специфічних праймерів (*skp1* та *skp2*) до ретротранспозону *skippy*, не виявив фрагменту, що очікували згідно досліджень Anaya N. і Roncero M. I. G. [10], довжиною 589 п.н., який складається з одного довгого термінального звороту (429 п.н.) та послідовностей, що його фланкують (66 п.н. – *skp1* та 94 п.н. – *skp2*).

Всі штами дійсно мали фрагмент довжиною 290 п.н. (рис. 2), який по результатах аналізу послідовностей у роботі Anaya N. і Roncero M. I. G. [10], не виявив гомології з послідовністю *skippy*, незважаючи на те, що мав кожен з послідовностей *skp1* та *skp2* з обох кінців.

Виявлено, що продукти ампліфікації ДНК штамів, які увійшли у перший кластер, з парою праймерів *skp1/skp2*, більш інтенсивні (рис. 2: 1-9), ніж у штамів з другого кластеру (рис. 2: 10-

19), що відображає різницю у кількості копій цих послідовностей у геномі [10]. Крім того, ДНК штамів другого кластеру мала ще один фрагмент довжиною 94 п.н., який ймовірно відповідає *skp2*-подібному фрагменту ретротранспозону *skippy*. Результати кластеризації штамів співпали з наявністю *skp1/skp2*-подібних фрагментів ретротранспозону *skippy*, який є одним з багатьох представників мобільних елементів, що здатні змінювати геном.

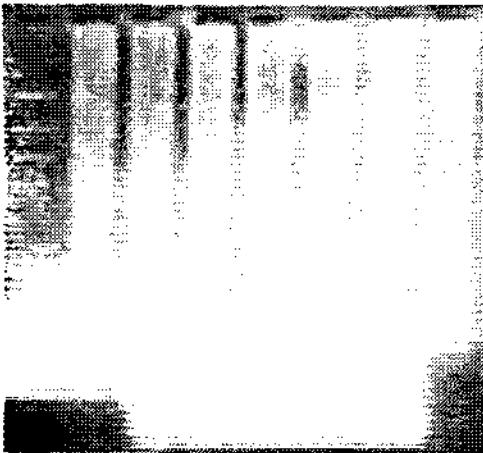
Для перевірки адекватності результатів ПЛР геномної ДНК штамів з праймерами *skp1* та *skp2* кластеризації штамів за даними ДП-ПЛР-аналізу провели STS-ПЛР з ДНК різних видів грибів роду *Fusarium* та кукурудзи.

На рисунку 3 показано, що ампліфікація фрагментів, які відповідають *skp1/skp2* послідовностям, пройшла тільки у зразків, що належать до виду *F. oxysporum*.

У зразків *F. moniliforme*, *F. graminearum*, *F. gibbosum* та суміші ДНК різних генотипів кукурудзи не виявлено жодного фрагменту.



**Рисунок 2.** Результати ПЛР з праймерами *skp1* та *skp2* і геномною ДНК 19 штамів *Fusarium oxysporum v. orthoceras*. М – маркер молекулярної ваги (pGEM). Доріжки 1–9 відповідають штамам 59, 60, 61, 62, 63, 65, 66, 67, 64; 10–19 – штамам 71, 716, 73, 74, 72, 713, 75, 715, 714, 717.



**Рисунок 3.** Перевірка специфічності роботи пари праймерів *skp1/skp2* для *skippy*. М – маркер молекулярної ваги (pGEM); 1 – *Fusarium oxysporum* 153/03; 2 – *Fusarium oxysporum* v. *orthoceras* 59; 3 – *Fusarium oxysporum* v. *orthoceras* 60; 4 – *F. moniliforme* v. *lactis* 94m; 5 – *F. graminearum*; 6 – *F. gibbosum* v. *acuminatum*; 7 – зміш ДНК кукурудзи: Гк 26, Дс 10/3, Кс 223.

Таким чином, показано наявність *skp1/skp2*-подібних фрагментів ретротранспозону *skippy* тільки у геномі представників *F. oxysporum* і відсутність їх у інших видів. Це свідчить про те, що пересування ретротранспозону *skippy* може відбуватись тільки у геномі *F. oxysporum*, оскільки детектовані послідовності *skp1* та *skp2* є гарячими точками рекомбінації.

## Висновки

Рівень поліморфізму серед 19 штамів *F. oxysporum* v. *orthoceras* склав 78 %, що свідчить про широку мінливість досліджуваних об'єктів. У цілому не відзначено відповідності між кластеризацією штамів за даними ДНК-профілювання, морфологічними характеристиками і рівнем патогенності, хоч і спостерігається така тенденція при розгляді окремих штамів. Кластеризація за даними ДП-

ПЛР-аналізу співпала з результатами STS-ПЛР, тобто з наявністю *skp1/skp2*-подібних фрагментів ретротранспозону *skippy* у складі геномів штамів.

Показано, що використання ПЛР-техніки дозволяє охарактеризувати геном грибів та виявити наявність мобільних елементів або їх структур.

## Перелік літератури

1. Билай В. И. Фузариоз. – Киев: Наук. думка, 1977. – 442 с.
2. Билай В. И. Микроорганизмы – возбудители болезней растений. – Киев: Наук. думка, 1988. – 146 с.
3. Билай В. И., Курбацкая З. А. Определитель токсинообразующих микромицетов. – Киев: Наук. думка, 1990. – 234 с.
4. Спасивцева Н., Хмелевский Б. Санитария кормов. – Москва: Колос, 1975. – 336 с.
5. Иващенко В. Г., Шпилюва Н. П., Нефедова Л. И. Биоэкологические и фитосанитарные аспекты исследования фузариоза колоса // Микология и фитопатология. – 1997. – 31, № 2. – С. 58–63.
6. Дьяков Ю. Т. О болезнях растений. – Москва: Агропромиздат, 1985. – 39 с.
7. Лісовий М. П. Историчні етапи розвитку досліджень генетики стійкості рослин щодо збудників хвороб // Захист і карантин рослин. – 2001. – вип. 47. – С. 3–31.
8. Wostemeyer J., Kreiboch A. Repetitive DNA elements in fungi (Mycota): impact on genomic architecture and evolution // Curr. Genet. – 2002. – 41. – P. 189–198.
9. Anaya N., Roncero M. I. Skippy, a retrotransposon from the fungal plant pathogen *Fusarium oxysporum* // Mol. Gen. Genet. – 1995. – 249. – P. 637–47.
10. Anaya N., Roncero M. I. Stress-induced rearrangement of *Fusarium* retrotransposon sequences // Mol. Gen. Genet. – 1996. – 253. – P. 89–94.
11. Булат С. А., Мироненко Н. В. Идентификация грибов и анализ их генетической изменчивости методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с геноспецифичными и неспецифичными праймерами // Генетика. – 1996. – 32, № 2. – С. 165–183.

12. Xu R., Wolters P., Snijders C. RAPD fingerprinting six *Fusarium* species causing *Fusarium* blight in cereals and grasses // Proceedings International Symposium on wheat improvement for scab resistance (Suzhou and Nanjing, China, 5-11 May 2000). - China, 2000. - P. 200-210.
13. Schilling A. G., Moller E. M., Geiger H. H. Polymerase chain-based assays for species-specific detection *Fusarium culmorum*, *F. graminearum* and *F. avenaceum* // *Phytopathology*. - 1996. - 86. - P. 515-522.
14. Билай В. И., Элланская И. А. Метод микрокультуры для получения типичного конидиеобразования в фузариев // *Микология и фитопатология*. - 1975. - 9, № 1. - С. 74-76.
15. Moller E., Bahnweng G., Sandermann H. and Geiger H. Simple and efficient protocol for isolation high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues // *Food Mycol.* - 1998. - 1. - P. 6115-6116.
16. Календарь Р. Н. Компьютерная программа для построения эволюционных деревьев на основе электрофоретических ДНК белков // *Доклады междунар. конф. "Молекулярно-генетические маркеры и селекция растений"*. - Киев. - 1994. - С. 25-26.
17. Дерев'янку О. О., Кожухова Н. Е., Бабаянц О. В., Сиволап Ю. М. Молекулярно-генетичний аналіз популяцій *Fusarium* spp. південного регіону України // *Вісник Одеського національного університету ім. І.І. Мечнікова*. - 2004. - 9. - вип. 5, № 1. - С. 105-112.
18. Assigbetse K. B., Fernandez D., Dubois M. P., Geiger J.-P. Differentiation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* races on cotton by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis // *Phytopathology*. - 1994. - № 84. - P. 622-626.
19. Szecsi A., Moller E. Differentiation Hungarian isolates three *Fusarium* species from section *Liseola* RAPD analysis // *Food Mycol.* - 1998. - 1, № 4. - P. 219-227.

Представлено В. А. Кунахом  
Надійшла 10.02.2006

## ПЦР-АНАЛИЗ ВНУТРИВИДОВОГО ПОЛИМОРФИЗМА *FUSARIUM OXYSPORUM* V. *ORTHO CERAS*

О. А. Дерев'янку<sup>1</sup>, А. П. Луцик<sup>1</sup>, Н. Э. Кожухова<sup>1</sup>, О. В. Бабаянц<sup>2</sup>, Ю. М. Сиволап<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Южный биотехнологический центр в растениеводстве УААН и МОНУ, Украина, 65036, г. Одесса, Овидиопольская дор. 3,

<sup>2</sup>Селекционно-генетический институт УААН, Украина, 65036, г. Одесса, Овидиопольская дор. 3,

Проведен ПЦР-анализ внутривидового полиморфизма *Fusarium oxysporum* v. *orthoceras*. Уровень полиморфизма в пределах выборки составил 78 %. Это свидетельствует о широкой изменчивости исследуемых объектов. Показано, что кластеризация по данным ПП-ПЦР-анализа совпала с наличием *skp1/skp2*-подобных фрагментов ретротранспозона *skippy* в составе геномов штаммов.

**Ключевые слова:** ПЦР-анализ, внутривидовой полиморфизм *Fusarium oxysporum* v. *orthoceras*, ретротранспозон *skippy*.

## PCR-ANALYSIS OF *FUSARIUM OXYSPORUM* V. *ORTHO CERAS* INTRASPECIFIC POLYMORPHISM

O. A. Derevyanko<sup>1</sup>, A. P. Lucick<sup>1</sup>, N. E. Kozhukhova<sup>1</sup>, O. V. Babayants<sup>2</sup>, Yu. M. Sivolap<sup>1</sup>

<sup>1</sup>South Plant Biotechnology Center UAAN, Ukraine, 65036, Odessa, Ovidiopol'skaya Dor. 3,

<sup>2</sup>Plant Breeding and Genetics Institute, Ukraine, 65036, Odessa, Ovidiopol'skaya Dor. 3,

PCR-analysis of *Fusarium oxysporum* v. *orthoceras* intraspecific polymorphism is carry out. The level of polymorphism of the selection strains was 78%. It testifies to wide changeability of the explored objects. Clusterization by AP-PCR data coincided with a presence *skp1/skp2*-like fragments of retrotransposon *skippy* in strains genomes.

**Key words:** PCR-analysis, intraspecific polymorphism, *Fusarium oxysporum* v. *orthoceras*, retrotransposon *skippy*.

•ДК: 633.15+575.22

## МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕНОТИПІВ КУКУРУДЗИ ЗА СКЛАДОМ МІКРОСАТЕЛІТНИХ ЛОКУСІВ

З. Г. ЄФИМЕНКО, Н. Е. КОЖУХОВА, Ю. М. СИВОЛАП

Підприємство біотехнологічний центр у рослинництві УААН і МОНУ  
Україна, 65036, м. Одеса, Овідіопольська дор., 3,  
zatyvolk@rambler.ru

Проведено ПЛР-аналіз 80 ліній і гібридів кукурудзи світової і української селекції. Вивчено алейний склад 21 мікросателітного локусу. Створено базу даних ДНК-типування, що містить молекулярно-генетичні характеристики генотипів кукурудзи за складом мікросателітних локусів.

Ключові слова: ПЛР-аналіз, генотипи кукурудзи

**ВСТУП.** Поліпшення кукурудзи потребує всесторонньої оцінки існуючого генофонду та нового вихідного селекційного матеріалу. Одним з найбільш ефективних методів дослідження геномів рослин для молекулярно-генетичної характеристики сорту, лінії, гібриду є ДНК-технології, зокрема, на основі полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) [1-3].

Мета нашої роботи полягала у ДНК-типуванні ліній і гібридів кукурудзи двох агрокліматичних зон України – Південного (Одеська обл.) та Північного (Дніпропетровська обл.) Степу.

Визначено наступні задачі: 1) Диференціація ліній та гібридів кукурудзи за допомогою ПЛР-аналізу 21 мікросателітного локусу, 2) Розрахунок показників ефективності маркерної системи, 3) Реєстрація досліджуваних генотипів у вигляді генетичних формул, 4) Оцінка зв'язку кластеризації генотипів за даними ДНК-типування та їх належності до генетичних груп, 5) Створення на основі отриманих результатів бази даних генотипів.

### Матеріали і методи

Досліджували 80 інбредних ліній і гібридів (простих, потрійних лінійних, подвійних міжлінійних) кукурудзи (*Zea mays* L.) регіонів Південного і Північного Степу, що відносяться до генотипів селекції Селекційно-генетичного інституту (СГІ, м. Одеса) і Інституту зернового господарства (ІЗГ,

© З. Г. ЄФИМЕНКО, Н. Е. КОЖУХОВА, Ю. М. СИВОЛАП, 2006

м. Дніпропетровськ), відповідно, і світової селекції. Аналізовані лінії належать до різних гетерозисних груп (Ланкастер, Рейд, BSSS (B37), Айодент, Лакаоне, T22, Миндзенпуста) та брали участь в утворенні аналізованих гібридів.

ДНК виділяли із суміші п'яти семи-добових етиольованих паростків згідно методики [4]. Для ПЛР-аналізу обрано мікросателітні (МС) локуси за критеріями хромосомної локалізації, довжини тандемного повтору, кількості алелей. ПЛР-ампліфікацію проводили

на термоциклері "Терцик" ("ДНК-Технологія", Росія) у наступному температурному режимі: початкова денатурація – 93 °С, 1,5 хв; 30 циклів – 93, 55, 70 °С – по 30 с; заключна елонгація – 70 °С, 2 хв. Реакційна суміш об'ємом 20 мкл містила: 50 mM KCl, 20 mM трис-HCl pH 8,4, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,01 % твін-20, 0,2 mM кожного dNTP, по 5 мкМ прямого і зворотнього SSR-праймеру, 20 нг ДНК, 2 од. ДНК-полімерази Taq.

Проводили ПЛР-аналіз 21 мікросателітного локусу, що розміщені на різних

Таблиця 1. Перелік МС маркерів для аналізу генотипів кукурудзи

№ пп	Мікросателітний локус			Алелі	
	назва	хромосома	код	число	розміри (п.н.)
1	phi 064	1	A	6	66,82,98,106,114
2	phi 083	2	B	3	135,140,145
3	phi 127-2	2	C	6	114,119,124,129,134,139
4	phi 090	2	D	2	148,151
5	phi 029	3	E	4	108,111,114,117
6	phi 047	3	F	4	135,147,159,165
7	phi 021	4	G	3	205,208,214
8	phi 093	4	H	3	164,170,176
9	<b>phi 076</b>	4	*	2	121,127
10	phi 079	4	I	4	184,188,192,196
11	<b>phi 113</b>	5	*	3	112,121,130
12	phi 024	5	J	3	181,183,185
13	phi 070	6	K	4	86,90,94,98
14	nc 012	6	L	3	102,107,112
15	phi 091	7	M	3	108,111,114
16	phi 051	7	N	3	147,153,159
17	phi 116	7	O	2	177,188
18	phi 115	8	P	2	98,114
19	phi 027	9	Q	4	139,144,159,153
20	phi 022	9	R	4	130,136,160,166
21	phi 071	10	S	4	172-184

Примітка: показники визначали без виключених локусів, що виділені жирним шрифтом.



хромосомах: phi 083, phi 127-2, phi 029, phi 047, phi 070, phi 113, phi 091, phi 051, phi 115, phi 064, phi 027, phi 021, phi 071, phi 093, phi 022, ps 012, phi 076, phi 116, phi 090, phi 079, phi 024 (табл. 1).

Послідовності праймерів взяті з електронної бази даних MaizeGDB ([www.maizegdb.org](http://www.maizegdb.org)) [5].

SSR-амплікони (5 мкл реакційної суміші) фракціонували у 10 % поліакриламідному гелі протягом 1,5 год при 500 В в 1 X TBE-буфері в апараті для вертикального електрофорезу ("Hoefler Scientific Instruments", США). Продукти ампліфікації зафарбовували азотнокислим сріблом. Відеозображення електро-

**Таблиця 2.** Значення частот зустрічання алелів 21 мікросателітного локусу у генотипів кукурудзи Південного та Північного Степу

Локус	Частота зустрічання алелів у генотипів											
	Північного Степу						Південного Степу					
№ алелей	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
phi 083	0,247	<b>0,604</b>	0,149	*	*	*	0,469	<b>0,531</b>	0	*	*	*
phi 127-2	<b>0,297</b>	0,188	<b>0,297</b>	0,156	0,047	0,015	<b>0,215</b>	0,157	<b>0,215</b>	0,170	0,157	0,086
phi 029	<b>0,414</b>	0,392	0,147	0,047	*	*	<b>0,453</b>	0,422	0,125	0	*	*
phi 047	<b>0,396</b>	0,325	0,279	0	*	*	0,314	<b>0,329</b>	0,300	0,057	*	*
phi 070	0,344	<b>0,514</b>	0,057	0,085	*	*	<b>0,519</b>	0,276	0,156	0,049	*	*
phi 113	<b>0,829</b>	0,171	0	*	*	*	<b>0,800</b>	0,129	0,071	*	*	*
phi 091	<b>0,744</b>	0,222	0,034	*	*	*	0,314	<b>0,657</b>	0,029	*	*	*
phi 051	0,489	<b>0,511</b>	0	*	*	*	0,458	<b>0,514</b>	0,028	*	*	*
phi 115	<b>0,611</b>	0,389	*	*	*	*	<b>0,500</b>	<b>0,500</b>	*	*	*	*
phi 064	0,100	0,222	<b>0,288</b>	0,166	0,100	0,122	0,044	0,103	<b>0,279</b>	<b>0,279</b>	0,176	0,117
phi 027	<b>0,463</b>	0,378	0,146	0,012	*	*	0,400	<b>0,600</b>	0	0	*	*
phi 021	<b>0,524</b>	0,452	0,024	*	*	*	<b>0,531</b>	0,438	0,031	*	*	*
phi 071	<b>0,570</b>	0,430	0	0	*	*	0,203	0,312	<b>0,448</b>	0,047	*	*
phi 093	0,422	<b>0,578</b>	*	*	*	*	<b>0,757</b>	0,243	*	*	*	*
phi 022	<b>0,489</b>	0,322	0,022	0,167	*	*	<b>0,828</b>	0,069	0,103	0	*	*
ps 012	<b>0,671</b>	0,049	0,280	*	*	*	<b>0,712</b>	0,152	0,136	*	*	*
phi 076	<b>0,678</b>	0,322	*	*	*	*	<b>0,824</b>	0,176	*	*	*	*
phi 116	0,344	<b>0,656</b>	*	*	*	*	0,406	<b>0,594</b>	*	*	*	*
phi 090	<b>0,577</b>	0,423	*	*	*	*	<b>0,853</b>	0,147	*	*	*	*
phi 079	0	0,345	<b>0,607</b>	0,048	*	*	0,360	<b>0,460</b>	0,180	0	*	*
phi 024	0,398	0,136	<b>0,466</b>	*	*	*	0,313	0,109	<b>0,578</b>	*	*	*
Середнє число алелей	3,263											

**Примітки:** показники визначали без виключених локусів, що виділені жирним шрифтом; півжирним курсивом виділено найбільш високочастотні алелі; позначкою "\*" позначено відсутність алелів у генотипів.

форетичних спектрів ампліфікованої ДНК отримували за допомогою системи документації і аналізу електрофорезних гелів Image Master VDS ("Amersham Pharmacia Biotech", Великобританія).

Ампліфіковані алелі кодували "1", "2", "n" від низькомолекулярного по збільшенню молекулярної маси.

Для оцінки маркуючої здатності обраної ПЛР-системи для кожного локусу розраховували частоти алелей (як відношення числа даного алеля до загальної кількості алелів), індекси поліморфності Polymorphic Index Content (PIC) за формулою:

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n f_i^2$$

де  $f_i^2$  – частота і-того алеля, вірогідність розрізнення генотипів (pD), гетерозиготність спостерігаєма ( $H_{obs}$ ) та очікувана ( $H_{exp}$ ), вірогідність випадкового співпадання генотипів (pM), оцінку достовірності  $\chi^2$  [6].

### Результати та обговорення

У таблицях 2–7 наведено математичні показники дискримінаційного потенціалу обраної маркерної системи. За відсутністю поліморфізму між

**Таблиця 3.** Значення індексу поліморфності (PIC) 21 мікросателітних локусів у генотипів кукурудзи Південного і Північного Степу

Локус	Значення PIC у генотипів		Середній PIC на локус
	Північного Степу	Південного Степу	
phi 083	0,543	0,480	0,512
phi 127-2	0,760	0,789	0,775
phi 029	0,718	0,571	0,645
phi 047	0,569	0,490	0,530
phi 070	0,605	0,658	0,632
<b>phi 113</b>	<b>0,245</b>	<b>0,111</b>	<b>0,178</b>
phi 091	0,531	0,520	0,526
phi 051	0,492	0,526	0,509
phi 115	0,444	0,497	0,471
phi 064	0,771	0,797	0,784
phi 027	0,551	0,480	0,516
phi 021	0,477	0,539	0,508
phi 071	0,580	0,659	0,620
phi 093	0,488	0,368	0,428
phi 022	0,629	0,299	0,464
nc 012	0,467	0,451	0,459
<b>phi 076</b>	<b>0,437</b>	<b>0,290</b>	<b>0,363</b>
phi 116	0,451	0,482	0,467
phi 090	0,488	0,251	0,369
phi 079	0,511	0,626	0,568
phi 024	0,597	0,549	0,573
Середній PIC на вибірку	0,561	0,528	0,545

**Примітка:** показники визначали без виключених локусів, що виділені жирним шрифтом.

Типовими представниками гетерозис-них груп і низькими значеннями PIC з

подальшого аналізу виключено локуси phi113 и phi076.

Таблиця 4. Вірогідність розпізнавання генотипів (rD) кукурудзи Південного і Північного Степу

Локус	Значення rD у генотипів		Середній rD на локус
	Північного Степу	Південного Степу	
phi 083	0,552	0,498	0,525
phi 127-2	0,761	0,822	0,791
phi 029	0,651	0,601	0,626
phi 047	0,660	0,699	0,680
phi 070	0,607	0,628	0,617
<b>phi 113</b>	<b>0,284</b>	<b>0,338</b>	<b>0,311</b>
phi 091	0,396	0,469	0,433
phi 051	0,500	0,525	0,513
phi 115	0,475	0,500	0,488
phi 064	0,805	0,787	0,796
phi 027	0,610	0,480	0,545
phi 021	0,521	0,525	0,523
phi 071	0,387	0,569	0,478
phi 093	0,648	0,489	0,568
phi 022	0,524	0,362	0,443
phi 012	0,608	0,453	0,530
<b>phi 076</b>	<b>0,592</b>	<b>0,387</b>	<b>0,490</b>
phi 116	0,591	0,584	0,587
phi 090	0,556	0,381	0,468
phi 079	0,468	0,610	0,539
phi 024	0,747	0,735	0,741
Середній rD на вибірку	0,582	0,564	0,573

Примітка: показники визначали без виключених локусів, що виділені жирним шрифтом.

**Таблиця 5.** Гетерозиготність, що спостерігалась (H obs) та очікувана (H exp) у генотипів кукурудзи Південного і Північного Степу

Локус	Північного Степу		Південного Степу		Середнє значення	
	H obs	H exp	H obs	H exp	H obs	H exp
phi 083	0,109	0,543	*	0,480	0,055	0,512
phi 127-2	0,356	0,760	0,429	0,789	0,404	0,775
phi 029	0,220	0,718	0,063	0,571	0,139	0,645
phi 047	0,696	0,569	0,706	0,490	0,701	0,530
phi 070	0,027	0,605	0,242	0,658	0,134	0,632
<b>phi 113</b>	<b>0,116</b>	<b>0,245</b>	<b>0,265</b>	<b>0,111</b>	<b>0,191</b>	<b>0,178</b>
phi 091	0,111	0,531	0,057	0,520	0,084	0,526
phi 051	*	0,492	*	0,526	*	0,509
phi 115	0,304	0,444	0,412	0,497	0,358	0,471
phi 064	0,318	0,771	0,265	0,797	0,292	0,784
phi 027	0,268	0,551	0,229	0,480	0,249	0,516
phi 021	0,217	0,477	0,125	0,539	0,171	0,508
phi 071	0,186	0,580	0,094	0,659	0,140	0,620
phi 093	0,182	0,488	*	0,368	0,091	0,428
phi 022	0,222	0,629	0,207	0,299	0,214	0,464
nc 012	0,122	0,467	0,091	0,451	0,107	0,459
<b>phi 076</b>	<b>0,222</b>	<b>0,437</b>	<b>0,147</b>	<b>0,290</b>	<b>0,184</b>	<b>0,363</b>
phi 116	0,204	0,451	0,088	0,482	0,146	0,467
phi 090	0,077	0,488	0,176	0,251	0,127	0,369
phi 079	0,163	0,511	0,867	0,626	0,515	0,568
phi 024	0,273	0,597	0,469	0,549	0,371	0,573
Середня H на вибірку	0,213	0,562	0,238	0,528	0,226	0,545

**Примітки:** показники визначали без виключених локусів, що виділені жирним шрифтом; позначкою "\*" визначено відсутність алелів у генотипів.

Таблиця 6. Вірогідність випадкового співпадіння генотипів (rM) кукурудзи Південного і Північного Степу

Локус	Значення rM у генотипів		Середній rM на локус
	Північного Степу	Південного Степу	
phi 083	0,448	0,502	0,475
phi 127-2	0,239	0,178	0,209
phi 029	0,349	0,399	0,374
phi 047	0,340	0,301	0,320
phi 070	0,393	0,372	0,383
<b>phi 113</b>	<b>0,716</b>	<b>0,662</b>	<b>0,689</b>
phi 091	0,604	0,531	0,567
phi 051	0,500	0,475	0,487
phi 115	0,525	0,500	0,512
phi 064	0,195	0,213	0,204
phi 027	0,390	0,520	0,455
phi 021	0,479	0,475	0,477
phi 071	0,613	0,431	0,522
phi 093	0,352	0,511	0,432
phi 022	0,476	0,638	0,557
nc 012	0,392	0,547	0,470
<b>phi 076</b>	<b>0,408</b>	<b>0,613</b>	<b>0,510</b>
phi 116	0,409	0,416	0,413
phi 090	0,444	0,619	0,532
phi 079	0,532	0,390	0,461
phi 024	0,253	0,265	0,259
Середній rM на вибірку	0,418	0,436	0,427

Примітка: показники визначали без виключених локусів, що виділені жирним шрифтом.

Таблиця 7. Оцінка достовірності  $\chi^2$  у генотипів кукурудзи Південного і Північного Степу

Локус	Значення $\chi^2$ у генотипів		Середнє значення $\chi^2$ у генотипів
	Північного Степу	Південного Степу	
phi 083	0,347	0,480	0,413
phi 127-2	0,503	0,375	0,439
phi 029	0,354	0,452	0,403
phi 047	0,028	0,095	0,062
phi 070	0,552	0,263	0,408
<b>phi 113</b>	<b>0,068</b>	<b>0,089</b>	<b>0,079</b>
phi 091	0,332	0,412	0,372
phi 051	0,492	0,526	0,509
phi 115	0,044	0,015	0,029
phi 064	0,266	0,355	0,311
phi 027	0,145	0,131	0,138
phi 021	0,142	0,318	0,230
phi 071	0,606	0,220	0,413
phi 093	0,515	0,332	0,424
phi 022	0,340	0,222	0,281
nc 012	0,584	0,448	0,516
<b>phi 076</b>	<b>0,453</b>	<b>0,368</b>	<b>0,410</b>
phi 116	0,547	0,731	0,639
phi 090	0,346	0,022	0,184
phi 079	0,237	0,093	0,165
phi 024	0,176	0,012	0,094
Середній $\chi^2$ на вибірку	0,345	0,290	0,317

**Примітки:**  $\chi^2 = (N_{\text{obs}} - N_{\text{exp}})^2 / N_{\text{exp}}$ ; показники визначали без виключених локусів, що виділені жирним шрифтом.

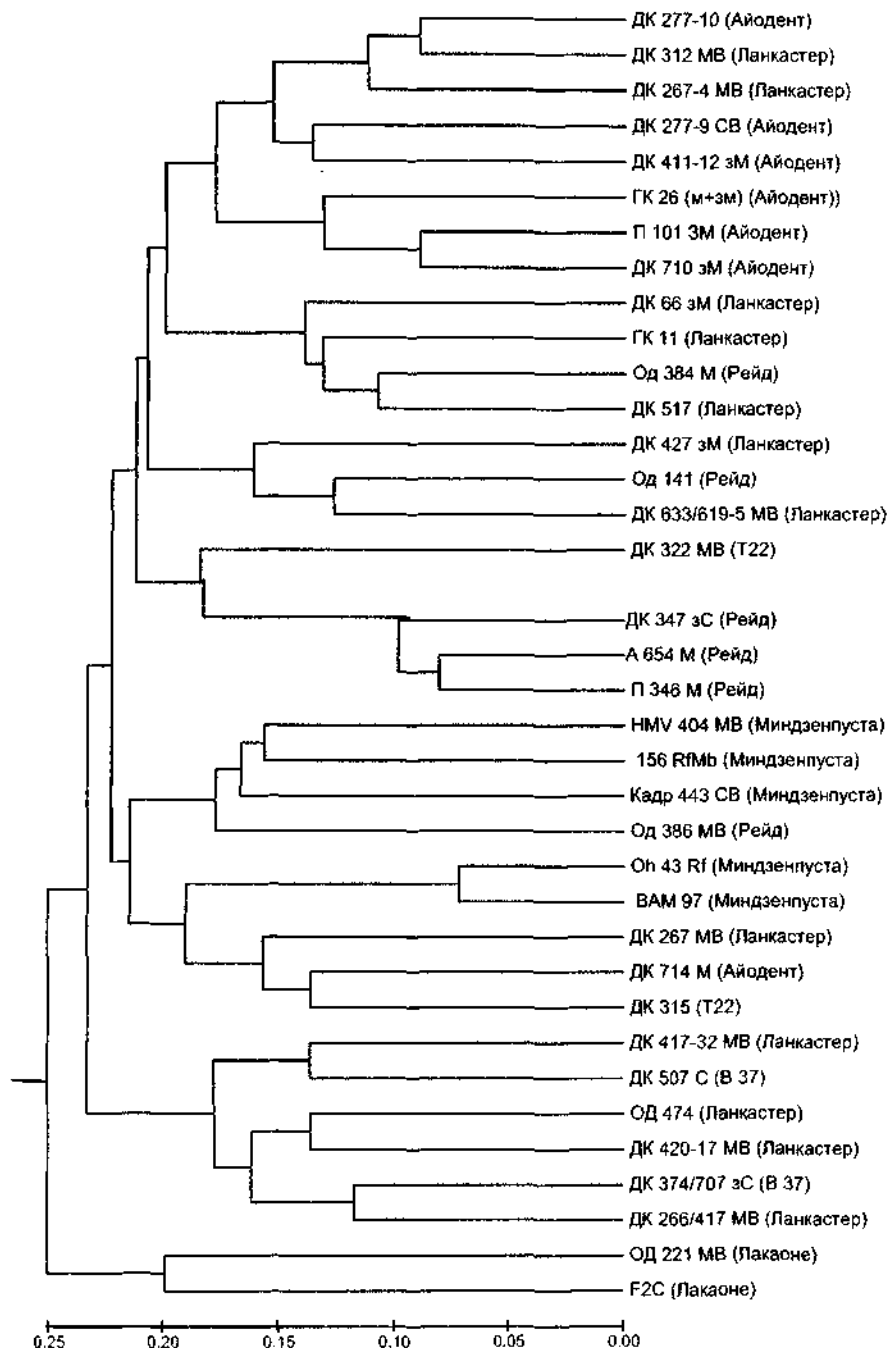


Рис. 1. Дендрограма розподілу генотипів, що належать до гетерозисних груп Ланкастер, Рейд, Айодент, Лакаоне, Т22, Миндзенпуста, за даними ПЛР-аналізу. У дужках наведено назви гетерозисних груп, до яких належать генотипи.

Визначено алельний склад 19 мікросателітних локусів ліній і гібридів, що є унікальним для кожного з досліджених генотипів. Отримані дані переведено у літеро-цифрові формули генотипів. Створено каталог ліній і гібридів кукурудзи селекції СГІ, ІЗГ і світової селекції за даними ДНК-типуювання.

Побудовано дендрограму, що відображає генетичну віддаленість між генотипами різних гетерозисних груп (рис. 1), за даними ПЛР-аналізу 19 SSR-локусів. Знайдено набір алелів, що асоціювали з належністю до конкретних гетерозисних груп, для подальшого скринінгу селекційного матеріалу з метою встановлення належності до гетерозисних груп.

#### Перелік літератури

1. Кожухова Н. Э., Сиволап Ю. М. Идентификация и регистрация генотипов кукурузы при помощи молекулярных маркеров // Генетика. – 2004. – 40, № 1. – С. 59–66.
2. Smith J. S. C. et al. An evaluation of the utility of SSR loci as molecular markers in maize (*Zea mays* L.): Comparisons with data from RFLPs and pedigree // 1997. – BMT /4/2. – 29 p.
3. Enoki H., Chin E. C. L., Shu S. et al. SSR analyses of genetic diversity among maize inbred lines adapted to cold regions of Japan // Theor. Appl. Genet. – 2002. – V. 104. – P. 1270–1277.
4. Сиволап Ю. М., Календарь Р. Н. Генетический полиморфизм ячменя, детектируемый ПЦР с произвольными праймерами // Генетика. – 1995. – Т. 31, № 10. – С. 1358–1364.
5. <http://www.MaizeGDB / SSRsDerived From Genes>
6. Budowle B., Smith J., Moretti T., DiZinno J. DNA typing protocols: Molecular biology and forensic analysis // 1991. – P. 130–131.

Представлено В. А. Кунахом  
Надійшла 10.02.2006

#### МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕНОТИПОВ КУКУРУЗЫ ПО СОСТАВУ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ ЛОКУСОВ

В. Г. Ефименко, Н. Э. Кожухова,  
Ю. М. Сиволап

Южный биотехнологический центр  
в растениеводстве УААН и МОНУ,  
Украина, 65036, г. Одесса,  
Овидиопольская дор. 3,  
natavolk@rambler.ru.

Проведён ПЦР-анализ 80 линий и гибридов кукурузы мировой и украинской селекции. Изучен аллельный состав 21 микросателлитного локуса. Создана база данных ДНК-типирования, которая содержит молекулярно-генетические характеристики генотипов кукурузы на основе состава микросателлитных локусов.

**Ключевые слова:** ПЦР-анализ, генотипы кукурузы.

#### MOLECULAR-GENETIC CHARACTERIZATION MAIZE GENOTYPES BY MICROSATELLITE LOCI COMPOSITION

V. G. Yefimenko, N. E. Kozhukhova,  
Yu. M. Sivolap

South Plant Biotechnology Center UAAN,  
Ukraine, 65036, Odessa,  
Ovidiopol'skaya Dor. 3,  
natavolk@rambler.ru

The PCR-analysis 80 maize lines and hybrids of world and Ukrainian breeding is carried out. Allele structure of 21 microsatellite loci was investigated. The DNA-typing database that contains the molecular-genetic characteristics of maize genotypes on the basis of microsatellite loci structure was created.

**Key words:** PCR-analysis, maize genotypes.



УДК 577.2:631.581.115:542.1

## ОСОБЛИВОСТІ ЗМІН ГЕНОМУ *TRITICUM AESTIVUM* ВНАСЛІДОК ГІБРИДИЗАЦІЇ З *AEGILOPS CYLINDRICA*

О. В. ГАЛАЄВ, Ю. М. СИВОЛАП

Південний біотехнологічний центр у рослинництві УААН та МОН України  
Україна, 65036, м. Одеса, Овідіопольська дор., 3,  
yuri@genome.intes.odessa.ua

За допомогою мікросателітних маркерів досліджували генотипи рослин пшенично-егілопських гібридів *Triticum aestivum* L. ( $2n = 42$ ) x *Aegilops cylindrica* Host ( $2n = 28$ ). Встановили особливості змін геному м'якої пшениці, що відбулись внаслідок гібридизації з *Ae. cylindrica*, а також стабільність виявлених змін у гібридних форм на різних етапах бекросування та самозапилення. З'ясована геномна належність інтрогресивних мікросателітних послідовностей геному С чи D *Ae. cylindrica*, які виявлені в геномах А, В та D м'якої пшениці.

Ключові слова: м'яка пшениця, *Ae. cylindrica*, інтрогресивні форми, SSR-аналіз, інтрогресивні фрагменти

**ВСТУП.** Інтрогресія агрономічно цінних ознак від *Aegilops cylindrica* Host (CCDD;  $2n = 28$ ) в геном м'якої пшениці *Triticum aestivum* L. (AABBDD;  $2n = 42$ ) успішно практикується для удосконалення даної культури [1–3]. Однак, ефективному використанню в селекційних програмах форм пшениці, що здобуті від віддаленої гібридизації, суттєво перешкоджає недостатність знань особливостей мінливості геному в процесі формування ліній пшениці віддаленого гібридного походження. У зв'язку з цим, вивчення особливостей організації рекомбінантних геномів викликає великий інтерес. Для проведення таких досліджень найбільш підходять методи ПЛР-аналізу, серед яких інформативним для детекції, локалізації та визначення розміру фрагментів геному чужинного походження є мікросателітний (MC) або SSR аналіз [4].

Мета нашого дослідження полягала в: а) виявленні за допомогою SSR-аналізу змін геному пшениці, що відбулися внаслідок гібридизації з *Ae. cylindrica*; б) визначенні стабільності виявлених інтрогресії у форм гібридного походження на різних етапах бекросування та самозапилення; в) вивченні здатності передачі мікросателітних послідовностей з геномів С і D *Ae. cylindrica* до геномів А, В і D м'якої пшениці.

## Матеріали і методи

**Вихідний матеріал.** 1) сорт м'якої пшениці Одеська напівкарликова та лінія Лютесценс 23397 (*Triticum aestivum* L., AABBDD,  $2n = 42$ ), які не мають ефективні гени стійкості до фітопатогенів; 2) зразки місцевої популяції виду *Ae. cylindrica* Host (CCDD,  $2n = 28$ ), що надані О. І. Рибалко; 3) гексаплоїдні інтрогресивні лінії м'якої пшениці 5/20-91<sup>1</sup> та 5/55-91<sup>1</sup> з генетичним матеріалом *Ae. cylindrica*, які створені Л. Т. Бабаянцем, наступного походження:

<sup>1</sup>[(Одеська напівкарликова × *Ae. cylindrica*) ×]F<sub>9</sub> ( $2n = 42$ );

4) гексаплоїдні інтрогресивні лінії м'якої пшениці 237/2000<sup>2</sup> та 378/2000<sup>3</sup>, які створені Л. Т. Бабаянцем, наступного походження:

<sup>2</sup>(5/20-91<sup>1</sup> × Одеська напівкарликова)F<sub>5</sub> ( $2n = 42$ ),

<sup>3</sup>(5/55-91<sup>1</sup> × Одеська напівкарликова)F<sub>5</sub> ( $2n = 42$ );

5) зразки виду *Ae. tauschii* (DD,  $2n = 14$ ) (включаючи представників підвиду *ssp. strangulata* та *ssp. eusquarrosa*), що надані О. І. Рибалко; 6) зразки виду *Ae. caudata* (CC,  $2n = 14$ ), що надані О. І. Рибалко.

Інтрогресивні лінії 5/20-91 та 5/55-91 характеризуються комплексною стійкістю до низки грибних захворювань, що перенесені від егілопсу. Розрізняються вказані лінії між собою ступенем стійкості та кількістю генів, які контролюють стійкість до того чи іншого фітопатогена.

**Виділення ДНК.** ДНК виділяли з етиологованих паростків за допомогою СТАВ – буферу [5]. Для виділення ДНК кожної батьківської форми і інтрогресивних ліній брали по 15 індивідуальних рослин.

**Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) та аналіз ампліфікованих фраг-**

**ментів.** SSR аналіз проводили за допомогою 98 пар праймерів до 119 МС локусів з відомою локалізацією на хромосомах м'якої пшениці [6]. Склад реакційної суміші та умови ампліфікації для проведення SSR-ПЛР описані Сиволапом із співавторами [7]. Ампліфікацію ДНК зі спрямованими праймерами проводили на термоциклері "Терцик" ("ДНК-технологія", Росія). Її продукти розділяли методом електрофорезу в 10%-му денатурованому поліакриламідному гелі в 1 × TBE. Молекулярну масу продуктів ампліфікації визначали згідно маркерів pUC/MspI, pGEM, λ/PstI за допомогою комп'ютерної програми "Image Master 1D Elite". Документували отримані електрофореграми відео системою VDS (Pharmacia Biotech).

## Результати та обговорення

**Молекулярно-генетичний поліморфізм батьківських форм.** Мікросателіти (МС) і межуючі з ними ділянки ДНК диких та культурних співродичів пшениці мають високу гомологію з аналогічними послідовностями геному *T. aestivum* [8, 9], тому для дослідження брали МС маркери з відомою локалізацією на хромосомах м'якої пшениці [6]. Для детекції інтрогресії використовували МС маркери, локалізовані не тільки в геномі D, гомеологічному D *Ae. cylindrica*, але і в А та В геномі м'якої пшениці, оскільки відомо, що геном С *Ae. cylindrica* подібно геному С *Ae. caudata* [10] здатен частково пригнічувати систему диплоїдизації пшениці, яка контролюється Ph-генами, а в умовах часткової супресії Ph-генів хромосоми геному D *Ae. cylindrica* можуть кон'югувати з хромосомами геному А та В пшениці, хромосоми геному С *Ae. cylindrica* – з хромосомами пшениці геному А [11].

Для дослідження молекулярно-генетичного поліморфізму батьківських форм (сорту м'якої пшениці Одеська напівкарликова та виду *Ae. cylindrica*) використано 98 пар SSR-праймерів до 119 МС локусів пшениці. Вісім пар SSR-праймерів до 12 МС локусів не дозволили отримати чітких продуктів

ампліфікації. По 23 МС локусах виявили однаковий алейний стан у досліджених батьківських форм (рис. 1). З них чотири локуса локалізовані на хромосомах пшениці геному А, сім – геному В та 11 – геному D (локалізація локусу Хgwm 13 невідома). Для 84 локусів виявили поліморфні продукти амплі-

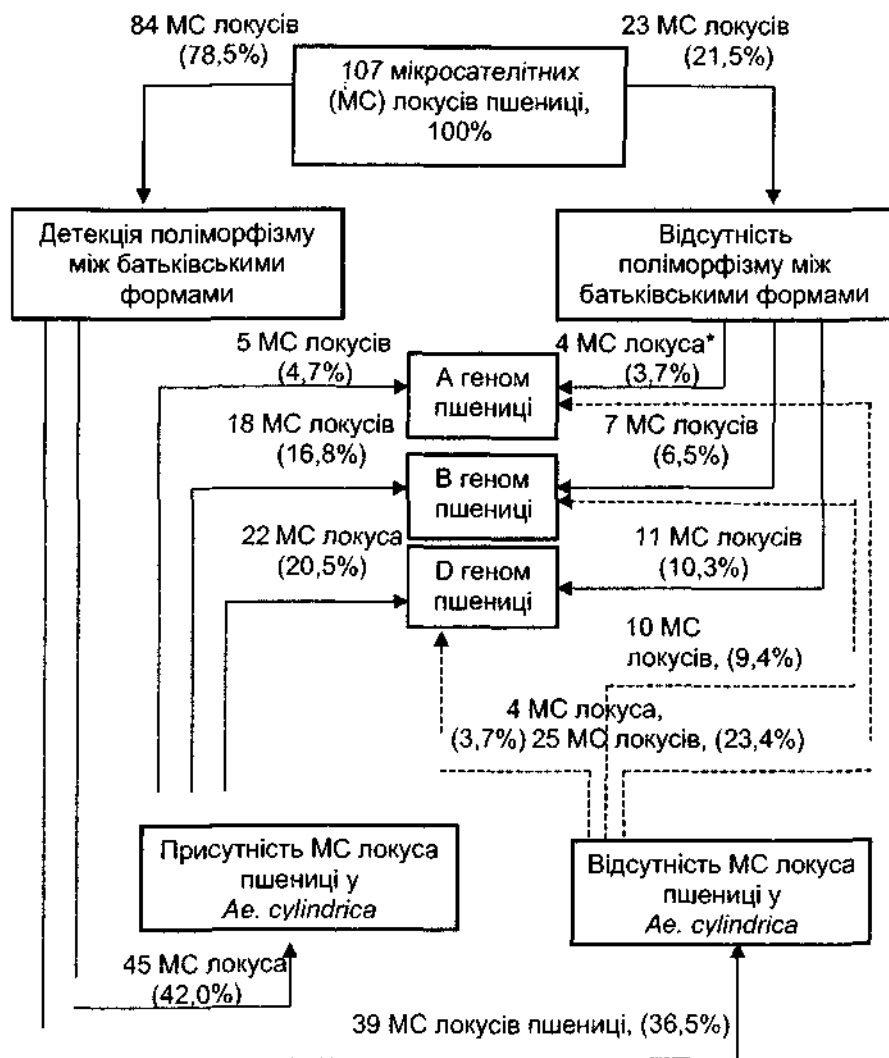


Рисунок 1. Схема результату SSR-аналізу батьківських форм сорту м'якої пшениці Одеська напівкарликова та *Ae. cylindrica*, що отримана за допомогою 107 МС маркерів пшениці. \* – локалізація локусу Хgwm 13 не відома.

кації, при цьому за 39 МС локусами пшениці відсутні фрагменти ампліфікації у *Ae. cylindrica*. У процесі дослідження виявили, що 63,5% МС локусів присутні у геномі *Ae. cylindrica*, при цьому 42% МС локусів дозволили виявити поліморфізм між пшеницею та *Ae. cylindrica*, з них 4,7% картовані у геномі А, 16,8% – у геномі В та 20,5% – у геномі D пшениці.

Найбільший відсоток мономорфності та ампліфікованості алелів МС локусів між батьківськими формами, які локалізовані у геномі D пшениці, свідчить про високу гомологію геному D пшениці та егілопсу і низькому рівні гетерогенності D геному злаків. Деякі МС локуси, які локалізовані на хромосомах А та В пшениці, присутні також у геномі *Ae. cylindrica*. Даний факт свідчить про гомеологію МС локусів геномів А та В пшениці з геномами С та D *Ae. cylindrica*.

За допомогою SSR-аналізу батьківських форм відібрали МС локуси, які використовували для детекції мінливості геному м'якої пшениці внаслідок гібридизації з *Ae. cylindrica*.

Генетичний аналіз інтрогресивних ліній 5/55-91 і 5/20-91 методом SSR-аналізу. Генотипування інтрогресивних ліній 5/20-91 та 5/55-91 BC<sub>2</sub>F<sub>9</sub> дозволило виявити і класифікувати наступні зміни геному пшениці у гібридних рослин: 1) відсутність фрагмента ампліфікації МС локусу, що характерний для сорту Одеська напівкарликова, і наявність фрагмента, що характерний для *Ae. cylindrica* (інтрогресія фрагмента геному егілопса в геном пшениці); 2) поява нових фрагментів ампліфікації МС локусу, що відсутні в досліджених рослинах батьківських форм; 3) повна відсутність фрагментів ампліфікації МС локусу (даний тип зміни

можна пояснити делецією МС локусу пшениці у гібридних рослин, мутацією сайту праймування, внаслідок чого неможлива ампліфікація фрагмента ДНК, чи транслокацією фрагмента генома егілопса, який не утримує МС локус пшениці); 4) відсутність заміщень будь-якої хромосоми м'якої пшениці гомеологічною хромосомою егілопса.

Характеристика МС локусів, які були використані для аналізу інтрогресивних ліній показано в таблиці 1.

Генетичний аналіз інтрогресивних ліній 378/2000 та 237/2000 методом SSR-аналізу. МС маркери, що виявили зміни в інтрогресивних лініях BC<sub>2</sub>F<sub>9</sub>, використані для дослідження бекросних нащадків лінії 5/55-91 (це лінія 378/2000) та лінії 5/20-91 (це лінія 237/2000).

Аналіз рослин BC<sub>2</sub>F<sub>9</sub> (378/2000 та 237/2000) виявив такі особливості: 1) збереження інтрогресивних фрагментів в рослинах; 2) елімінація виявлених інтрогресивних фрагментів геному егілопса; 3) зменшення розміру інтрогресивного фрагмента при повторному бекросуванні; 4) збереження нових фрагментів у рослинах; 5) елімінація виявлених нових фрагментів у гібридних рослинах.

Дослідження бекросних нащадків пшенично-егілопсних гібридів показало присутність генетичного матеріалу егілопса в геномі індивідуальних рослин, які виділені на різних етапах бекросування. При цьому спостерігали зменшення кількості інтрогресивних фрагментів у рослинах більш глибоких бекросів, що свідчить про поступову елімінацію чужинного генетичного матеріалу *Ae. Cylindrica*, перенесеного в геном м'якої пшениці у пшенично-егілопсних гібридів при кожному наступному зворотному схрещуванню з м'якою пшеницею.

У зв'язку з тим, що бекросні рослини BC<sub>1</sub> та BC<sub>2</sub> в наступних самозапиленнях супроводжували добром на стійкість до фітозахворювань, слід очікувати зміни спектра інтрогресивних фрагментів геному егілопса в пшеничному геномі: стабільність одних інтро-

гресивних фрагментів, що зв'язані з переданою комплексною стійкістю, та елімінація інших – незв'язаних з переданою стійкістю. Так, у рослинах ліній 378/2000 та 237/2000 відмічена за допомогою дев'яти МС локусів стабільна інтрогресія. Чотири інтрогресії при-

**Таблиця 1.** Мікросателітні локуси пшениці, які використані для аналізу інтрогресивних ліній пшениці 5/20-91 (BC<sub>1</sub>F<sub>3</sub>) та 5/55-91 (BC<sub>1</sub>F<sub>3</sub>)

Гомеологічна група	А геном	В геном	Д геном
1	Xgwm 357, <b>Taglut***</b>	<b>Xgwm 18***</b> , Xgwm 33***, Xwmc 44, Xgwm 124, Xgwm 131***, Xgwm 140, Xgwm 153, <b>Xgwm 259***</b> , Xgwm 264, Xgwm 268, Xwmc 367, Xgwm 498, Xbarc 80, Xcfa 2147, Xcfa 2292, Taggap	Xgwm 33***, Xgwm 106, Xgwm 232, Xgwm 337***, Xgwm 458, Xgwm 642
2	Xgwm 95, Xgwm 296, Xgwm 445, Xgwm 497, Xgwm 558	Xgwm 129, Xgwm 319, Xgwm 388**, Xgwm 410, Xgwm 526, <b>Xgwm 619**</b>	Xgwm 30, Xgwm 157, Xgwm 210, <b>Xgwm 261*</b> , Xgwm 296, Xgwm 484, Xgwm 608
3	Xgwm 2, Xgwm 5, Xgwm 30***, Xgwm 155, Xgwm 155, Xgwm 156, Xgwm 674	Xgwm 131*, Xgwm 264, Xgwm 284, <b>Xgwm 389***</b> , Xgwm 493, Xgwm 533	Xgwm 2, Xgwm 3, Xgwm 52, Xgwm 161, <b>Xgwm 314**</b> , Xgwm 341, <b>Xgwm 383***</b> , Xgwm 456, Xgwm 497, Xgwm 645, Xgwm 664
4	Xgwm 160, Xgwm 165, Xgwm 695	Xgwm 165, Xgwm 513, Xgwm 513	Xgwm 165, Xgwm 194, Xgwm 608
5	Xgwm 126, Xgwm 129, Xgwm 156, Xgwm 186, Xgwm 304, Xbarc 40, Xbarc 56, Xbarc 96, Xwmc 110, Xbarc 117, Xbarc 165, Xbarc 186, Xbarc 230, Xbarc 319, Xbarc 330	Xgwm 126, Xgwm 408*, Xgwm 639	<b>Xgwm 174*</b> , <b>Xgwm 182***</b> , Xgwm 190, Xgwm 192, Xgwm 212, Xgwm 292, Xgwm 583, Xgwm 639
6	Xgwm 169*, <u>Xgwm 427**</u> , <u>Xgwm 617**</u>	Xgwm 680	<b>Xgwm 325*</b>
7	Xgwm 631	Xgwm 46, Xgwm 577**	Xgwm 437***

**Примітка:** Жирний шрифт – МС локус, за яким детековано інтрогресивний алель геному егілопсу; курсив – МС локус, за яким детековано новий алель, що не характерний батьківським формам; підкреслено – делеція МС локусу пшениці; \* – МС локус, за яким виявлено інтрогресивний чи новий алель, специфічний для лінії 5/20-91; \*\* – МС локус, за яким виявлено інтрогресивний чи новий алель, специфічний для лінії 5/55-91; \*\*\* – МС локус, за яким виявлено інтрогресивний чи новий алель, присутній в обох лініях.

сутні в обох лініях (Xgwm 18 – 1BS, Xgwm 33 – 1BS, Xgwm 389 – 3BS і Xgwm 182 – 5DL), дві – тільки в лінії 237/2000 (Xgwm 174 – 5DL, Xgwm 261 – 2DS) і три – в лінії 378/2000 (Taglut – 1AS, Xgwm 259 – 1BL, Xgwm 314 – 3DL).

Використання мікросателітних маркерів пшениці дозволило охарактеризувати мінливість, що викликана інтрогресією чужинного генетичного матеріалу *Ae. cylindrica* у геном *T. aestivum*. Показано стабільність виявлених змін у гібридних форм на різних етапах беккросування, що дозволить використовувати вивчені лінії в генетичному аналізі.

**Здатність передачі MC послідовностей з геному С та D *Ae. cylindrica* в геноми А, В і D м'якої пшениці.** Інтрогресивні лінії пшеничного типу, що здобуті від схрещування *T. aestivum* з *Ae. cylindrica* є зручним модельним об'єктом у генетичних та молекулярно-генетичних дослідженнях, а також для оцінки передачі окремих послідовностей ДНК з генофонду диких видів у геном м'якої пшениці.

Вивчення питання геномної належності інтрогресивних MC послідовностей субгеному С чи D *Ae. cylindrica*, які виявлені в субгеномах А, В та D м'якої пшениці, проводили шляхом порівняльного MC аналізу *T. aestivum* (сорт Одеська напівкарликова) (геномний склад AABBDD), *Ae. cylindrica* (CCDD) та його вірогідні предки *Ae. caudata* (CC) і *Ae. tauschii* (DD) за допомогою семи пар праймерів, що детектували інтрогресивні фрагменти у лінії 378/2000 та 237/2000 (табл. 2).

З літературних джерел відомо, що вид *Ae. tauschii* складається з великої

кількості різновидів [12], які характеризуються високою генетичною гетерогенністю [13, 14]. У нашому дослідженні використовували чотири різновиди даного диплоїдного виду, включаючи підвид *ssp. eusquarrosa* та *ssp. strangulata*, який, за даними деяких авторів [15, 16], є донором геному D *T. aestivum*.

Показано присутність MC маркерів, які виявили інтрогресивні фрагменти в В (Xgwm 259-1BS, Xgwm 389-3BS) і D (Xgwm 174-5DL, Xgwm 182-5DL, Xgwm 261-2DS, Xgwm 325-6DS) геномі інтрогресивних ліній в геномі досліджених чотирьох зразків *Ae. tauschii* різного географічного походження, що свідчить про перенесення генетичного матеріалу з геному D *Ae. cylindrica* в геноми В і D пшениці. При використанні пари праймерів до MC локусу Xgwm 18-1BS виявлено однаковий алельний стан (196 п.н.) у *Ae. cylindrica*, *Ae. caudata* та інтрогресивних ліній, в той час як у сорту Одеська напівкарликова та зразків *Ae. tauschii* детектований алель з молекулярною вагою 186 п.н. Даний факт свідчить про передачу генетичного матеріалу з геному С *Ae. cylindrica* до геному В пшениці. MC маркер Taglut, що детектував інтрогресивний фрагмент в геномі А пшенично-егілопних гібридів присутній як в досліджених зразках *Ae. caudata* (CC), так і в *Ae. tauschii* (DD).

Таким чином, результати наших досліджень підтвердили перенесення чужинного генетичного матеріалу у геном м'якої пшениці не тільки з геному D *Ae. cylindrica*, гомологічному геному D *T. aestivum*, а також і з геному С.

**Особливості змін геному *Triticum aestivum* внаслідок гібридизації з ...**

**Таблиця 2.** Алельний стан досліджених рослин за мікросателітними локусами, що виявили нтрогресивні фрагменти у лінії 237/2000 та 378/2000 – нащадків лінії 5/20-91 і 5/55-91

МС локус	Алель, п.н.	<i>Triticum aestivum</i> (сорт Одеська наліварликова)	<i>Aegilops cylindrica</i>	<i>Aegilops caudata</i>	<i>Aegilops tauschii</i>	лінія 5/55-91	лінія 5/20-91
Xgwm 174 (5DL)	221	-	-	-	+	-	-
	210	+	-	-	+	+	-
	187	-	+	-	+	-	+
Xgwm 182 (5DL)	195	-	-	-	+	-	-
	167	-	+	-	-	+	+
	163	+	-	-	+	-	-
Xgwm 259 (1BL)	105	+	-	-	+	-	-
	99	-	+	-	+	+	+
Xgwm 261 (2DS)	200	-	-	-	+	-	-
	192	+	-	-	+	-	-
	174	-	+	-	-	-	+
	165	+	+	-	+	+	+
Xgwm 325 (6DS)	147	+	-	-	+	+	+
	138	-	-	-	+	-	-
	134	-	-	-	+	-	-
	116	-	+	-	-	-	+
Xgwm 18 (1BS)	196	-	+	+	-	+	+
	186	+	+	-	+	-	-
Xgwm 389 (3BS)	140	+	+	+	+	-	-
	128	-	-	+	+	-	-
	114	-	+	-	+	+	+
Taglut (1AS)	152	+	-	-	+	-	-
	129	-	-	-	+	-	-
	126	-	+	+	+	+	+
	123	+	-	-	+	-	-

“+” – присутність SSR-алеля, “-” – відсутність SSR-алеля

Перелік літератури

1. Бабаянц Л. Т., Барановская В. Л., Дубинина Л. А. Устойчивость озимой пшеницы к твердой головне в Украине // Збірник наук. праць СГП. – 2004. – вип. 6 (46). – С. 254–260.
2. Бабаянц Л. Т., Васильев А. А., Новицкая Н. А. Генетическая основа устойчивости межвидовых гибридов пшеницы к *Ruscinia recondita* Rob. ex Desm. f. sp. *Triticici* // Цитология и генетика. – 1998. – 32, № 6. – С. 20–26.
3. Бабаянц Л. Т., Рыбалка А. И., Бабаянц О. В., Бушулян М. А., Васильев А. А., Дубинина Л. А., Мирось С. Л. Новый исходный материал для селекции пшеницы на устойчивость к возбудителям инфекционных заболеваний // Пшеница и тритикале. Материалы научно-практической конференции “Зеленая революция П. П. Лукьяненко”, Краснодар, 28–30 мая 2001 г. – Краснодар: Советская Кубань. – 2001. – С. 329–336.
4. Сиволап Ю. М., Чеботар С. В. Використання молекулярних маркерів у генетико-селекційних дослідженнях пшениці // Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. – 2003. – № 1. – С. 121–128.
5. Использование ПЦП – анализа в генетико-селекционных исследованиях // Научно-методическое руководство / Под редакцией Сиволапа Ю. М. К.: Аграрная наука, 1998. – 156 с.
6. Rüder M. S., Korzun V., Plachke J., Tixier M.-H., Leroy P., Ganai M. W. A microsatellite map of wheat // Genetics. – 1998. – 149. – P. 2007–2023.
7. Сиволап Ю. М., Чеботарь С. В., Топчиева Е. А., Корзун В. Н., Тоцкий В. Н. Исследование молекулярно-генетического полиморфизма сортов *Triticum aestivum* L. с помощью RAPD- и SSRP-анализа // Генетика. – 1999. – 35, № 12. – С. 1665–1673.
8. Бильданова Л. Л., Салина Е. А., Першина Л. А. Изучение особенностей рекомбинации ядерного генома у беккроссных потомков ячменно-пшеничных гибридов *Hordeum vulgare* L. (2n = 14) × *Triticum aestivum* L. (2n = 42) с использованием SSR-анализа // Генетика. – 2003. – 39, № 12. – С. 1673–1679.
9. Sourdille P., Tavaud M., Charmet G., Bernard M. Transferability of wheat microsatellites to diploid *Triticea* species carrying the A, B, and D genomes // Theor. Appl. Genet. – 2001. – 103. – P. 346–352.
10. Сечняк А. Л., Симоненко В. К. Цитогенетика гибридов твердой пшеницы (*Triticum durum* Desf.) с *Aegilops caudata* L. // Цитология и генетика. – 1999. – 33, № 4. – С. 49–55.
11. Авсенин В. И., Рыбалка А. И., Файт В. И. Гибриды *Aegilops cylindrica* Host. с *Triticum durum* Desf. и *T. aestivum* L. // Цитология и генетика. – 2003. – № 1. – С. 11–17.
12. Knaggs P., Ambrose M. J., Reader S. M., Miller T. E. Morphological characterization and evaluation of the subdivision of *Aegilops tauschii* Coss. // Wheat Inf. Ser. – 2000. – № 91. – P. 15–19.
13. Песцова Е. Г. Микро- и макросателлиты генома мягкой пшеницы и ее сородичей. Автореф. дис. канд. биол. наук. – Н. – 2000. – 16 с.
14. Dvorak J., Luo M. C., Yang Z. L., Zhang H. B. The structure of the *Aegilops tauschii* gene pool and the evolution of hexaploid wheat // Theor. Appl. Genet. – 1998. – 97. – P. 657–670.
15. Konarev V. G., Gavriljuk I. P., Gubareva N. K., Peneva T. I. Seed protein in genome analysis, cultivar identification, and documentation of cereal genetic resources: a review // Cereal Chem. – 1979. – 56. – P. 272–278.
16. Jaaska V. Electrophoretic survey of seedling esterases in wheat in relation to their phylogeny // Theor. Appl. Genet. – 1980. – 56. – P. 273–284.

Представлено В. А. Кунахом  
Надійшла 10.02.2006

ОСОБЕННОСТИ ИЗМЕНЕНИЯ ГЕНОМА  
*TRITICUM AESTIVUM* ВСЛЕДСТВИЕ  
ГИБРИДИЗАЦИИ С *AEGILOPS CYLINDRICA*

А. В. Галаев, Ю. М. Сиволап

Южный биотехнологический центр  
в растениеводстве УААН и МОН Украины  
Украина, 65036, г. Одесса,  
Овидиопольская дор. 3,  
yuri@genome.intes.odessa.ua



С помощью микросателлитных маркеров исследовали генотипы растений пшенично-эгилопсных гибридов *Triticum aestivum* L. ( $2n = 42$ ) x *Aegilops cylindrica* Host ( $2n = 28$ ). Установили особенности изменений генома мягкой пшеницы, произошедшие вследствие гибридизации с *Ae. cylindrica*, а также стабильность выявленных изменений в гибридных формах на различных этапах беккроссирования и самоопыления. Выяснена геномная принадлежность интрогрессивных микросателлитных последовательностей генома С или D *Ae. cylindrica*, которые обнаружены в геномах А, В и D мягкой пшеницы.

**Ключевые слова:** мягкая пшеница, *Ae. cylindrica*, интрогрессивные формы, SSR-анализ, интрогрессивные фрагменты.

PECULIARITY OF CHANGE GENOME  
*TRITICUM AESTIVUM* AS RESULT HYBRIDI-  
SATION WITH *AEGILOPS CYLINDRICA*

A. V. Galaev, Yu. M. Sivolap

South Plant Biotechnology Center UAAS  
and MES Ukraine,  
Ukraine, 65036, Odessa, Ovidiopolskaya Dor. 3,  
yuri@genome.intes.odessa.ua

Wheat-aegilops hybrid plants *Triticum aestivum* L. ( $2n = 42$ ) x *Aegilops cylindrica* Host ( $2n = 28$ ) were investigated with using microsatellites markers. Peculiarity of change bread wheat as result hybridization with *Ae. cylindrica* and stability of change detected in hybrid forms BC<sub>1</sub>F<sub>2</sub> and BC<sub>2</sub>F<sub>2</sub> is established. Accessory to genome of sequence microsatellite introgression genome C and D *Ae. cylindrica* detected in genome A, B and D bred wheat is clarified.

**Key words:** bred wheat, *Ae. cylindrica*, introgression forms, SSR-analysis, introgression fragments.

УДК 575.22 + 576.5:581.143.6

## ОСОБЛИВОСТІ ЗМІН ГЕНОМУ *CREPIS CAPILLARIS* В КУЛЬТУРІ *IN VITRO* НА ЦИТОЛОГІЧНОМУ ТА МОЛЕКУЛЯРНОМУ РІВНІ

Ю. Ф. КНУТОВА, І. О. АНДРЕЄВ, К. В. СПІРІДОНОВА, Н. Ю. МІРЮТА,  
В. І. АДОНІН, В. А. КУНАХ

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,  
Україна, 03143, м. Київ, вул. Акад. Заболотного, 150,  
kunakh@imbg.org.ua

*Встановлено, що в процесі дедиференціації клітин при індукції калюсоутворення та культивуванні in vitro в геномі C. capillaris відбуваються зміни морфології хромосом, розташування в хромосомах гетерохроматинових блоків, а також перебудови фракції повторюваних послідовностей ДНК. Виявлено, що як диференціація клітин в онтогенезі, так і культивування тканин in vitro індують зміни рівня модифікацій нуклеотидів, зокрема метилювання. Ключові слова: Crepis capillaris, геномна мінливість, культура тканин рослин, хромосоми, ДНК, гетерохроматин*

**Вступ.** Культура тканин вищих рослин – це унікальна модель для дослідження впливу різних чинників на стан геному та його зміни. Культура тканин як нова експериментально створена біологічна система цікава сама по собі і є об'єктом досліджень вузького кола спеціалістів. Як модель, клітини, що вирощують *in vitro*, цікавлять багатьох науковців у сфері фізіології та біохімії рослин, але лише за умови чіткого знання її властивостей. І, нарешті, культура тканин, як інструмент, використовується для вирішення широкого кола прикладних та фундаментальних проблем у багатьох галузях біології.

Культивування тканин і клітин *in vitro* в умовах ізолюваного росту, вплив компонентів культурального середовища та продуктів власного метаболізму клітин, – діють як стресові чинники і можуть бути причиною генетичної нестабільності. У культурі тканин спостерігаються різноманітні види геномної мінливості, такі як зміни кількості та структури хромосом, точкові мутації, соматичний кросингвер, ампліфікація або редукція окремих послідовностей, активація мобільних елементів, зміни характеру метилювання, епігенетичні зміни [1, 2]. Відомо, що механізм виникнення хромосомних перебудов тісно пов'язаний з влас-

тивостями гетерохроматину – особливостями компактизації та локалізації в хромосомах, високою лабільністю реплікації, поліморфізмом, організацією ДНК з коротких високоповторюваних послідовностей, які не транскрибуються. Ці чинники можуть призводити до помилок при репарації розривів та аберацій хромосом [2,3].

Рослини роду *Crepis* завдяки наявності невеликої кількості хромосом значного розміру, які легко ідентифікуються як у мітозі, так і у мейозі, являють собою зручну модель для вивчення організації, мінливості та еволюції геному на хромосомному рівні [4, 5].

У даній роботі наведено результати вивчення геномної нестабільності на рівні морфології хромосом та послідовностей ДНК в культурі тканин скереди волосистої *Crepis capillaris*. Для вивчення молекулярних основ цієї нестабільності разом з цитологічними дослідженнями було проведено аналіз геномної ДНК калюсної тканини та тканин інтактної рослини методом рестрикційного аналізу.

## **Матеріали і методи**

**Рослинний матеріал.** Об'єктами дослідження були культура тканин та інтактні рослини скереди волосистої *Crepis capillaris* (L.) Wallr. (*Compositae*). Культуру тканин *C. capillaris*, отриману із корінців стерильних проростків, культивували на модифікованому середовищі Еріксона [6].

**Виділення та аналіз ДНК.** ДНК із калюсних тканин та молодих листків інтактних рослин виділяли за методом Rogers і Bendich [7] з незначними модифікаціями. Реакцію гідролізу ДНК ферментами рестрикції проводили в об'ємі 30 мкл відповідно до рекомен-

дацій виробника (Fermetas, Lithuania). Продукти гідролізу розділяли за допомогою горизонтального гель-електрофорезу в 0,8% агарозному гелі, в 1×TAE буфері при градієнті напруги 2В/см протягом 12 год. В якості маркера молекулярних мас використовували ДНК фага  $\lambda$ , гідролізовану ендонуклеазою рестрикції Pst I. ДНК візуалізували за допомогою бромистого етидію і фотографували в ультрафіолетовому світлі на плівку Мікрат-300.

**Приготування цитологічних препаратів.** Для цитологічних досліджень калюсну тканину скереди 7-го, 18-го та 24-го пасажів (тривалість пасажу 20–24 доби) на сьомий день пасажу і кінчики корінців проростків *C. capillaris* довжиною приблизно 5 мм на третій день після проростання обробляли 0,1% розчином колхіцину протягом 2 год. і фіксували у суміші етанол : льодяна оцтова кислота (3 : 1) протягом 3–4 год. Відмивали і зберігали у 70% етанолі. Диференціальне забарвлення хромосом виконували за модифікованим С-методом, розробленим для хромосом злаків [8]. У кожній точці фіксації було досліджено по 20–50 кожної з хромосом типу А, С та D (морфологію та типи хромосом представлено на рис. 1).

**Статистична обробка результатів цитологічних досліджень.** Цифрові зображення метафазних пластинок лише з диплоїдним набором хромосом аналізували за методом [8], оцінювали наступні параметри: а) загальна довжина хромосом; б) довжини короткого (*q*) та довгого (*p*) плечей; в) розподіл гетерохроматинових районів вздовж хромосом.

Для аналізу змін абсолютних розмірів хромосом (*L*, мкм) однотипні хромосоми різних об'єктів розбивали на

класи за лінійними розмірами із кроком 1 мкм (від 1 до > 11 мкм). Після цього, оскільки отримані розподіли мали один максимум, проводили їх порівняння із застосуванням крите-

рію медіани [9] (порівняння з розподілом  $\chi^2$ , див. приклад розрахунків у табл. 1). Критерій медіани є окремим випадком описаної нижче процедури для біноміального розподілу.

**Таблиця 1.** Застосування методу критерію медіани для порівняння розподілів хромосом за довжиною для хромосоми D калюсних тканин *S. capillaris* у 18-му (D18) і 24-му (D24) пасажах

№ класу			D18	D24	D18 + D24				
<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>d</i>	<i>e</i>	<i>f</i>	<i>g</i>	<i>h</i>	<i>i</i>	<i>j</i>
1.	кількість	вище за медіану	37	4	41	28,19	12,81	2,75	6,06
2.	хромосом	нижче за медіану	7	16	23	15,81	7,19	4,91	10,80
3.		$\Sigma$	44	20	64	44	20	7,66	16,86
4.									24,52

**Примітка:** в рядки 1 та 2 вносяться кількості хромосом, що знаходяться вище і нижче за клас, який відповідає медіані їх спільного розподілу; *f* – сума відповідних значень стовпчиків *d* і *e*; *g* – очікуване

значення для колонки *d* ( $g_i = \sum_{i=1,n} d_i / \sum_{i=1,n} f_i \cdot f_i$ ); *h* – очікуване значення для колонки *e* ( $h_i = \sum_{i=1,n} e_i / \sum_{i=1,n} f_i \cdot f_i$ );

*i* – ((значення, що спостерігається – очікуване значення)<sup>2</sup>/ очікуване значення) для колонки *d*; *j* – те саме для колонки *e*. Табличне значення верхньої 5% границі  $\chi^2_{0,05} = 3,84$  для порівняння двох розподілів, таким чином значення статистичного критерію (остання комірка в рядку 4) є значимим, тобто, гіпотезу однаковості розподілів хромосом за розміром по класах для D-хромосоми у 18-му і 24-му пасажі відхиляємо.

З метою зменшення ймовірності впливу варіацій лінійних розмірів, пов'язаних з методикою фіксації та приготування препаратів хромосом, проводили також вивчення змін відносних розмірів хромосом та їх окремих плечей. У першому випадку за одиницю приймали суму довжин усіх хромосом і аналізували розподіли розмірів хромосом (*l*, в.о.), виражених у відносних одиницях по відношенню до цього значення. При вивченні змін довжин коротких (*q*, в.о.) та довгих (*p*, в.о.) плечей хромосом порівнювали їх значення для різних об'єктів, виражені у відносних одиницях, як частки цілої хромосоми, довжина якої приймалась за 1. Порівняння здійснювали так само, як і у випадку абсолютних розмірів.

Для визначення розташування центрів інтенсивного забарвлення хромо-

сом проводили денситометрію цифрового зображення відповідним чином зорієнтованої хромосоми (коротке плече – довге плече) і визначали відстань центрів інтенсивного забарвлення від теломери короткого плеча. Після цього переводили отримані абсолютні значення у відносні одиниці шляхом поділу на довжину хромосоми і відносили до відповідних класів (довжину хромосоми від 0,00 до 1,00 у в.о. розбивали на класи з кроком 0,02). Далі формували розподіл кількості хромосом за розташуванням центрів інтенсивного забарвлення по класах для кожного типу хромосом. Оскільки розподіл розташування центрів інтенсивного забарвлення вздовж хромосоми для досліджуваних вибірок був поліноміальним, статистичну обробку отриманих результатів проводили із засто-

совуванням методу порівняння поліноміальних ймовірностей у двох експериментах, який полягає у перевірці нульової гіпотези про рівну ймовірність потрапляння гетерохроматинової ділянки

у досліджуваній вибірці в той самий клас, в якому вона знаходиться в хромосомі репера (або в попередньому пасажі) (порівняння з розподілом  $\chi^2$ ) [9]. Приклад розрахунків наведено в табл. 2.

**Таблиця 2.** Застосовування методу порівняння поліноміальних ймовірностей у двох експериментах для порівняння розподілів хромосом за розташуванням центрів гетерохроматинових ділянок хромосоми А культури тканин *C. capillaris* у 7-му і 18-му пасажах

№ класу	Середнє значення класу	Інтервал значень класу	A(7)	A(18)	A(7) + A(18)				
<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>d</i>	<i>e</i>	<i>f</i>	<i>g</i>	<i>h</i>	<i>i</i>	<i>j</i>
1.	0,05	0,00–0,099	28	3	31	19,18	11,82	4,06	6,58
2.	0,15	0,10–0,199	46	36	82	50,74	31,26	0,44	0,72
3.	0,25	0,20–0,299	42	42	84	51,98	32,02	1,92	3,11
4.	0,35	0,30–0,399	59	33	92	56,93	35,07	0,08	0,12
5.	0,45	0,40–0,499	52	33	85	52,60	32,40	0,01	0,01
6.	0,55	0,50–0,519	58	39	97	60,02	36,98	0,07	0,11
7.	0,65	0,60–0,699	55	33	88	54,45	33,55	0,01	0,01
8.	0,75	0,70–0,799	50	39	89	55,07	33,93	0,47	0,76
9.	0,85	0,80–0,819	47	19	66	40,84	25,16	0,93	1,51
10.	0,95	0,90–1,00	24	7	31	19,18	11,82	1,21	1,97
11.		Σ	461	284	745	460,99	284,01	9,2	14,9
12.									24,1

**Примітка:** *d* – значення, що спостерігається для 1-го розподілу; *e* – значення для 2-го розподілу; *f* – сумар-

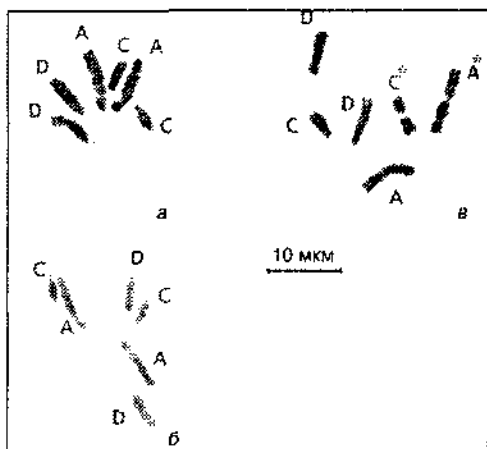
не значення *d* і *e*; *g* – очікуване значення для колонки  $d \left( g_i = \sum_{i=1,n} d_i / \sum_{i=1,n} f_i f_i \right)$ ; *h* – очікуване значення для

колонки  $e \left( h_i = \sum_{i=1,n} e_i / \sum_{i=1,n} f_i f_i \right)$ ; *i* – значення критеріальної оцінки ((значення, що спостерігається – очікуване значення)<sup>2</sup>/ очікуване значення) для колонки *d*; *j* – те саме для колонки *e*. Табличне значення верхньої 10% границі для порівняння двох розподілів, що містять по десять класів –  $\chi_{0,10}^2 = 14,68$  (5% границі –  $\chi_{0,05}^2 = 16,92$ ), таким чином значення статистичного критерію (остання комірка в рядку 12) є значимим, тобто, гіпотезу однаковості розподілів хромосом за локалізацією гетерохроматинових ділянок по класах для А-хромосоми у 7-му і 18-му пасажах відхиляємо.

## Результати та обговорення

*Морфометричні параметри хромосом та лабільність локалізації гетерохроматинових блоків у Crepis capillaris.* Хромосомний набір скереда волосистої складається з трьох пар хромосом,

які позначають як А (найдовша), С (найкоротша) та D (хромосома проміжної довжини між А і С). Зразки досліджених метафазних пластинок з корінців інтактної рослини та культури тканин 7-го та 24-го пасажів наведено на рис. 1.



**Рисунок 1.** Диплоїдні метафазні пластинки інтактної рослини *Crepis capillaris* (а), 7-го (б) та 24-го пасажу (в) культури тканин *C. capillaris*. Метафазні пластинки подано в одному масштабі, збільшення 100 x 10. А, С, D – типи хромосом, А\*, С\* – перебудовані хромосоми.

У дослідженому калюсі з'явилися нові морфологічні варіанти хромосом, нехарактерні для інтактної рослини, а також надлишкова сьома хромосома. Особливо часто серед перебудованих хромосом зустрічали метацентричні хромосоми за наявності в метафазі по одній неперебудованій хромосомі А і С, та обох незмінених хромосом D, що дало підставу ідентифікувати їх як перебудовані хромосоми А і С (рис. 1, в).

Вивчення морфології хромосом виявило також значну гетерогенність за розміром окремих типів хромосом калюсної культури та корінців інтактної рослини (репера). Результати статистичного аналізу даних оцінки розмірів окремих хромосом та їх плечей наведено в табл. 3.

**Таблиця 3.** Довжина хромосом *C. capillaris* та їх плечей у кореневій меристемі проростків, отриманих з насіння (репер), та в культурі тканин різних пасажів

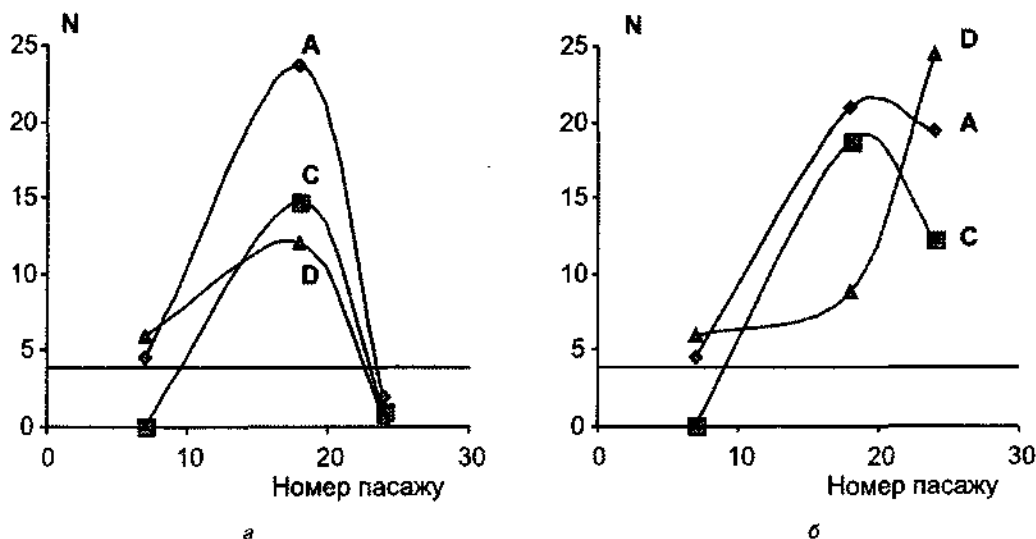
Тип хромосоми	Об'єкт (n – кількість досліджених хромосом)	Загальна довжина (L, мкм)	Загальна довжина (l, в.о.*)	Відносна довжина короткого плеча (q, в.о.**)	Відносна довжина довгого плеча (p, в.о.***)
A	репер (n = 44)	8,0 ± 2,2	0,43 ± 0,12	0,25 ± 0,04	0,75 ± 0,12
	7-й пасаж (n = 25)	<b>7,9 ± 1,3</b>	0,43 ± 0,07	0,25 ± 0,01	0,75 ± 0,05
	18-й пасаж (n = 32)	<b>6,2 ± 0,9</b>	0,42 ± 0,06	–	–
	24-й пасаж (n = 21)	7,7 ± 1,5	0,41 ± 0,08	0,24 ± 0,01	0,76 ± 0,05
C	репер (n = 43)	4,4 ± 1,1	0,23 ± 0,06	0,25 ± 0,05	0,75 ± 0,09
	7-й пасаж (n = 28)	<b>4,5 ± 0,7</b>	0,24 ± 0,04	0,24 ± 0,02	0,76 ± 0,06
	18-й пасаж (n = 37)	<b>3,6 ± 0,8</b>	0,24 ± 0,05	–	–
	24-й пасаж (n = 21)	4,4 ± 0,6	0,24 ± 0,03	<b>0,32 ± 0,02</b>	<b>0,68 ± 0,05</b>
D	репер (n = 25)	6,1 ± 1,0	0,33 ± 0,06	0,23 ± 0,08	0,77 ± 0,12
	7-й пасаж (n = 32)	5,8 ± 1,0	0,33 ± 0,05	<b>0,16 ± 0,03</b>	<b>0,84 ± 0,12</b>
	18-й пасаж (n = 44)	<b>5,0 ± 1,0</b>	0,34 ± 0,07	–	–
	24-й пасаж (n = 20)	6,6 ± 1,0	0,35 ± 0,05	<b>0,29 ± 0,03</b>	<b>0,71 ± 0,08</b>

**Примітка:** \* – довжина відносно до сумарної довжини усіх хромосом; \*\* – відносно довжини даної хромосоми. У 18-му пасажі оцінки співвідношення плечей хромосом не проводилось. Жирним шрифтом виділено середні значення розмірів хромосом у тих точках, де за критерієм медіани виявлено достовірні відмінності середніх значень від репера.

Оскільки досить велика квадратична похибка не дозволяла впевнено судити про наявність змін довжини хромосом, було проведено порівняння розподілів хромосом за довжинами відносно репера за допомогою критерію медіани. Порівняльний аналіз довжини хромосом культури тканин різних пасажів та репера (кінчиків корінців проростків) за допомогою описаного критерію показав, що культивування клітин *C. capillaris* в умовах *in vitro* супроводжується зміною розподілів хромосом за лінійними розмірами. Зокрема, в 7-му пасажі достовірно зменшились за абсолютними довжинами хромосоми А та D, у 18-му пасажі зменшеними порівняно з репером виявилися всі хромосоми. У 24-му пасажі розподіл хромосом за розмірами наближався до такого в клітинах меристеми корінців (рис. 2,а).

Було проведено також порівняння розподілів кількості хромосом за розмірами у послідовних пасажах культури тканин (рис. 2,б). Встановлено, що найбільш значні зміни відбуваються в період між 7 та 18 пасажами для хромосом А і С, та, меншою мірою, для хромосоми D. У подальшому, в період між 18 та 24 пасажем, рівень відмінностей для розподілів хромосом А і С зменшується, а для хромосоми D, навпаки, збільшується.

Аналіз відносних розмірів окремих хромосом ( $l$ , відносно сумарної довжини геному) показав, що співвідношення окремих хромосом в процесі культивування практично не зазнає змін (табл. 3). Проте, при аналізі окремих типів хромосом було знайдено зміни співвідношення розміру довгих і коротких плечей: у 7-му пасажі спостерігали такі зміни хромосоми D, у 24-му пасажі



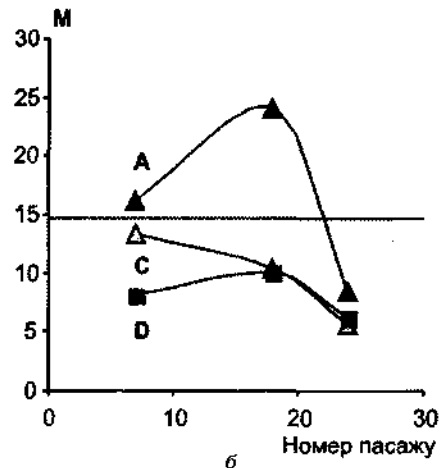
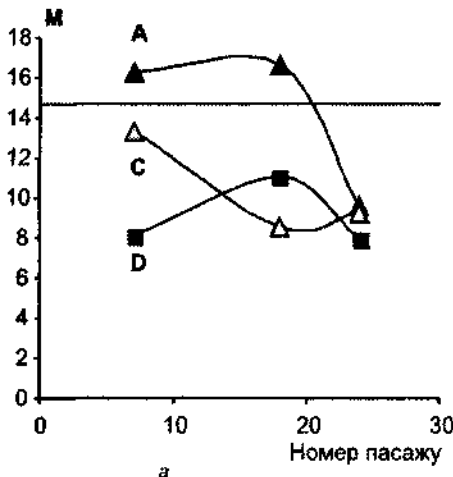
**Рисунок 2.** Міра квадратичного відхилення ( $N$ ) розподілу за довжиною хромосом культури тканин різних пасажів (7, 18, 24-го) порівняно з їх розподілом у корінцях інтактної рослини *C. capillaris* (а) та порівняно з розподілом у хромосомах попереднього дослідженого пасажу (репер – 7-й пасаж, 7-й – 18-й пасаж, 18-й – 24-й пасаж) (б). Горизонтальна лінія – межа 5% критичної ділянки розподілу  $\chi^2$  з  $k-1$  ступенями вільності, вхід в яку означає, що відхилення досліджуваного розподілу від розподілу  $\chi^2$  стає значимим.

зміненими порівняно з репером виявилися хромосоми С і D (табл. 3). При цьому зміни хромосоми D у 7-му і 24-му пасажі (у 18-му пасажі не проводили) мали протилежну спрямованість: у 7-му пасажі зменшеною порівняно з репером виявилися середні значення довжини всієї хромосоми і її короткого плеча, у 24-му пасажі ці показники перевищували середні значення для хромосоми D меристеми корінців.

Поряд з оцінкою морфометричних параметрів хромосом було проведено дослідження розподілу центрів інтенсивності забарвлення гетерохроматину у складі хромосом кожного типу в клітинах культури тканин різних пасажів порівняно з клітинами меристеми корінців проростків. Уже попередній аналіз розподілів центрів інтенсивного забарвлення показав досить велику гетерогенність хромосом культивованих клітин за цим показником. Більш гетерогенними за розташуванням гетерохроматинових центрів ви-

явилися хромосоми А та D, а найбільшу гетерогенність цього показника спостерігали в клітинах 7-го пасажу.

Оскільки розподіл розташування центрів інтенсивності забарвлення у відносних одиницях вздовж хромосоми кожної вибірки був поліноміальним, для статистичної обробки отриманих результатів застосували метод порівняння поліноміальних ймовірностей у двох експериментах. Дослідження міри квадратичного відхилення (порівняння з розподілом  $\chi^2$ ) розподілу гетерохроматинових центрів у хромосомах культури тканин різних пасажів порівняно з їх розподілом у корінцях інтактної рослини показало, що у 7-му пасажі відхилення було достатньо високим для хромосоми А (для хромосом С та D його значення не входило в межу критичної ділянки) і досить різко падало в процесі подальшого культивування (рис. 3,а). У 24-му пасажі відмінності від розподілу репера для всіх хромосом зменшувалися майже до однакового рівня.



**Рисунок 3.** Міра квадратичного відхилення розподілу гетерохроматинових центрів (М) вздовж хромосом культури тканин різних пасажів (7, 18, 24-го) порівняно з їх розподілом у корінцях інтактної рослини *C. capillaris* (а) та порівняно з розподілом у хромосомах попереднього дослідженого пасажу (порівнювали пари: репер - 7-й пасаж, 7-й - 18-й пасаж, 18-й - 24-й пасаж) (б). Горизонтальна лінія - межа 10% критичної ділянки розподілу  $\chi^2$  з k-1 ступенями свободи, вхід в яку означає, що відхилення досліджуваного розподілу від розподілу  $\chi^2$  стає значимим.

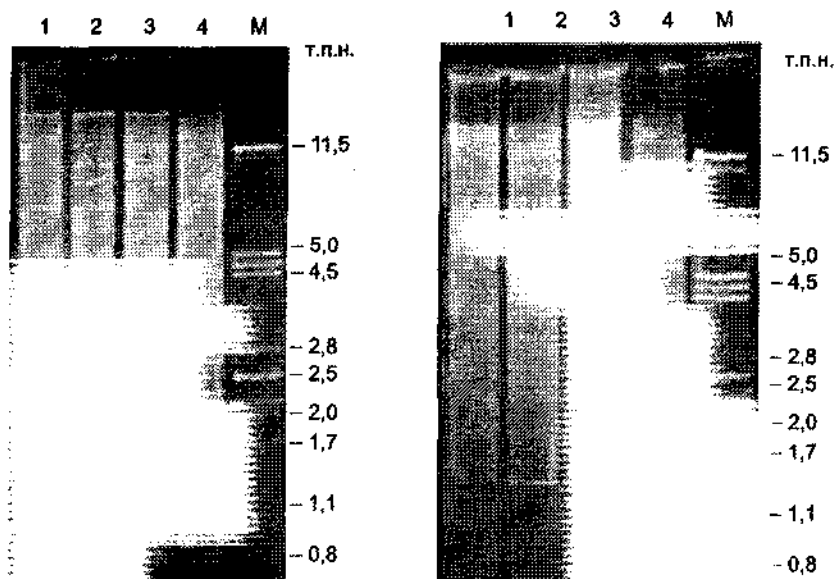


Дослідження динаміки змін розташування гетерохроматинових центрів шляхом порівняння розподілів двох послідовних пасажів показало, що найбільше змінюється хромосома А в 7-му та, особливо, у 18-му пасажах (рис. 3, б). Квадратичне відхилення розподілу за розташуванням гетерохроматинових центрів хромосоми А спочатку зростало, а потім зменшувалось від пасажу до пасажу і виходило з критичної ділянки в 24-му пасажі.

Дослідження молекулярних основ морфологічної мінливості хромосом. Генетична гетерогенність культивованих клітин частково є наслідком змін, що накопичуються в тканині експланту в процесі онтогенезу рослини, а частково індукована умовами культивування, які діють в ролі стресового чинника [2]. Отже, можна очікувати, що генетичні зміни, які детектуються в культурі *in vitro*, будуть певною мірою подібні до геном-

них перебудов, що спостерігаються в диференційованих тканинах інтактної рослини. Тому, при дослідженні культури тканин *C. capillaris*, індукованої з кореневого експланта, було проведено рестрикційний ДНК не тільки з кореня, а й з інших диференційованих тканин інтактної рослини (зрілий та молодий листок). Зокрема, в роботі були використані ендонуклеази рестрикції HindIII, BamHI, EcoRI та AluI, з яких три останні виявляють чутливість до модифікації нуклеотидних залишків у складі сайту впізнання ферменту.

При гідролізі ДНК досліджених об'єктів рестриктазами HindIII та BamHI утворювались спектри фрагментів у широкому діапазоні молекулярних мас, з чітко вираженими дискретними смугами (рис. 4, а, б), тоді як продукти EcoRI та AluI-гідролізу були представлені однорідними спектрами без помітних фрагментів (дані не наведено).



**Рисунок 4.** Рестрикційний аналіз ДНК калюсу та тканин інтактної рослини *C. capillaris*. а – продукти HindIII-гідролізу; б – продукти BamHI-гідролізу. 1 – корінь; 2 – зрілий листок; 3 – молодий листок; 4 – калюс 24-го пасажу. М – маркер, PstI-гідролізована ДНК фага  $\lambda$ .

Усі використані ферменти рестрикції виявили міжтканинний поліморфізм і наявність відмінностей між тканинами інтактною рослини і калюсною тканиною як за ступенем гідролізу ДНК, так і за спектром рестрикційних фрагментів. Крім того, тканини інтактною рослини також характеризувались специфічними спектрами рестрикційних фрагментів. У цілому, для калюсних тканин порівняно з тканинами кореня були властивими вищий ступінь гідролізу та спектри, представлені набором значно більшої кількості чітко виражених смуг приблизно однакової інтенсивності в усьому діапазоні молекулярних мас. Між тканинами кореня і листка також спостерігали відмінності за спектрами фрагментів та ступенем гідролізу ДНК, однак у випадку диференційованих тканин інтактною рослини різниця між наборами фрагментів була не такою суттєвою, як для калюсних тканин. Значні відмінності за ступенем гідролізу було знайдено для різних за ступенем диференціації тканин зрілого і молодого листка з серцевини розетки. Найвищий ступінь гідролізу був характерним для тканин зрілого листка, найменший – для молодого листка, кореневі тканини займали проміжне положення. Різниця у ступені гідролізу виявлена лише для рестриктаз BamHI, EcoRI та AflI, чутливих до модифікації нуклеотидних залишків у складі сайту впізнавання ферменту.

Таким чином, нами досліджено зміни повторюваних послідовностей геному *S. capillaris* на рівні структури хромосом та послідовностей ДНК при введенні в культуру тканин та подальшому вирощуванні в умовах *in vitro*. Застосований С-метод диференціального забарвлення хромосом дозволив одночасно дослідити варіабельність каріотипу на мор-

фологічному рівні та зміни розподілу гетерохроматинових ділянок. Використання диференціального забарвлення також надало можливість ідентифікувати хромосоми як у нормальних, так і в перебудованих каріотипах.

Вивчення морфології хромосом виявило значну гетерогенність за розміром окремих типів хромосом калюсної культури та меристеми корінців інтактною рослини (репера). Порівняльний аналіз довжин хромосом калюсної культури різних пасажів та реперу за допомогою критерію медіани показав, що культивування клітин *S. capillaris* в умовах *in vitro* супроводжується зміною розподілів хромосом за лінійними розмірами, а також співвідношення розмірів довгих і коротких плечей хромосом. Достовірні відмінності за середніми значеннями лінійних розмірів хромосом при порівнянні з репером за критерієм медіани виявлені в культурах тканин 7-го та 18-го пасажів. У 24-му пасажі розподіл хромосом за лінійними розмірами наближався до такого в клітинах репера. Встановлено, що окремі хромосоми в процесі культивування характеризуються різним рівнем мінливості за розміром.

При аналізі розподілів центрів інтенсивного забарвлення хромосом виявлено гетерогенність хромосом в культивованих клітинах одного пасажу. Найбільш гетерогенними за розташуванням гетерохроматинових центрів виявилися хромосоми А та D. Дослідження динаміки показали, що найбільших змін за цим показником зазнає хромосома А на перших етапах культивування (7-й та 18-й пасаж). У 24-му пасажі відмінності від розподілу репера для всіх типів хромосом практично зникали.

Крім того, в культивованих клітинах спостерігали появу нових морфологіч-

них варіантів хромосом, невластивих для інтактної рослини. Серед перебудованих хромосом особливо часто зустрічалися метацентричні. На підставі наявності в метафазних пластинках поряд з перебудованими хромосомами нормальних хромосом А і С та обох незмінених хромосом Д їх ідентифікували як перебудовані хромосоми А і С. Про появу аналогічним чином перебудованої хромосоми А в калюсі кореневого походження *C. capillaris* існують також повідомлення інших авторів [10].

При вивченні каріотипу культури тканин *C. capillaris* нашу увагу привернула поява надлишкової сьомої хромосоми, що також спостерігалася й іншими дослідниками [11]. Для *Crepis capillaris* характерна система додаткових В-хромосом, кількість яких змінюється від нуля до трьох. В-хромосоми є мітотично нестабільні, їх кількість може відрізнятись у кожній індивідуальній рослині. Оскільки варіації В-хромосом збільшують хромосомну мінливість, вони можуть мати еволюційне значення [5]. Однак, виявлена нами надлишкова хромосома за розмірами і морфологією відрізнялася від характерної для родини *Compositae* додаткової В-хромосоми.

Проведені дослідження дозволили виявити у *C. capillaris* наявність поліморфізму довжин рестрикційних фрагментів ДНК тканин кореня інтактної рослини та калюсу кореневого походження, які свідчать про те, що культивування тканин *C. capillaris* в умовах *in vitro* індукує геномні зміни, а також відмінності характеру гідролізу ДНК з різних тканин рослини. Ці відмінності полягали в тому, що всіма використаними ендонуклеазами рестрикції ДНК культури тканин гідролізується значно більшою мірою порівняно з ДНК коре-

ня. Відмінності за ступенем гідролізу відмічені й між різними тканинами інтактної рослини. Найвищий ступінь розщеплення спостерігали у випадку ДНК зрілого листка, ДНК молодого листка і кореня фрагментується менше. Ця різниця найбільш виражена при обробці BamHI, EcoRI та AluI рестриктазами, які виявляють чутливість до модифікації нуклеотидних залишків у складі сайту впізнавання ферменту. Відомо, що диференціація клітин у онтогенезі супроводжується різноманітними змінами геному, зокрема змінами рівня метилювання ДНК [2]. Цілком вірогідно, що саме це й зумовлює виявлені міжтканинні відмінності за ступенем гідролізу ДНК чутливими до метилювання рестриктазами. Таким чином, у геномі *C. capillaris* диференціація тканин корелює з різним характером метилювання ДНК. Виходячи з виявлених міжтканинних відмінностей в ступені гідролізу ДНК можна припустити, що відмінності в спектрах рестрикційних фрагментів ДНК кореня та калюсної тканини частково обумовлені змінами в характері модифікації нуклеотидів, що, як відомо [2, 3], відбуваються в процесі дедиференціації клітин при введенні в культуру *in vitro*.

Крім зазначеної різниці в ступені гідролізу, ДНК культури тканин і тканин інтактної рослини відрізняються за спектрами рестрикційних фрагментів. Зокрема, для калюсної тканини властиве утворення набору великої кількості приблизно однаково виражених фрагментів, а в тканинах інтактної рослини на фоні слабо виражених фрагментів спостерігали декілька мажорних смуг. Виявлений в культурі тканин набір рестрикційних фрагментів можливо пояснити ампліфікацією частки повторів, які містять сайти пізнавання

для використаних рестриктаз. На користь цього припущення свідчать дані проведених нами цитологічних досліджень [12], які демонструють зміни розміру хромосом в клітинах калюсної тканини *C. capillaris*. Зростання частки окремих фракцій повторюваних послідовностей спостерігали в культурі *in vitro* *C. capillaris* [13] та *R. serpentina* також в інших дослідженнях [14].

Оскільки гетерохроматизація хроматину пов'язана з підвищенням рівня метилювання, однією з причин появи хромосомних перебудов, можливо, є зміна рівня метилювання ДНК. На користь цього припущення свідчить і те, що такі складові використаного в наших дослідженнях середовища Еріксона, як ауксини індолілоцтова та нафтилоцтова кислоти, викликають підвищення рівня метилювання. Метильований цитозин має більшу спорідненість до гістону H1, який бере участь у конденсації хроматину. Тому існує велика вірогідність того, що підвищений вміст метилцитозину уповільнює реплікацію і це стає причиною хромосомних перебудов, таких, як делеції, інверсії, дуплікації та транслокації.

## Висновки

У процесі дедиференціації за індукції калюсоутворення та подальшого культивування *in vitro* в клітинах *C. capillaris* виникають геномні зміни, які виявляються у вигляді певних змін лінійних розмірів та морфології хромосом, лабільності локалізації гетерохроматинових районів, поліморфізму довжин рестрикційних фрагментів, а також різного ступеня гідролізу ДНК ендонуклеазами рестрикції.

Робота виконувалася за підтримки Державного фонду фундаментальних

досліджень при Міністерстві освіти і науки (No. 05.07/00219).

Представлено М. В. Кучуком  
Надійшла 17.01.2006

## Перелік літератури

1. Fani V., Raina S. N. Genetic fidelity of organized meristem-derived micropropagated plants: a critical reappraisal // *In Vitro Cell. Dev. Biol. - Plant* - 2000. - 36. - P. 319-330.
2. Кунах В. А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. - К.: Логос, 2005. - 730 с.
3. Kaeppler S., Kaeppler H., Yong R. Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants // *Plant Molecular Biology*. - 2000. - 43. - P. 179-188.
4. Grant W. F., Owens E. T. Chromosome aberration assays in *Crepis* for the study of environmental mutagens // *Mutation Research* - 1998. - 410. - P. 291-307.
5. Дубинина Л. Г. Структурные мутации в опытах с *Crepis capillaris*. - М.: Наука, 1978. - 186 с.
6. Eriksson T. Studies on the growth requirements and growth measurements of cell cultures of *Haplopappus gracilis* // *Physiol. Plant*. - 1965. - 18, № 4. - P. 976-993.
7. Rogers S. O., Bendich A. J. Extraction of DNA from milligram amounts of field plant tissues // *Plant Molecular Biology*. - 1985. - 5. - P. 69-76.
8. Саралидзе Е. Г., Ульянов Н. Б., Бадаев Н. С., Зеленин А. В., Каминир Л. Б. Анализ дифференциально окрашенных хромосом злаков с помощью сканирующей и вычислительной техники // *Цитология*. - 1986. - 26, № 4. - С. 466-472.
9. Поллард Дж. Справочник по вычислительным методам статистики. - М.: Финансы и статистика, 1982. - 344 с.
10. Maluzhanska J. The effect of B chromosomes and T-DNA on chromosomal variation in callus cells and regenerated roots of *Crepis capillaris* // *Plant Cell Tissue Organ Cult.* - 1997. - 50. - P. 113-118.
11. Lee M., Phillips R. The chromosomal basis of somaclonal variation // *Ann. Rev. Plant*

- Phisiol. Plant. Mol. Biol. – 1988. – 39. – P. 413–437.
2. Кнутава Ю. Ф., Мірюта Н. Ю., Адонін В. І., Кунах В. А. Порівняльне дослідження морфометричних параметрів хромосом інтактних рослин та культури тканин *Crepis capillaris* L. *in vitro* // Зб. наук. статей "Фактори експериментальної еволюції організмів". – К.: Агронаука, 2003. – С. 351–356.
13. Солов'ян В. Т., Попович В. А., Кунах В. А. Переустройство генома культивуємих кліток *Crepis capillaris* // Генетика – 1989. – 25, № 10. – С. 1768–1776.
14. Солов'ян В. Т., Костенюк І. А., Кунах В. А. Изменения генома культивируемых *in vitro* клеток раувольфии змеиной // Генетика – 1987. – 23, № 7. – С. 1200–1207.

ОСОБЕННОСТИ ИЗМЕНЕНИЙ ГЕНОМА *CREPIS CAPILLARIS* В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO* НА ЦИТОЛОГИЧЕСКОМ И МОЛЕКУЛЯРНОМ УРОВНЕ

Ю. Ф. Кнутава, И. О. Андреев,  
Е. В. Спиридонова, Н. Ю. Мирюта,  
В. И. Адонин, В. А. Кунах

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины,  
Украина, 03143,  
г. Киев, ул. Акад. Заболотного, 150,  
kunakh@imbg.org.ua

Установлено, что в процессе дедифференциации клеток при индукции каллусообразования и культивировании *in vitro* в геноме клеток *C. capillaris* происходят изменения морфологии хромосом, локализации

в хромосомах гетерохроматиновых блоков, а также перестройки фракции повторяющихся последовательностей ДНК. Обнаружено, что как дифференцировка клеток в онтогенезе, так и культивирование тканей *C. capillaris in vitro* индуцируют изменения уровня модификации нуклеотидов, в частности, метилирования. **Ключевые слова:** *Crepis capillaris*, геномная изменчивость, культура тканей растений, хромосомы, ДНК, гетерохроматин

THE PECULIARITIES OF GENOME REARRANGEMENTS ON CYTOLOGICAL AND MOLECULAR LEVEL IN *CREPIS CAPILLARIS* TISSUES CULTURED *IN VITRO*

Yu. F. Knutova, I. O. Andreev, K. V. Spiridonova,  
N. Yu. Miryuta, V. I. Adonin, V. A. Kunakh

Institute of Molecular Biology and Genetics of NAS of Ukraine,  
Ukraine, 03143, Kiev,  
Acad. Zabolotnogo str. 150,  
kunakh@imbg.org.ua

In the course of cell dedifferentiation upon callus formation and culturing *in vitro* *C. capillaris* genome undergoes the changes in chromosome morphology, heterochromatin block localization as well as rearrangements in the fraction of repeated DNA sequences. Both *C. capillaris* cell differentiation in ontogenesis and tissue culturing *in vitro* were found to induce changes in nucleotide modification pattern, in particular cytosine residues methylation pattern.

**Key words:** *Crepis capillaris*, genome rearrangements, plant tissue culture, chromosomes, DNA, heterochromatin

УДК 633.1 : 58. 081. 3

## ШЛЯХИ РЕАЛІЗАЦІЇ РЕГЕНЕРАЦІЙНОГО ПОТЕНЦІАЛУ В КУЛЬТУРІ ПИЛЯКІВ У РІЗНИХ ГЕНОТИПІВ ОЗИМОЇ М'ЯКОЇ ПШЕНИЦІ

К. І. ЛОБАНОВА, М. В. ЖОСОНАР, С. О. ІГНАТОВА

Південний біотехнологічний центр у рослинництві УААН, МОН України  
Україна, 65036, м. Одеса, Овідіопольська дор.3.

*Вивчали регенераційну здатність 8 генотипів озимої м'якої пшениці (Чайка, Ciano, Mercia, Capelle, Бригантина, Mara, Avalon, Скороспілка) в культурі пиляків з метою виявлення найбільш чутливих генотипів, які можна використувати у якості генетичних джерел гаплопродукційної здатності. Виявлено, що генотипи відрізнялися за кількістю сформованих макроструктур та їх типом. Кращу регенераційну здатність виявили генотипи Capelle, Mara, Ciano, що сформували більшу кількість ембріодів та ЕКК.*

*Ключові слова: пшениця, етапи гаплопродукції, регенерація, ембріоди, ембріональні клітинні комплекси, калюс*

**ВСТУП.** Одним з найважливіших напрямків селекції м'якої пшениці є створення гомозиготного матеріалу з ранніх поколінь гібридів. Перспективним методом для його одержання при значному прискоренні процесу отримання лінійного матеріалу є культура пиляків *in vitro*. У різних країнах продемонстровані вдалі результати даного біотехнологічного напрямку роботи – отримано понад 30 лінійних сортів ярої та озимої м'якої пшениці і десятки тисяч ліній для різних селекційних програм. Незважаючи на це, широкому практичному використанню даної гаплоїдної технології заважають все ще невирішені важливі питання. Серед яких – низький рівень чутливості до андрогенезу генотипів озимої м'якої пшениці та невисокий рівень регенерації рослин зі сформованих в пиляках макроструктур. Оскільки рівень регенерації фертильних рослин із пиляків визначає практичну цінність та ефективність цієї біотехнології, пошук чинників, що позитивно впливають на регенераційну здатність калюсних та ембріодних структур у культурі пиляків пшениці є важливим та актуальним. Підходи до вирішення цього питання у авторів різні. Однак більшість вважає, що проблема може бути вирішена лише тоді, коли буде створено певний комплекс умов, які забезпечуватимуть оптимальне проходження усіх етапів гаплопродукційного

© К. І. ЛОБАНОВА, М. В. ЖОСОНАР, С. О. ІГНАТОВА, 2006

процесу, починаючи з вирощування донорів до регенерації рослин [1–5]. Це сприятиме найповнішій реалізації генетичних можливостей генотипів.

У даній роботі досліджено регенераційну здатність трьох типів макроструктур, у різних генотипів озимої пшениці.

### **Матеріали і методи**

В якості вихідного матеріалу використовували генотипи сортів Чайка, Сіано, Mercia, Capelle, Mara, Avalon, Бригантіна, Скороспілка.

Донорні рослини вирощували в польових умовах. Пагони та колосся зрізали коли більшість мікроспор в пиляках знаходилась на середньопізній фазі розвитку мікроспори. Проводили господарську передобробку пагонів із колоссями при температурі 2 °С у темряві протягом 4 діб. Колосся стерилізували розчином гіпохлориту кальцію. Виготовлені пиляки висаджували на первинне середовище 190-2M [6], у нашій модифікації із доданням 1,5 мг/л 2,4-Д, 30 г/л сахарози, 400 мг/л проліну, 300 мг/л глютаміну та 0,5 мг/л кінетину. При культивуванні пиляків проводили цитологічний контроль за розвитком мікроспор в пиляках на мікроскопі Cytoton, EL-Einsatz. Кількість морфогенних мікроспор підраховували на 5000 мікроспор кожного генотипу. Культивували перші 3 доби у темряві при температурі 30 °С, далі при 24 °С до появи новоутворень (появу мікроструктур в пиляках фіксували починаючи з 10 доби культивування, макроструктур – з 20–30 доби культивування). Отримані макроструктури далі проходили знову фазу культивування: на жидкому середовищі для регенерації MS [7] у нашій модифікації: 30 г/л

сахарози, 0,5 мг/л кінетину, 200 мг/л проліну, 200 мг/л глютаміну у темряві, до появи на їх поверхні візуально спостережуваних меристематичних центрів. Ці структури далі культивували при 16-годинному фотоперіоді, температурі 24 °С. Кількість морфогенних пиляків та кількість новоутворень розраховували від кількості висаджених пиляків певного генотипу. Статистичну обробку отриманих даних проводили за методикою Рокицького [8].

### **Результати та обговорення**

Контроль за розвитком мікроспор в пиляках показав, що кількість життєздатних мікроспор різко зменшилася на 2-3 добу культивування. Спостерігали різні ступені деградації мікроспор: плазмоліз, деформацію, загибель. Була присутня певна частка морфогенних мікроспор, які були забарвленими на тимчасових ацетокармінових препаратах. Вони характеризувалися високою мітотичною активністю та пізніше трансформувались у багатоядерні структури. На 10 день у культурі *in vitro* наявність багатоядерних морфогенних утворень спостерігали у генотипів Чайка, Сіано, Mercia та Capelle (табл. 1). Максимальна їх кількість була зафіксована у генотипу Mercia (77), на 10 добу культивування. Далі, у більшості генотипів, кількість мікроструктур зростала. У генотипів Бригантіна, Mara, Avalon появи багатоядерних структур на 10–15 добу культивування не спостерігали.

У пиляках генотипів Чайка, Сіано, Mercia та Capelle на 15–20-ту добу культивування спостерігали поділи ядер та формування багатоклітинних структур, які знаходилися всередині оболонки мікроспори. Надалі, у деяких

випадках, оболонка мікроспори розтріскувалася. На 20–25 добу культивування окремі клітини продовжували ділитися, утворюючи проембрію. Генотипи Чайка, Ciano, Mercia та Capelle характеризувалися інтенсивними поділами та значною кількістю багатоядерних та багатоклітинних структур. Ці генотипи, як правило, далі формували велику кількість новоутворень та характеризувалися високим рівнем зелених рослин-регенерантів. У трьох генотипів Бригантина, Mara, Avalon до 20-ї доби культивування пиляків більшість мікроспор була нежиттєздатною. Тільки на 20–25-й день у цих генотипів фіксували появу незначної кількості морфогенних структур (табл. 1).

Кількість багатоядерних та багатоклітинних структур та динаміка їх розвитку була різною у дослідних генотипів. Генотип Mercia характеризувався максимумом багатоядерних структур (77) на 10 добу культивування пиляків (табл. 1). У генотипів Чайка та Capelle найбільша кількість мікроструктур була зафіксована на 15 добу культивування пиляків і складала 118 та 69 відповідно. Надалі кількість багато-

ядерних та багатоклітинних структур зменшувалася внаслідок їх загибелі. У генотипу Ciano кількість мікроструктур поступово зростала і досягла максимуму на 20 добу культивування. Таким чином, аналіз тестування генотипів Чайка, Ciano, Mercia, Capelle виявив наступну динаміку формування та розвитку мікроструктур: поступове збільшення кількості морфогенних структур з максимумом на 15–20 добу, а надалі зменшенням їх кількості на 25 добу культивування пиляків. На другому етапі культивування ці генотипи, як правило, характеризувалися високим процентом новоутворень та регенерації рослин.

У генотипів Бригантина, Avalon спостерігали іншу картину. Формування багатоядерних структур було відзначено лише на 20 добу культивування пиляків та їх кількість до 25 доби значно не змінилася (табл. 1). Загальна кількість морфогенних структур була значно меншою, ніж у першій групі генотипів. За подальшого культивування пиляків цих генотипів спостерігали невисокі показники гаплопродукції.

Таким чином, максимальну кількість новоутворень було отримано у геноти-

**Таблиця 1.** Результати тестування генотипів озимої м'якої пшениці при культивуванні пиляків на середовищі 190-2М

Генотип	Кількість багатоядерних та багатоклітинних мікроструктур в культивованих пиляках, шт. (на 5000 мікроспор)			
	10 діб	15 діб	20 діб	25 діб
Чайка	9	118	64	60
Ciano	12	18	75	32
Mercia	77	30	66	31
Capelle	26	69	51	27
Бригантина	-	-	1	2
Mara	-	-	7	10
Avalon	-	-	2	2



пу Ciano (66,1%) (табл.2). Високі показники кількості макроструктур також були відзначені у генотипів Capelle (46,1%), Avalon (36,1%), Mara (29,8%). Мінімальну кількість новоутворень сформуvalи генотипи Бригантина (5,6%) та Скоро-спілка (3,4%) (табл. 2). При формуванні морфогенних структур на поверхні пиляків пшениці фіксували тип утворених макроструктур – ембріональні клітинні комплекси (ЕКК), ембріюди або калюс.

Отримані результати демонструють, що тип новоутворень та їх кількість варіюють у різних генотипів. Так, у генотипу Ciano було отримано 177 ЕКК та 49 ембріюдів, та лише 2 калюси (табл. 2). При подальшому культивуванні цих макроструктур отримали високий процент регенерації рослин (табл. 3). Генотипи, які формували більшу долю ЕКК та ембріюдів, ніж калюсу (або калюс взагалі не формували) регенерували значну кількість рослин. І навпаки, коли новоутворення у генотипів Бригантина, Скоро-спілка, Avalon у більшості були представлені

калюсом, індукція рослин-регенерантів була дуже низькою: у генотипу Скоро-спілка – зелених регенерантів не було отримано, 0,35 % альбіносів, Бригантина – 0,6 % зелених рослин із сформованих новоутворень (табл. 3).

## Висновки

Результати наших досліджень свідчать про те, що низькі показники регенерації рослин в культурі пиляків озимої пшениці пов'язані із нездатністю певної частки сформованих новоутворень до регенерації у запропонованих умовах, формуванням неморфогенного калюсу, певної частки ризогенезу без утворення пагонів, за яких регенерація спостерігалась рідко. Наші припущення узгоджуються з другими авторами [2,3,9]. Регенерація рослин із калюсів більш довгий та складний процес, ніж із ембріюдів, що пов'язано з морфогенною здатністю отриманих калюсів. Найбільш швидким та ефективним для отримання рослин-регенерантів є процес формування ембріюдів

**Таблиця 2.** Показники перших етапів гаплопродукційного процесу в культурі пиляків у різних за чутливістю генотипів озимої м'якої пшениці

Генотип	Кількість висаджених пиляків, шт.	Кількість морфогенних пиляків, шт.	Кількість новоутворень, шт.	Новоутворення від висаджених пиляків, %	Типи новоутворень, шт.		
					ЕКК	Е	К
Чайка	385	15	19	4,9±1,1	7	10	2
Ciano	345	79	228	66,1±2,55	177	49	2
Mercia	600	60	80	13,3±1,39	42	32	6
Capelle	221	45	102	46,1±3,35	80	22	-
Бригантина	630	36	41	6,5±0,98	14	22	5
Mara	94	16	28	29,8±4,71	8	16	4
Avalon	563	95	48	36,1±2,02	-	9	39
Скоро-спілка	1022	32	35	3,4±0,57	-	22	13

**Примітка:** ЕКК – ембріональні клітинні комплекси; Е – ембріюди; К – калюс.

**Таблиця 3.** Показники регенерації в культурі пиляків у різних за чутливістю генотипів озимої м'якої пшениці

Генотип	Кількість висаджених пиляків, шт.	Кількість морфогенних пиляків, шт.	Кількість новоутворень, шт.	Регенерація зелених рослин, шт.	Регенерація зелених рослин від кіп-ті висаджених пиляків, %	Регенерація альбіносів, шт.	Регенерація альбіносних рослин від кількості висаджених пиляків, %
Чайка	385	15	19	7	1,8 ± 0,68	2	0,56 ± 0,368
Сіано	345	79	228	30	8,7 ± 1,52	38	11,0 ± 1,68
Mercia	600	60	80	28	3,8 ± 0,78	1	0,2 ± 0,18
Capelle	221	45	102	35	15,8 ± 2,45	16	7,2 ± 1,74
Бриган-тина	630	36	41	4	0,6 ± 0,31	–	–
Mara	94	16	28	10	10,6 ± 3,17	10	10,6 ± 3,17
Avalon	563	95	48	2	0,35 ± 0,23	–	–
Скороспілка	1022	32	35	–	–	3	0,3 ± 0,17

безпосередньо із багатоклітинних комплексів [9].

Таким чином, тип сформованих новоутворень у культурі пиляків пшениці певною мірою є показником регенераційної здатності генотипу.

#### Перелік літератури

1. Лукьянюк С. Ф., Ігнатова С. А. // Науч.-техн. бюлл. Всес. Селекц.-генет. ин-та.– 1986, № 2.– С. 41.
2. Круглова Н. Н., Батыгина Т. Б., Сельди-мирова О. А. Морфогенетический потенциал спорогенных клеток пыльника злаков // Успехи соврем. биологии.– 2000.– 20, Вып. 5.– С. 490–500.
3. Круглова Н. Н. Микроспора злаков как модельная система для изучения путей морфогенеза: Автореф. дис. д-ра. биол. наук.– Уфа, 2002.– 48 с.
4. Novotny J., Vagera J., Ohnoutkova L. Effect of free and chelated iron on in vitro androgenesis in barley and wheat // Plant Cell, Tissue and Organ Culture.– 2000.– 63.– P. 35–40.
5. Wang M., S. van Bergen, B. Van Duijn. Insights into a Key Developmental Switch and Its Importance for Efficient Plant Breeding // *Physiol Plant.*– 2000.– 124.– P. 523–530.
6. Wang Xingzhi, Hu Han. The effect of potato-2 medium for triticales anther culture // *Plant Science Letters.*– 1984.– 36.– P. 237–239.
7. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // *Physiol. Plant.*– 1962.– 15.– P. 473–497.
8. Рокицкий П. Ф. Биологическая статистика.– Минск: Изд-во Минского ун-та, 1973.– 316 с.
9. Анапийев Б. Б., Скакова К. М., Рахимбаев И. Р. Морфогенез и регенерация растений в культуре микроспор пшеницы и ячменя *in vitro* // Биология клеток растений *in vitro*, биотехнология и сохранение генофонда. VII Межд. конф. (Москва, 1997 г.): Тез. докл.– 1997.– С. 65.

Представлено Т. М. Чеченёвою  
Надійшла 20.02.2006

**ПУТИ РЕАЛИЗАЦИИ РЕГЕНЕРАЦИОННОГО ПОТЕНЦИАЛА В КУЛЬТУРЕ ПЫЛЬНИКОВ ОЗИМОЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ**

*Е. И. Лобанова, М. В. Жосонарь,  
С. А. Игнатова*

Южный биотехнологический центр  
в растениеводстве УААН,  
Украина, 65036, г. Одесса,  
Овидиопольская дор. 3,

Изучали отзывчивость 8 генотипов озимой мягкой пшеницы (Чайка, Ciano Mersia, Capelle, Бригантина, Mara, Avalon, Скоро-спелка) в культуре пыльников с целью выявления наиболее отзывчивых из них на всех этапах гаплопродукционного процесса. Выявлено, что генотипы отличались по количеству сформированных макроструктур и по их типу. Лучшую регенерационную способность проявили сорта Capelle, Mara, Ciano, которые сформировали большее количество эмбрионидов и ЭКК.

*Ключевые слова:* пшеница, этапы гапло-продукции, регенерация, эмбриониды, эмбриональные клеточные комплексы, калус

**THE WAY TO REALIZATION REGENERATION POTENTIAL IN ANTHOR CULTURE OF DIFFERENT GENOTYPES OF WINTER SOFT WHEAT**

*K. I. Lobanova, M. V. Zhosonar, S. A. Ignatova*

South Plant Biotechnology Center UAAS,  
Ukraine, 65036, Odessa,  
Ovidiopolskaya Dor. 3,

The responsiveness of 8 genotypes of winter soft wheat (Shajka, Ciano Mersia, Capelle, Brigantina, Mara, Avalon, Skorospelka) in anther culture with the purpose of revealing most responsively of them at all stages of the haploproduction process were studied. It is revealed, that genotypes differed by quantity of the generated macrostructures and on their type. The best regenerating ability was shown with cultivars Capelle, Mara, Ciano, which have generated a lot of embryos and embryos cell complex (ECC).

*Key words:* wheat, haploproduction process, regenerating, embryos cell, callus.

УДК 575.22: 633.15 + 576.5

**ГЕНОМНАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ ЛИНИИ КУКУРУЗЫ  
BLACK MEXICAN SWEET CORN C456 В КУЛЬТУРЕ  
ТКАНЕЙ *IN VITRO*: РЕЗУЛЬТАТЫ RAPD-АНАЛИЗА**Д. Н. МАЙДАНЮК, И. О. АНДРЕЕВ, Е. В. СПИРИДОНОВА,  
Т. Н. ЧЕЧЕНЕВА<sup>1</sup>, В. А. КУНАХИнститут молекулярной биологии и генетики НАН Украины,  
Украина, 03143, Киев, ул. Акад. Заболотного, 150,  
kunakh@imbg.org.ua<sup>1</sup> Национальный аграрный университет,  
Украина, 03041, Киев, ул. Героев обороны, д. 15

Проведен анализ геномной изменчивости кукурузы линии *Black Mexican Sweet Corn C456* в культуре *in vitro* и внутрелинейной гетерогенности при помощи RAPD-ПЦР. Показано, что в культивируемых тканях происходят изменения генома, которые обнаруживаются уже на первых этапах культивирования. Увеличение продолжительности культивирования в условиях *in vitro* до 15 месяцев сопровождается дальнейшими изменениями. Анализ индивидуальных растений линии *C456* обнаружил внутрелинейную гетерогенность, которая может вносить определенный вклад в полиморфизм спектров продуктов ПЦР культивируемых тканей. Вместе с тем, внутрелинейной гетерогенности по полиморфным в культуре ампликонам не наблюдали. В целом, обнаруженная в культуре тканей инбредной линии кукурузы *C456* изменчивость по размаху не превышает внутрелинейной гетерогенности. На основании анализа полученных результатов и литературных данных сделано предположение о различной стабильности в культуре *in vitro* геномов разных линий кукурузы.

Ключевые слова: кукуруза, культура тканей растений, геномная изменчивость, RAPD-анализ, биотехнология растений

**ВСТУПЛЕНИЕ.** Кукуруза является ценным сельскохозяйственным растением, по валовому сбору зерна она занимает второе место в мире после пшеницы. Создание новых сортов и гибридов кукурузы с агрономически ценными признаками уже многие годы является одним из основных направлений работы многих селекционных центров. Однако, классический селекционный процесс является трудоемким и требует значительных затрат времени и средств. Заслуживающей внимания альтернативой может быть культура тканей *in vitro*, позволяющая добиться увеличения генетического разнообразия исходного расти-

тельного материала благодаря использованию феномена соматической изменчивости [1, 2]. Кроме того, ультратонкая культура тканей может быть использована для селекции и быстрого размножения ценных генотипов путем клонирования [3, 4]. Однако использованию данного метода в биотехнологических разработках, помимо всего прочего, препятствует недостаточная изученность поведения генома кукурузы в условиях культуры тканей *in vitro*, особенно при длительном культивировании. Несмотря на обширность данных, демонстрирующих значительный размах изменчивости в культивируемых тканях растений на цитогенетическом уровне, результаты исследований геномных перестроек на молекулярном уровне в научной литературе представлены гораздо хуже. В частности, на кукурузе такие исследования крайне немногочисленны [5, 6]. Поэтому целью данной работы было исследование геномной изменчивости в каллусных тканях кукурузы в процессе культивирования.

### **Материалы и методы**

В работе были использованы интактные растения и полученные из них каллусные ткани чистой линии кукурузы Black Mexican Sweet Corn C456 (по классификации ВИР; в дальнейшем – C456) из коллекции Института физиологии растений и генетики НАН Украины. В качестве эксплантов использовали двухнедельные незрелые зародыши длиной 1,5–2 мм. Среда для культивирования содержала макро- и микросоли по Мурасиге и Скугу [7], 7,7 мг/л глицина, 1,25 мг/л никотинамида, 0,25 мг/л тиамина, 0,25 мг/л пиридоксина, 0,25 мг/л Са-пантотената,

2 мг/л 2,4-Д, 30 г/л сахарозы, 100 мг/л мезоинозита, 1 г/л аспарагина, 8 г/л агара. pH до автоклавирования 5,7. Полученные каллусные ткани переносили на свежую питательную среду через каждые 30 дней и выращивали в темноте при 25 °С.

ДНК выделяли по модифицированной методике [8]. Концентрацию и гомогенность препаратов ДНК оценивали визуально по интенсивности свечения комплексов бромистого этидия с ДНК в ультрафиолетовых лучах после электрофореза в 1,5% агарозном геле относительно контроля с известной концентрацией (ДНК бактериофага λ).

Реакционная смесь для полимеразной цепной реакции (ПЦР) объемом 20 мкл содержала 1 × ПЦР-буфер, 2,5 мМ MgCl<sub>2</sub> (“Медбиосервис”, Киев, Украина) 0,2 мМ каждого dNTP, 1 ед. Taq-полимеразы (“Амплисенс”, Москва, РФ) 0,25 мМ праймера (“Литех”, Москва, РФ), 20 нг анализируемой ДНК. На реакционную смесь наслаивали 20 мкл минерального масла. В пробирку с отрицательным контролем вместо ДНК добавляли 2 мкл воды. ПЦР проводили по следующей программе: 1 цикл: денатурация 94 °С/2 мин; 5 циклов: денатурация 94 °С/30 с, отжиг 38 °С/30 с, элонгация 72 °С/1 мин; 35 циклов: денатурация 94 °С/20 с, отжиг 38 °С/20 с, элонгация 72 °С/40 с; 1 цикл: элонгация 72 °С/2,5 мин. Было использовано 38 случайных десятинуклеотидных праймеров (табл. 1). Продукты реакции разделяли в 1,5% агарозном геле с бромистым этидием в 1 × ТВЕ-буфере, напряженность электрического поля 2 В/см. Реакцию с каждым праймером повторяли дважды.

Полиморфизм спектров ампликонов оценивали при помощи программы POPGENE 1.31 [9]. Полученные

данные были представлены в виде таблицы бинарных данных, где наличие или отсутствие ампликона обозначалось соответственно 1 или 0. Дендрограммы генетических расстояний между анализируемыми объектами построены с использованием программы MEGA 3.1 [10].

### Результаты и обсуждение

Проведенные исследования показали, что все использованные в RAPD-анализе праймеры обеспечивали синтез ампликонов, количество которых в зависимости от праймера варьирова-

ла от 1 до 12, а длина – от 200 до 2000 п.н. Названия и характеристики использованных праймеров приведены в табл. 1.

При помощи RAPD-ПЦР анализировали ДНК интактных растений и каллусных тканей кукурузы линии С456, которые культивировали в условиях *in vitro* на протяжении различного срока, а именно: 2, 6, 9 и 15 месяцев. Полиморфные ампликоны выявили 2 из 38 использованных праймеров (5,26% от общего числа праймеров): А-20 и В-04. Всего было получено 264 ампликона, из которых 3 (1,14% от общего числа ампликонов) оказались полиморф-

**Таблица 1.** Праймеры, использованные для RAPD-анализа геномной изменчивости в культуре тканей кукурузы линии С456

Название праймера	Последовательность нуклеотидов (5'-3')	Количество ампликонов общее/ полиморфные	Название праймера	Последовательность нуклеотидов (5'-3')	Количество ампликонов общее/ полиморфные
A-01	CAGGCCCTTC	7/0	B-03	CATCCCCCTG	1/0
A-02	TGCCGAGCTG	6/0	B-04	GGA CTGGAGT	10/2
A-03	AGTCAGCCAC	5/0	B-05	TGCGCCCTTC	6/0
A-04	AATCGGGCTG	7/0	B-06	TGCTCTGCC	10/0
A-09	GGGTAACGCC	8/0	B-07	GGTGACGCAG	8/0
A-12	ATCGCACACT	4/0	B-08	GTCCACACGG	8/0
A-13	CAGCACCCAC	4/0	G-1	CCTGTTAGCC	3/0
A-14	TCTGTGCTGG	6/0	M-06	CTGGGCAACT	5/0
A-15	TCGGCGATAG	9/0	M-07	CCGTGACTCA	11/0
A-16	AGCCAGCGAA	3/0	M-14	AGGGTCGTTC	10/0
A-17	GACCGCTTGT	5/0	NO-15	CAGCGACTGT	7/0
A-18	AGGTGACCGT	14/0	OPA-02	TGCCGAGCTG	12/0
A-19	CAAACGTCGG	7/0	OPA-04	AGTCAGCCAC	9/0
A-20	GTTGCGATCC	7/1	OPC-09	CTCACCGTCC	8/0
Ag-1	AGGTCACTGA	5/0	QR-1	CGGTCACTGT	10/0
АН-29	TGGTGACTGA	6/0	QR-5	CGGCCCGGC	7/0
АН-30	TGGTCACTGT	5/0	340	GAGAGGCACC	7/0
B-01	GTTTCGCTCC	7/0	450	CGGAGAGCCC	9/0
B-02	TGATCCCTGG	3/0	474	AGGCGGGAAC	6/0

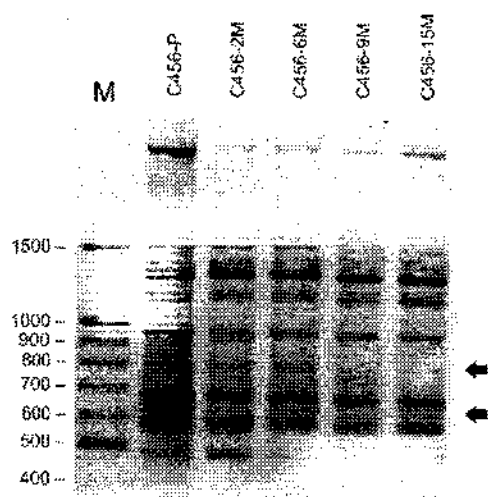
**Примечание:** \* – праймеры, использованные в работе [5].

ными. Полиморфизм проявлялся в виде отсутствия в спектрах каллусных тканей фрагментов, характерных для интактного растения. Так в спектре полученных с использованием праймера А-20 ПЦР-продуктов обнаружен ампликон размером ~910 п.н., который не детектировался в образцах ДНК, полученной из культуры тканей возрастом 2 и более месяцев. Среди фрагментов ДНК, амплифицированных с праймером В-04, выявлены два фрагмента, длиной ~610 п.н., не выявлявшийся в спектрах ампликонов каллусных тканей возрастом 2 и более месяцев, и длиной ~800 п.н., отсутствовавший у культур возрастом 9 и 15 месяцев (рис. 1).

На основе полученных данных рассчитаны генетические расстояния и генетическая идентичность по Nei [11] (табл. 2) и построена дендрограмма генетических расстояний между исследуемыми объектами (рис.2).

Объекты на дендрограмме сгруппировались в три кластера: 1 – интактное растение, 2 – каллусы 2-го и 6-го месяца культивирования, 3 – каллусы 9-го и 15-го месяцев культивирования. При этом анализируемые объекты характеризовались высоким генетическим подобием. Так, генетическое расстояние (Gd) между интактным расте-

нием и каллусной тканью 2-го месяца составило 0,0079, а генетическое подобие (Gi) – 0,9922. Наибольшее значение Gd было между интактным растением и каллусной тканью 15-го месяца – 0,0118, Gi – 0,9882. При этом внутри 2 и 3 кластеров Gd между объектами составило 0,0; а Gi 1,0 со-

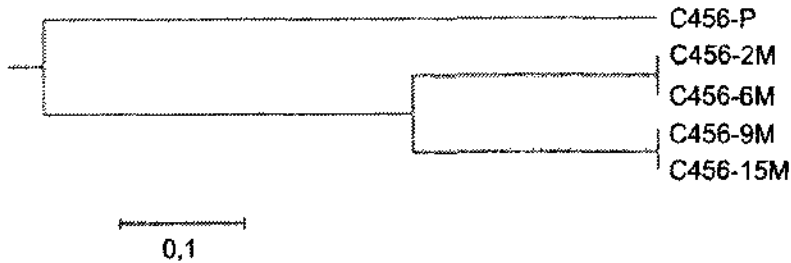


**Рисунок 1.** Спектры RAPD-фрагментов интактного растения и культивируемых тканей кукурузы линии C456, полученные с праймером В-04 М – маркер молекулярных масс, п.н., C456-P – исходное интактное растение, C456-2М – C456-15М – каллусные ткани 2-го – 15-го месяцев культивирования соответственно. Полиморфные в культуре тканей фрагменты обозначены стрелками.

**Таблица 2.** Генетическая идентичность (Gi) и генетические расстояния (Gd) по Nei [11] между интактным растением и каллусными тканями кукурузы линии C456. Обозначения как на рис. 1.

Объект	C456-P	C456-2M	C456-3M	C456-9M	C456-15M
C456-P		0,9922	0,9922	0,9882	0,9882
C456-2M	0,0079		1,0000	0,9961	0,9961
C456-3M	0,0079	0,0000		0,9961	0,9961
C456-9M	0,0118	0,0039	0,0039		1,0000
C456-15M	0,0118	0,0039	0,0039	0,0000	

**Примечание:** над чертой Gi, под чертой Gd.



**Рисунок 2.** Дендрограмма генетических расстояний между интактным растением и культивируемыми тканями кукурузы линии С456. Обозначения как на рис. 1.

ответственно. Gd между 2 и 3 кластером – 0,0039; Gi – 0,9961.

При анализе полученных результатов следует отметить, что в данной работе каллусные ткани получали из незрелых зародышей, взятых из початков нескольких растений кукурузы. Таким образом, не исключено, что выявленный в культуре тканей полиморфизм продуктов ПЦР в определенной степени обусловлен внутрелинейной гетерогенностью растений-доноров эксплантов. Для проверки данного предположения был проведен анализ внутрелинейного полиморфизма линии С456. Анализировали 10 индивидуальных растений (исходное растение, использованное при анализе геномной изменчивости каллусных тканей – С456-Р и 9 случайно выбранных растений, обозначенных С456-1 – С456-9) при помощи 10 RAPD-праймеров из числа использованных, среди которых были праймеры, обнаружившие изменения генома в культуре тканей *in vitro*. Результаты анализа представлены в табл. 3. Следует отметить, что внутрелинейной вариабельности по полиморфным в культуре ампликонам не было выявлено (рис. 3).

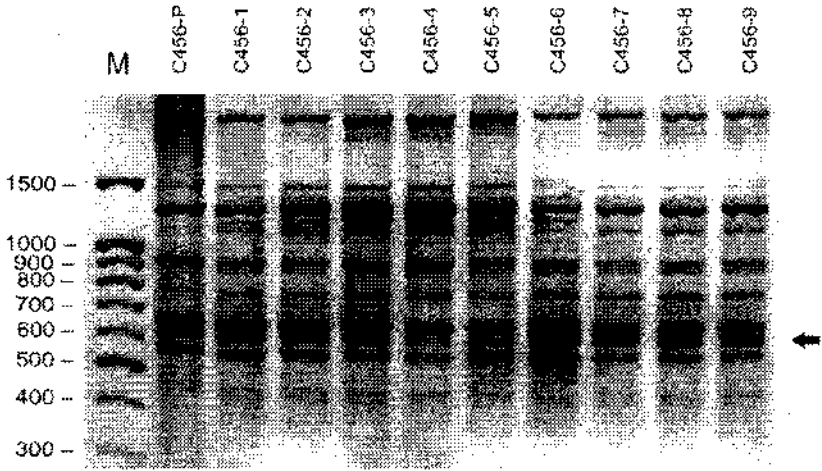
Вместе с тем, продукты амплификации четырех из десяти использованных праймеров (А-01, А-09, А-18, В-01) были полиморфными для анализиру-

**Таблица 3.** Праймеры, использованные для RAPD-анализа внутрелинейной изменчивости кукурузы линии С456

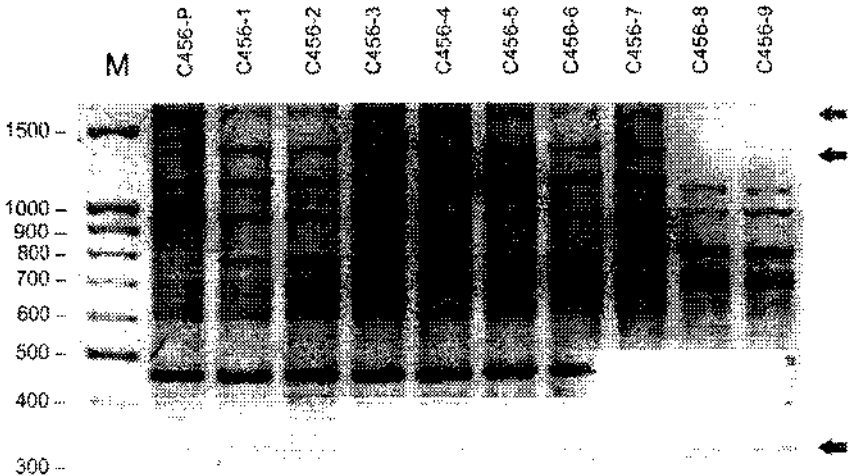
Название праймера	Количество полиморфных ампликонов / объект
А-01	1 / С456-9
А-04	0
А-09	1 / С456-9
А-18	3 / С456-8 и С456-9
А-19	0
А-20	0
АН-29	0
В-01	1 / С456-9
В-04	0
В-06	0

емых растений. Пример полиморфизма фрагментов ДНК отдельных растений линии С-456, амплифицированных с использованием праймера А-18, представлен на рис. 4. Вариабельными оказались растения С456-8 и С456-9, в спектрах ПЦР-фрагментов которых гетерогенность обнаружили 3 и 6 ампликонов из 84 проанализированных, соответственно 3,57% и 7,14% от общего числа. На основании полученных данных были рассчитаны Gd и Gi между индивидуальными растениями (табл. 4) и построена дендрограмма генетических расстояний (рис. 5).





**Рисунок 3.** Спектры RAPD-фрагментов индивидуальных растений кукурузы линии C456, полученные с праймером В-04. Стрелкой обозначен полиморфный в культуре тканей фрагмент. М – маркер молекулярных масс, п.н., C456-P – исходное интактное растение, C456-1 – C456-9 – индивидуальные растения.

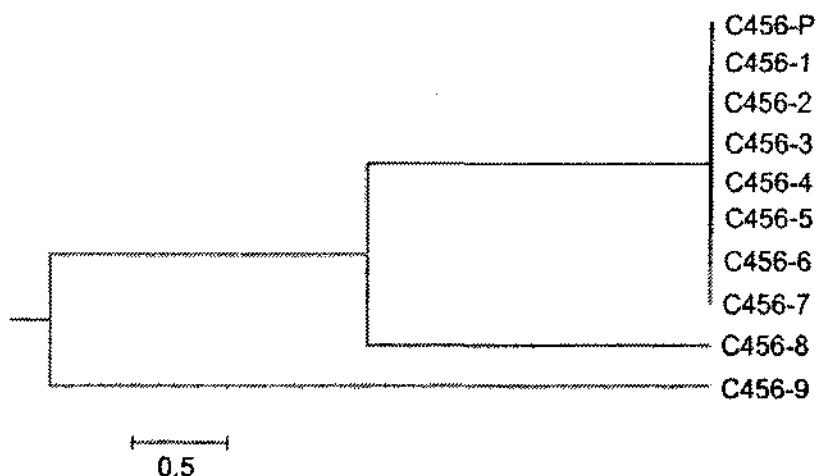


**Рисунок 4.** Спектры RAPD-фрагментов индивидуальных растений кукурузы линии C456, полученные с праймером А-18. Стрелками обозначены полиморфные фрагменты. Обозначения как на рис. 3.

**Таблица 4.** Генетическая идентичность (Gi) и генетические расстояния (Gd) по Nei [11] между индивидуальными растениями линии С456. Обозначения как на рис. 3.

Объект	С456-Р	С456-1	С456-2	С456-3	С456-4	С456-5	С456-6	С456-7	С456-8	С456-9
С456-Р		1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,9643	0,9286
С456-1	0,0000		1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,9643	0,9286
С456-2	0,0000	0,0000		1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,9643	0,9286
С456-3	0,0000	0,0000	0,0000		1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,9643	0,9286
С456-4	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000		1,0000	1,0000	1,0000	0,9643	0,9286
С456-5	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000		1,0000	1,0000	0,9643	0,9286
С456-6	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000		1,0000	0,9643	0,9286
С456-7	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000		0,9643	0,9286
С456-8	0,0364	0,0364	0,0364	0,0364	0,0364	0,0364	0,0364	0,0364		0,9643
С456-9	0,0741	0,0741	0,0741	0,0741	0,0741	0,0741	0,0741	0,0741	0,0364	

**Примечание:** над чертой Gi, под чертой Gd.



**Рисунок 5.** Дендрограмма генетических расстояний между индивидуальными растениями кукурузы линии С456. Обозначения как на рис. 3.

Восемь растений – С456-Р–С456-7 – оказались идентичными по спектрам проанализированных ПЦР-продуктов (Gd = 0,0; Gi = 1,0) и сформировали один кластер. У двух растений из 10 были обнаружены отличия от общей массы. Gd между растением С456-8 и данными объектами составляет 0,0364, Gi – 0,9643. Gd между растением

С456-9 и кластером из восьми растений составляет 0,0741, Gi – 0,9286. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о существовании внутрелинейной гетерогенности среди исследованной выборки растений кукурузы линии С456. Несмотря на то, что нам не удалось обнаружить полиморфизма спектров ампликонов инди-

видуальных растений с использованием праймеров, выявивших изменения в культивируемых тканях, в целом уровень внутрилинейной гетерогенности для линии C456 оказался сопоставимым с уровнем различий, выявленных при анализе культивируемых тканей.

Таким образом, результаты проведенных исследований установили достаточно высокую стабильность генома кукурузы линии C456 в использованных условиях выращивания *in vitro*. Тем не менее, увеличение продолжительности культивирования приводило к росту уровня изменчивости, о чем свидетельствует увеличение генетического расстояния (Gd) между интактным растением и каллусом возрастом 15 месяцев по сравнению со значением этого показателя для более молодых культур. Необходимо отметить, что наши результаты исследования уровня изменчивости генома кукурузы линии C456 в культуре тканей не согласуются с данными других исследователей. Так, Осипова и соавторы [5] показали значительные отличия групп регенерантов, полученных из 2- и 6-месячных каллусных культур линии кукурузы A188, как друг от друга, так и от интактного растения: степень отличия соматклонов от исходной линии варьировала от 6,5% до 23%. Некоторые праймеры, применявшиеся в работе Осиповой и др. [5], в том числе и те, которые обнаружили генетический полиморфизм у соматклонов линии A188, были использованы нами (см. примечание к табл. 1). Однако в культуре тканей линии C456 изменчивости по продуктам данных праймеров не наблюдали. Brown et al. [6] методом ПДРФ также показали значительный полиморфизм в каллусных тканях и соматклонах линии A188.

Различия в уровне выявленной нами и другими авторами соматклональной изменчивости трудно объяснить влиянием компонентов питательных сред, поскольку среды, использованные нами и в работах [5, 6], были достаточно близки по составу. В частности, содержание синтетического ауксина 2,4-Д, который может обладать мутагенным эффектом, в наших опытах (2 мг/л) была сопоставима с таковой в работе Осиповой [5]. Кроме того, Brown et al. выявили, что повышение концентрации 2,4-Д до 8 мг/л не сопровождалось увеличением геномной изменчивости линии A188 в культуре *in vitro* [6]. Следовательно, можно предположить, что такое несогласование результатов обусловлено различиями в стабильности геномов исследованных линий кукурузы в условиях *in vitro*. Однако данное предположение для своего подтверждения требует дополнительных исследований.

При анализе геномов индивидуальных растений линии C456 была выявлена внутрилинейная гетерогенность, которая по размаху сопоставима с геномной изменчивостью в культуре тканей или немного превышает ее. Поскольку наши культуры были получены из незрелых зародышей семян, взятых из початков нескольких растений, не исключено, что обнаруженный в культивируемых тканях кукурузы линии C456 полиморфизм ПЦР-продуктов в определенной степени обусловлен гетерогенностью растительного материала, использованного в качестве эксплантов. Вместе с тем, среди проанализированных растений не было обнаружено полиморфизма по праймерам, выявившим переменные в культуре ампликоны. Данный факт, на наш взгляд, может свидетельствовать о том, что

выявленные отличия являются результатом изменений генома в условиях культуры *in vitro*. В пользу этого предположения говорит и факт сохранения данных изменений при более продолжительном культивировании. Как бы то ни было, уровень геномной изменчивости в каллусных культурах линии С456, пассируемых на протяжении более года, не превышает внутрелинейной гетерогенности для данного генотипа. Сопоставление наших данных с полученными ранее другими авторами на культивируемых тканях кукурузы линии А188 свидетельствует о различной стабильности генотипов кукурузы в культуре *in vitro*, что может иметь важное значение для биотехнологии.

### Выводы

При помощи RAPD-ПЦР анализа культивируемых тканей кукурузы линии С456 показано, что *in vitro* происходят изменения генома, которые обнаруживаются уже на первых этапах культивирования. Увеличение продолжительности культивирования в условиях *in vitro* сопровождается дальнейшими изменениями. Анализ индивидуальных растений линии С456 обнаружил внутрелинейную гетерогенность, которая может вносить определенный вклад в полиморфизм спектров продуктов ПЦР культивируемых тканей. Вместе с тем, внутрелинейной гетерогенности по полиморфным в культуре ампликонам не наблюдали. В целом, обнаруженная в культуре тканей инбредной линии кукурузы С456 изменчивость по размаху не превышает внутрелинейной гетерогенности.

Работа выполнена при финансовой поддержке ДНТП Министерства обра-

зования и науки Украины (проект № 03.02.03/0014128).

Авторы благодарны д-ру Е. С. Осиповой (ИФР РАН) за любезно предоставленные праймеры.

### Список литературы

1. Linacero R., Freitas Alves E., Vázquez A. M. Hot spots of DNA instability revealed through the study of somaclonal variation in rye // *Theor. Appl. Genet.* – 2000. – 100. – P. 506–511.
2. Alves E., Ballesteros I., Linacero R., Vázquez A. M. RYS1, a foible transposon, is activated by tissue culture and shows preferential insertion points into the rye genome // *Theor. Appl. Genet.* – 2005. – 111. – P. 431–436.
3. Кунах В. А. Биотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. – К.: Логос, 2005. – 730 с.
4. Sharma U., Mohan J. S. *In vitro* clonal propagation of *Chlorophytum borivilianum* Sant. et Fernand., a rare medicinal herb from immature floral buds along with inflorescence axis // *Indian J. Exp. Biol.* – 2006. – 44. – P. 77–82.
5. Осипова Е. С., Ковеза О. В., Троицкий А. В., Долгих Ю. И., Шамина З. Б., Гостимский С. А. Выявление специфических фрагментов у соматоклонов кукурузы и создание на их основе SCAR-маркеров // *Генетика.* – 2003. – 39. – № 12. – С. 1664–1672.
6. Brown P. T. H., Gubel E., Lurz H. RFLP analysis of *Zea mays* callus and their regenerated plants // *Theor. Appl. Genet.* – 1991. – 81. – P. 227–232.
7. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant.* – 1962. – 15. – P. 473–497.
8. Rogers S. O., Bendich A. J. Extraction of DNA from milligram amounts of field plant tissues // *Plant Mol. Biol.* – 1985. – 5. – P. 69–76.
9. Yeh F. C., Rongcai Y., Boyle T. 1999. POPGENE. Version 1.31. University of Alberta, Edmonton, Canada.

10. Kumar S., Tamura K., Nei M. MEGA 3: Integrated software for Molecular Evolution Genetics Analysis and sequences alignment // Briefings in Bioinformatics. – 2004. – 5. – P. 150–163.
11. Nei M. Genetic distance between populations // American Naturalist, 1972. V. 106. – P. 283–292.

Представлено М. В. Кучуком  
Поступила 20.01.2006

**ГЕНОМНА МІНЛИВІСТЬ ЛІНІЇ КУКУРУДЗИ  
BLACK MEXICAN SWEET CORN C456 В  
КУЛЬТУРІ ТКАНИН *IN VITRO*: РЕЗУЛЬТАТИ  
RAPD-АНАЛІЗУ**

Д. М. Майданюк, І. О. Андреев, К. В. Спіридонова, Т. М. Чеченева<sup>1</sup>, В. А. Кунах

Інститут молекулярної біології і генетики  
НАН України,  
Україна, Київ, 03143,  
вул. Акад. Заболотного, 150,  
kunakh@imbg.org.ua  
<sup>1</sup>Національний аграрний університет,  
Україна, Київ, 03041, вул. Героїв оборони, 15

Проведено аналіз геномної мінливості кукурудзи лінії Black Mexican Sweet Corn C456 в культурі *in vitro* за допомогою RAPD-ПЛР. Показано, що в культивованих тканинах відбуваються зміни геному, які виявляються вже на перших етапах культивування. Збільшення тривалості культивування в умовах *in vitro* до 15 місяців супроводжується подальшими змінами. Аналіз індивідуальних рослин лінії C456 виявив внутрілінійну гетерогенність, яка може вносити певний внесок у поліморфізм спектрів продуктів ПЛР культивованих тканин. Разом з тим, внутрілінійної гетерогенності за поліморфними в культурі ампліконами не спостерігали. В цілому, виявлена в культурі тканин інбредної лінії кукурудзи C456 мінливість за розмахом не перевищує внутрілінійної гетерогенності. На основі

аналізу отриманих результатів і літературних даних зроблено припущення про різну стабільність в культурі *in vitro* геномів різних ліній кукурудзи.

*Ключові слова:* кукурудза, культура тканин рослин, геномна мінливість, RAPD-аналіз, біотехнологія рослин.

**GENOME VARIABILITY OF MAIZE LINE BLACK MEXICAN SWEET CORN C456 IN TISSUE CULTURE *IN VITRO*: RAPD-ANALYSIS RESULTS**

D. N. Maidanyuk, I. O. Andreev, K. V. Spiridonova, T. N. Checheneva<sup>1</sup>, V. A. Kunakh

Institute of Molecular Biology and Genetics of NAS of Ukraine,  
Ukraine, Kiev, 03143,  
Acad. Zabolotnogo str. 150,  
kunakh@imbg.org.ua  
<sup>1</sup>National Agrarian University,  
Ukraine, Kiev, 03041, Heroiv oborony str., 15

Genome variability in tissue culture of maize line Black Mexican Sweet Corn C456 has been assayed by RAPD-PCR. Genome changes in cultured tissues were shown to occur as being expressed at the very early steps of culturing. Increase in terms of tissue maintenance *in vitro* up to 15 months seems to be accompanied by further changes. Screening of individual plants of C456 line revealed intraline heterogeneity which may to some extent contribute to polymorphism in tissue culture PCR-product patterns. At the same time, intraline heterogeneity by amplicons being polymorphic in culture failed to be displayed. In general, variability in tissue culture of inbred C456 maize line was within the range of the intraline heterogeneity. Based on the results obtained and literature data the suggestion as to various genome stability of different maize lines in culture was made.

*Key words:* maize, plant tissue culture, genome variability, RAPD-analysis, plant biotechnology.

УДК 616-056.7-053.2-07

## ВИЗНАЧЕННЯ ХІТОТРИОЗИДАЗНОЇ АКТИВНОСТІ В ПЛАЗМІ КРОВІ ЯК КРИТЕРІЙ ПІДТВЕРДЖУЮЧОЇ ДІАГНОСТИКИ ХВОРОБИ ГОШЕ

Н. Г. ГОРОВЕНКО<sup>1</sup>, А. М. НЕДОБОЙ<sup>2</sup>, Н. В. ОЛЬХОВИЧ<sup>2</sup>, Т. П. ІВАНОВА<sup>2</sup>,  
О. М. КОЧНЕВА<sup>2</sup>, Н. О. ПІЧКУР<sup>1</sup>, І. С. ГРЕГУЛЬ<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Кафедра медичної генетики КМАПО ім. П. Л. Шупика,  
Україна, 04112, м. Київ, вул. Дорогожицька, 9,  
тел. (044) 205-90-27, 205-48-13

<sup>2</sup>Українська дитяча спеціалізована лікарня "ОХМАТДИТ",  
Україна, 01135, м. Київ, вул. Чорновола 28/1,  
факс (044) 236-61-65, тел.(044) 236-69-42

*Дискутуються проблеми підбору діагностичних критеріїв щодо остаточного встановлення діагнозу хвороба Гоше. Одному з 28 пацієнтів з попереднім діагнозом хвороби Гоше діагноз не було підтверджено завдяки біохімічному визначенню хітотриозидазної активності в плазмі крові. Обґрунтовується необхідність комплексного підходу до діагностики цієї патології з урахуванням різних клінічних, морфологічних та біохімічних методів.*

*Ключові слова: Хвороба Гоше, хітотриозидазна активність, клітини Гоше, глюкоцереброзидазна активність, діагностичні критерії, біохімічні методи, фермент-замісна терапія*

**Вступ.** Хвороба Гоше (ХГ) (MIM 230800) – це спадкова лізосомна хвороба накопичення з аутосомно-рецесивним успадкуванням, обумовлена мутацією в гені, що контролює синтез ферменту глюкоцереброзидази ( $\beta$ -глюкозидази). Функція цього ферменту полягає в гідролізі глюкозилцераміду до глюкози та цераміду [1]. Дефіцит ферментативної активності глюкоцереброзидази призводить до накопичення патологічного метаболіту глюкозилцераміду в лізосомах клітин, переважно макрофагів, внаслідок чого порушується їх функція і виникає полісистемне захворювання, основними клінічними ознаками якого є гепатоспленомегалія, панцитопенія, ураження кісткової тканини.

В залежності від віку початку та тяжкості клінічного перебігу захворювання виділяють три основні типи ХГ: 1 – не нейропатичний, 2 – гострий нейропатичний та 3 – хронічний нейропатичний [2]. Ця хвороба має панетнічне поширення. Частота розповсюдженості ХГ в більшості популяцій становить 1 : 40000 та 1 : 60000 за виключенням євреїв

© Н. Г. ГОРОВЕНКО, А. М. НЕДОБОЙ, Н. В. ОЛЬХОВИЧ, Т. П. ІВАНОВА та інші, 2006

Ашкеназі, серед яких ця патологія зустрічається з частотою 1 : 850 [3].

В 1991 році в практику охорони здоров'я було впроваджено один з перших методів лікування лізосомних хвороб накопичення – замісну ферментотерапію ХГ, при якій відновлювався нормальний метаболізм організму, зменшувались клінічні прояви захворювання і досягалась повна, або часткова реабілітація хворих, при цьому ефективність терапії залежить від ранньої діагностики захворювання та своєчасного початку лікування пацієнтів [4, 8].

Діагностика ХГ базується на клінічному обстеженні, виявленні характерної морфологічної ознаки захворювання – клітин Гоше в біоптаті кісткового мозку, визначенні клініко-лабораторних та біохімічних показників крові, молекулярно-генетичному тестуванні на наявність мутацій в гені глюкоцереброзидази. Найбільш інформативним підтверджуючим методом діагностики вважається біохімічне визначення глюкоцереброзидазної активності в гомогенаті лейкоцитів. Але в разі поєднання пограничних значень глюкоцереброзидазної активності та нетипових клінічних ознак виникають певні труднощі в інтерпретації отриманих результатів [12]. Отже виникає питання щодо пошуку допоміжних діагностичних критеріїв для вчасного встановлення діагнозу.

Як один з допоміжних критеріїв діагностики ХГ було запропоновано визначення ферментативної активності хітотриозидази в плазмі крові. Хітотриозидаза – це функціональна хітиназа з високою схожістю до хітиназ з сімейства глікозигідролаз, яка виявляється у різноманітних біологічних видів. Вважається, що хітотриозидаза – це фермент, який секретується активованими макрофагами і бере участь у деградації

патогенів, що містять хітин [13]. Багаторазове збільшення хітотриозидазної активності є наслідком процесу накопичення патологічних метаболітів в цих клітинах [8, 9, 12]. Активність хітотриозидази у пацієнтів з ХГ, як правило, збільшується в десятки і сотні разів, порівняно з верхніми межами в контрольному матеріалі [11, 12, 15].

Мета нашої роботи полягала у дослідженні можливості використання визначення хітотриозидазної активності плазми крові для підвищення точності діагностики ХГ.

### **Матеріали і методи**

Досліджену нами групу склали 28 пацієнтів (9 осіб чоловічої та 19 осіб жіночої статі) з різних регіонів України, які в період з 2000 по 2006 рр. були направлені до Української дитячої спеціалізованої лікарні "ОХМАТДИТ" міста Києва з попереднім діагнозом хвороби Гоше. Всі пацієнти були обстежені лікарем-генетиком, педіатром, ортопедом, гематологом, неврологом та іншими вузькими спеціалістами. Хворобу Гоше у цих пацієнтів було запідозрено на підставі комплексу клінічних та морфологічних досліджень.

Для проведення біохімічних досліджень лейкоцити з цільної крові виділяли за стандартною процедурою [16]. Відмитий лейкоцитарний осад ресуспендували у деіонізованій воді. Обов'язкове руйнування клітин на льоду проводили шляхом триразової обробки ультразвуковим гомогенізатором SONOPULS (Bandelin). Загальну кількість білка в лейкоцитах визначали за стандартним методом Лоурі [7].

Для визначення глюкоцереброзидазної активності в лізаті лейкоцитів використовували флюорогенний суб-

страт 4-метилумбеліферил (МУФ)- $\beta$ -D-глюкозиду (Sigma) (5 мМ 4-МУФ- $\beta$ -D-глюкозид в 0,2М цитрат-фосфатному буфері з рН 5,4, який містив 0,5% таурохолата натрію та 0,4% тритону X-100). Реакційна суміш складалась з 20 мкл розчину субстрату та 20 мкл лізату лейкоцитів з розрахунку на 30 мкг білка. Реакцію проводили протягом однієї години при 37 °С та зупиняли додаванням 0,2 М NaOH-гліцинового буфера, рН 10,6.

Хітотриозидазну активність в плазмі визначали за деградацією флюорогенного субстрату 4-метилумбеліферил (МУФ)-триацетилхітотриозиду (Sigma). В якості субстрату використовували 22 мкМ 4-МУФ-триацетилхітотриозид в цитратфосфатному буфері рН 5,2. Реакційна суміш містила 5 мкл плазми та 100 мкл 22 мкМ 4-МУФ-триацетилхітотриозиду в цитратфосфатному буфері рН 5,2. Інкубацію зразків проводили при 37 °С протягом 1 години. Реакцію зупиняли 1,0 мл 0,25 М NaOH-гліцинового буфера, рН 10,4. В якості стандартного розчину для обох ферментів використовували 500 мкМ 4-метилумбеліферон (Sigma). Флюоресценцію звільненого 4-метилумбеліферону вимірювали за допомогою багатофункціонального аналізатора Victor (Wallac Oy) при довжині хвилі збудження 365 нм та емісії 448 нм. Оцінка результатів для глюкоцереброзидазної активності наводилась у нмоль/год/мг білка, для хітотриозидазної активності – нмоль/год/мл плазми.

### Результати та обговорення

Вік пацієнтів з досліджуваної нами групи складав від 9 місяців до 51 року. У пацієнтів групи пошуку відмічались схожі клінічні ознаки, а саме: значне

збільшення розмірів селезінки та печінки, анемія, тромбоцитопенія, кісткові болі. Всім їм на підставі характерної клінічної картини та наявності клітин Гоше попередньо було виставлено діагноз хвороби Гоше. Для остаточного підтвердження діагнозу ці пацієнти були направлені до лабораторії медичної генетики медико-генетичного центру УДСЛ "ОХМАТДИТ" для встановлення біохімічного дефекту, а саме визначення глюкоцереброзидазної активності лейкоцитів крові.

У більшості пацієнтів (57%) маніфестація клінічних проявів ХГ припадала на вік 3–8 років, в 32% випадків хвороба маніфестувала до 3-х років, і лише в 11% випадків – у віці більше 8 років. Початковими клінічними симптомами захворювання були гепатоспленомегалія (52%), первинні ознаки панцитопенії (32%), кісткові кризи (16%). На таблиці 1 представлено результати біохімічного дослідження глюкоцереброзидазної активності лейкоцитів периферичної крові у пацієнтів групи пошуку.

Раніше нами було встановлено нормальні показники  $\beta$ -глюкозидазної активності лейкоцитів для української популяції, що склала  $7,2 \pm 2,1$  нмоль/год/мг білка, тобто нижнє граничне значення нормальної активності (M-3 $\sigma$ ) становить 5,1 нмоль/год/мг білка [14].

З таблиці 1 видно, що найменше значення глюкоцереброзидазної активності у групі пацієнтів зі встановленим діагнозом ХГ було 0,2 нмоль/год/мг білка, а найвище – 6,2 нмоль/год/мг білка. Якщо вважати за нижнє граничне значення нормальної активності ферменту 5,1 нмоль/год/мг білка (M-3 $\sigma$ ), то діагноз ХГ міг бути встановлений пацієнтам лише у випадках, коли активність ферменту не перевищувала 5,0 нмоль/год/мг білка.



**Таблиця 1.** Глюкоцереброзидазна активність лейкоцитів периферичної крові у пацієнтів з хворобою Гоше

Пацієнти	Вік на момент дослідження (роки)	$\beta$ -глюкозидазна активність (нмоль/год/мг білка)
Д. І.	10	3,2
Н. Т.	13	2,2
С. М.	14	3,4
Г. А.	9	2,9
В. В.	13	6,2
М. В.	5	0,9
Р. В.	3	0,2
Н. Я.	27	3,5
М. Д.	8	2,9
М. М.	14	1,1
Л. Л.	10	1,58
Б. Л.	15	1,5
З. А.	9	5,6
К. Н.	10	2,1
Л. Р.	18	4,2
Б. К.	10	2,6
П. Р.	3	3,6
М. С.	12	4,2
Д. Т.	51	1
К. Л.	24	2,6
Б. І.	21	1,8
П. С.	10	5,5
М. О.	33	1,7
К. О.	33	2,7
О. А.	16	1,2
С. О.	4	3,9
Ю. О.	2	3,5
К. В.	10	3,3

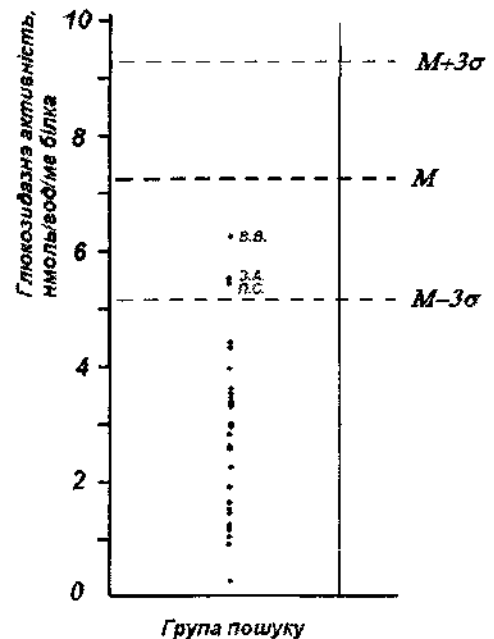
У 25 пацієнтів глюкоцереброзидазна активність була меншою ніж 5,0 нмоль/год/мг білка. Враховуючи типову клінічну картину захворювання, наявність клітин Гоше, знижену  $\beta$ -глюкозидазну активність цим особам було підтверджено діагноз ХГ.

Три пацієнти з дослідженої нами групи (В.В., З.А., та П.С.) продемонст-

рували залишкову глюкоцереброзидазну активність, яка перевищувала 5, 1 нмоль/год/мг білка. Всі вони мали схожі клінічні ознаки, як і при ХГ (гепато- та спленомегалія, панцитопенія, наявність періодичних кісткових кризів). У двох пацієнтів (З.А. та П.С.) Гоше-подібні клітини були знайдені в аспіратах кісткового мозку, у пацієнта В.В. такі клітини виявлені лише на морфологічних препаратах після спленектомії.

Схематичне зображення розподілу значень глюкоцереброзидазної активності лейкоцитів периферичної крові пацієнтів групи пошуку представлено на рис. 1.

З рис. 1 видно, що глюкоцереброзидазна активність у цих трьох пацієнтів знаходиться в ділянці нормальних значень, тобто висока глюкоцеребрози-



**Рисунок 1.** Розподіл значень глюкоцереброзидазної активності групи пошуку. М – середнє значення глюкоцереброзидазної активності лейкоцитів периферичної крові в контрольному матеріалі.

дазна активність в гомогенаті лейкоцитів ставила під сумнів наявність у них ХГ. Проте типова клінічна картина та наявність Гоше-подібних клітин не дозволяла остаточно зняти цей діагноз.

Невідповідність отриманих значень  $\beta$ -глюкозидазної активності та даних інших обстежень спонукала нас до пошуку інших біохімічних діагностичних маркерів для діагностики ХГ.

З цією метою нами було проведено визначення хітотриозидазної активності плазми крові в двох групах осіб. До першої групи увійшли пацієнти зі встановленим діагнозом ХГ, глюкоцереброзидазна активність яких становила менш ніж 5,1 нмоль/год/мг білка. Другу групи склали здорові донори з різних регіонів України, які добровільно брали участь у дослідженні.

На діаграмі логарифмічного розподілу хітотриозидазної активності, що представлена на рис. 2, видно, що межі хітотриозидазної активності у пацієнтів з ХГ суттєво відрізняються від рівня активності в контрольному матеріалі. Крім того, ділянки значення цього показника у двох обстежених нами групах взагалі не перекриваються, що значно полегшує інтерпретацію результатів досліджень.

Нормальні значення хітотриозидазної активності плазми крові знаходяться в межах від 0 до 150 нмоль/год/мл плазми [10]. Слід зазначити, що визначення хітотриозидазної активності може виступати тільки як допоміжний критерій діагностики ХГ, тому що збільшення цього показника зустрічається також при інших патологічних станах [11]. Але тільки при ХГ активність хітотриозидази збільшується в сотні, а іноді в тисячі разів [4, 9, 12]. Тому пацієнтам В.В., З.А та П.С., у яких була висока залишкова глюкоцереброзидазна активність, проведено визначення хітотриозидазної активності в плазмі крові (табл. 2).

На діаграмі логарифмічного розподілу хітотриозидазної активності, що представлена на рис. 2, видно, що межі хітотриозидазної активності у пацієнтів з ХГ суттєво відрізняються від рівня активності в контрольному матеріалі. Крім того, ділянки значення цього показника у двох обстежених нами групах взагалі не перекриваються, що значно полегшує інтерпретацію результатів досліджень.

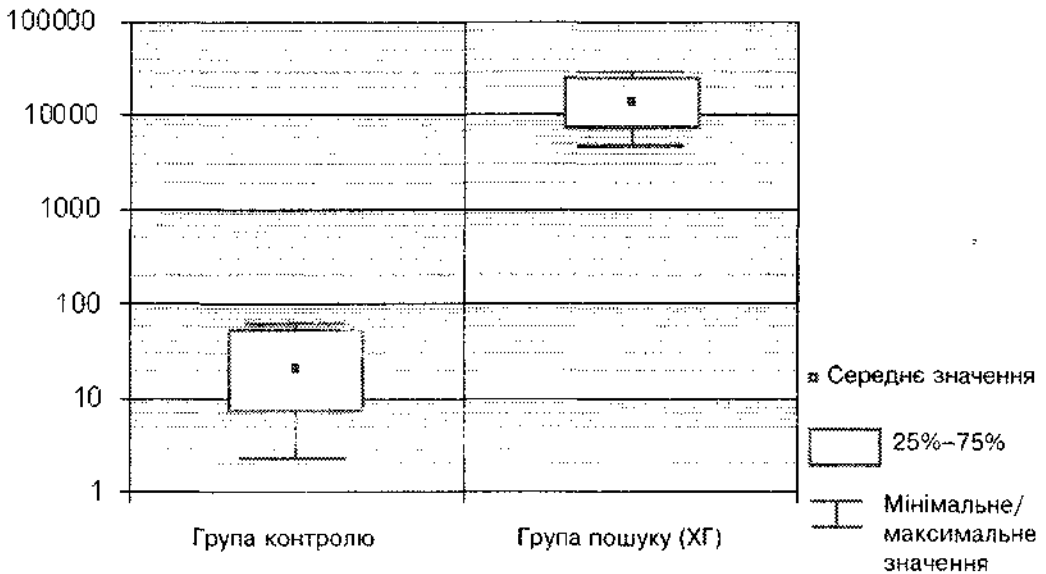


Рисунок 2. Хітотриозидазна активність плазми крові пацієнтів з ХГ та здорових донорів.

**Таблиця 2.** Хітотриозидазна активність плазми крові у пацієнтів З.А., П.С. та В.В.

Пробанд	Глюкоцереброзидазна активність гомогенату лейкоцитів (нмоль/год/мг білка)	Хітотриозидазна активність плазми крові (нмоль/год/мл плазми)
В.В.	6,2	27 404
З.А.	5,6	7516
П.С.	5,5	55
Контроль	7,2 ± 2,1	0–150

Отримані результати дозволили на підставі комплексу клінічних, морфологічних та біохімічних досліджень зробити висновок, що двом пацієнтам (В.В. та З.А.) із значним підвищенням хітотриозидазної активності можна підтвердити діагноз ХГ. У пацієнта П.С. хітотриозидазна активність зберігалась в межах нормальних значень тобто діагноз ХГ не був підтверджений. Таким чином, визначення хітотриозидазної активності допомогло уникнути хибнопозитивного діагнозу ХГ пацієнтові П.С., незважаючи на типові клінічні та морфологічні дані.

Хоча хвороба Гоше і відноситься до рідкісних спадкових захворювань, але є досить поширеною серед метаболічних хвороб [15]. Вона характеризується високою генетичною гетерогенністю з вираженим клінічним поліморфізмом та займає одне з провідних місць серед лізосомних хвороб накопичення. ХГ – це тяжке інвалідизуюче захворювання, що нерідко призводить до летальних наслідків. Ефективне лікування цієї патології має високу вартість, тому хибнопозитивні результати діагностики ХГ можуть викликати невикористані фінансові витрати, тоді як хибно негативні призведуть до прогресування хвороби і незворотніх наслідків. Клітини Гоше, які є характерною морфологічною ознакою

ХГ, можна виявити в аспіратах кісткового мозку, або виключно в тканині селезінки. Проте, подібні клітини виявляють і при інших патологічних станах організму [9, 5]. Недостатня глюкоцереброзидазна активність гомогенату лейкоцитів вказує на наявність захворювання, але виявлення досить високої залишкової активності ускладнює інтерпретацію результатів. Тому діагностика повинна базуватись на певному алгоритмі застосування різних методів дослідження для підтвердження діагнозу ХГ. Підвищення хітотриозидазної активності є результатом накопичення патологічних продуктів в клітинах організму. Крім того, і це відображено в багатьох працях, існує певний взаємозв'язок між ступінню ураження органів і тканин та рівнем хітотриозидазної активності плазми, що і обумовлює використання цього біохімічного маркера ще і для моніторингу стану хворих та ефективності фермент-замісної терапії [5, 6, 9].

### **Висновки**

Біохімічне визначення глюкоцереброзидазної активності гомогенату лейкоцитів не завжди дозволяє остаточно підтвердити діагноз ХГ навіть при наявності клінічних та морфологічних ознак цього захворювання. Дослідження рівня хітотриозидазної активності плазми крові виступає як допоміжний критерій біохімічної діагностики ХГ. Таким чином, остаточно підтвердження діагнозу ХГ можливе тільки за умови оцінки всього комплексу діагностичних методів – клінічних, морфологічних та біохімічних, враховуючи визначення хітотриозидазної активності плазми крові.

Роботу виконано в лабораторії медичної генетики медико-генетичного центру УДСЛ "ОХМАТДИТ" акредито-

ванюю МОЗ України на право проведення вимірювань у сфері охорони здоров'я.

Робота захищена патентом на винахід в Україні "Спосіб діагностики хвороби Гоше" № 63743А, дата видачі 15.01.04 р.

### Перелік літератури

1. Басистова А. А., Ланга И. Н., Смирнова Г. В. Современный взгляд на лизосомальные болезни и болезнь Гоше // Педиатрия. – 1999. – № 4. – С. 90–93.
2. Богатырева Р. В., Здыбская Е. П. Ранняя диагностика некоторых форм лизосомных болезней накопления // Український вісник психоневрології. – 1999. – 7. – Вип 3(21). – С. 44–46.
3. Barranger J. A., O'Rourke E. Lessons learned from the development of enzyme therapy for Gaucher disease // J. Inherit. Metab. – 2001. – 24. – P. 89–96.
4. Beutler E., Grabowski G. A. Gaucher disease. In The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Diseases / Ed. C. R. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly, D. Valle. – New York: McGraw-Hill. – 2001. – P. 3635–3668.
5. Cormand B., Grinberg D., Gort A., Chabas A., Vilageliu L. Molecular Analysis and Clinical Findings in the Spanish Gaucher Disease Population: Putative Haplotype of the N370S Ancestral Chromosome // Hum. Mut. – 1998. – 11. – P. 295–305.
6. Cox T. M. Gaucher disease: understanding the molecular pathogenesis of sphingolipidoses // J. Inherit. Metab. Dis. – 2001. – 24. – (Suppl. 2). – P. 106–121.
7. Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К. Справочник биохимика, М.: Мир, 1991. – 543 с.
8. Grabowski G. A., Hopkin Robert J. Enzyme therapy for lysosomal storage disease: Principles, Practice, and Prospects // Annu. Rev. Genomics Hum. Genet. – 2003. – 4. – P. 403–436.
9. Grabowski G. A., Leslie N., Wenstrup R. J. Enzyme therapy in Gaucher disease: the first five years. Blood Rev. – 1998. – 12. – P. 115–133.

10. Guo Y., He W., Boer A. M. et al. Elevated plasma chitotriosidase activity in various lysosomal storage disorders // J. Inher. Metab. Dis. – 1995. – 18. – P. 717–722.
11. Young E., Chatterton C. et al. Plasma chitotriosidase activity in Gaucher disease patients who have been treated either by bone marrow transplantation or by enzyme replacement therapy with alglucerase // J. Inher. Metab. Dis. – 1997. – 20. – P. 595–602.
12. Короленко Т. А. и др. Хитотриозидаза как маркер макрофагальной стимуляции // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2000. – 130, № 10. – С. 948–950.
13. Suzuki K. Enzymic Diagnosis of Sphingolipidoses // Methods in Enzymology. – 50. – Academic Press: New York, San-Francisco, London. – 1978. – P. 475–480.
14. Недобой А. М., Ольхович Н. В., Горovenko Н. Г. Особливості біохімічної діагностики хвороби Гоше на сучасному етапі // Збірник наук.праць співроб. КМАПО ім. П. Л. Шупика. – Київ, 2004. – 356 с.
15. Sidransky E., Tayebi N., Ginnes E. I. Diagnosing Gaucher disease // Clinical Pediatrics. – 1995. – 34, № 7. – P. 365–371.
16. Wenger D. A., Williams C. Screening for lysosomal disorders // Techniques in Diagnostics of Human Biochemical Genetics. – Wiley-Liss: New York. – 1991. – P. 587–619.

Представлено Л. Л. Лукаш  
Надійшла 10.02.2006

### ОПРЕДЕЛЕНИЕ ХИТОТРИОЗИДАЗНОЙ АКТИВНОСТИ В ПЛАЗМЕ КРОВИ КАК КРИТЕРИЙ ПОДТВЕРЖДАЮЩЕЙ ДИАГНОСТИКИ БОЛЕЗНИ ГОШЕ

Н. Г. Горovenko<sup>1</sup>, А. Н. Недобой<sup>2</sup>, Н. В. Ольхович<sup>2</sup>, Т. П. Иванова<sup>2</sup>, О. Н. Кочнева<sup>2</sup>,  
Н. А. Пичкур<sup>1</sup>, И. С. Грегуль<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Кафедра медицинской генетики КМАПО им. П. Л. Шупика, Украина, 04112, г. Киев, ул. Дорогожицкая, 9, тел. (044) 205-90-27, 205-48-13

Украинская детская специализированная  
больница "ОХМАТДЕТ",  
Украина, 01135, г. Киев,  
ул. Черновола 28/1,  
факс (044) 236-61-65, тел. (044) 236-69-42

Обсуждаются проблемы подбора диагностических критериев для остаточной постановки диагноза болезнь Гоше. Из 28 пациентов, с предварительно установленным диагнозом болезнь Гоше, путем определения показателя хитотриозидазной активности, одному пациенту диагноз не подтвержден. Обосновывается необходимость комплексного подхода к диагностике этой патологии с учетом разных клинических, морфологических и биохимических методов.

**Ключевые слова:** Болезнь Гоше, хитотриозидазная активность, клетки Гоше, глюкоцереброзидазная активность, диагностические критерии, биохимические методы, фермент-заместительная терапия.

**ESTIMATION OF CHITOTRIOSIDASE ACTIVITY IN OF PLASMA FOR CORRECT DIAGNOSIS OF GAUCHER DISEASE**

N. Gorovenko<sup>1</sup>, A. Nedoboy<sup>2</sup>, N. Oikhovich<sup>2</sup>, T. Ivanova<sup>2</sup>, O. Kochneva<sup>2</sup>, N. Pichkur<sup>1</sup>, I. Hrehul<sup>2</sup>

Kyiv Medical Academy of Postdiploma Education,

<sup>1</sup>Ukraine, 04112, Kyiv, Dorogozhycka str., 9, tel.: (044) 205-90-27, 205-48-13

<sup>2</sup>Ukrainian Children Hospital "OKHMATDET", Ukraine, 01135, Kyiv, Chernovola str. 28/1, fax: (044) 236-61-65, 236-12-76

The criteria of correct diagnosis of Gaucher disease are discussed. We propose to estimate the chitotriosidase activity in plasma for decrease the misdiagnosis. By this way the Gaucher disease was not definite for one of 28 patients with Gaucher-like clinical and morphological sings.

**Key words:** Gaucher disease, chitotriosidase activity, biochemical diagnostics, enzyme replacement therapy.

УКД 630\*12:582.632.2.746.5

## **ОСОБЛИВОСТІ МІКРОКЛОНАЛЬНОГО РОЗМНОЖЕННЯ ДУБА ЗВИЧАЙНОГО (*QUERCUS ROBUR L.*), КЛЕНІВ ГОСТРОЛИСТОГО (*ACER PLATANOIDES L.*) ТА ПСЕВДОПЛАТАНОВОГО (*ACER PSEUDOPLATANUS L.*)**

А. П. ПІНЧУК, О. Ю. ЧОРНОБРОВ

Національний аграрний університет,  
лабораторія фітовірусології і біотехнології,  
Україна, 03041, м. Київ, вул. Героїв оборони, 15,  
virlab@nauu.kiev.ua

*Розглянуто питання, пов'язані з особливостями мікроклонального розмноження дуба звичайного (*Quercus robur L.*), кленів гостролистого (*Acer platanoides L.*) та псевдоплатанового (*Acer pseudoplatanus L.*), вивчалися умови стерилізації експлантів, а також вплив регуляторів росту і складових живильного середовища.*

*Ключові слова: мікроклональне розмноження, клен гостролистий, клен псевдоплатановий, дуб звичайний*

**В**ступ. З ростом населення земної кулі зростає потреба у природних ресурсах, у тому числі деревних. Незважаючи на постійне зростання випуску синтетичних матеріалів та заміни дерев'яних виробів металевими та синтетичними, вони не можуть зупинити попит на деревину.

Зважаючи на складний екологічний стан наших лісів, на низький відсоток стиглих і перестиглих лісостанів, сприяючи лісовідновленню на незаліснених площах, лісорозведенню, для отримання посадкового матеріалу з цінними спадковими властивостями, для зниження собівартості – необхідно застосування нових технологій.

Метод культури ізольованих клітин і тканин використовується для прискореного вегетативного розмноження оздоровлених господарсько цінних сортів, гібридних форм, реліктових видів, деревних рослин стійких до хвороб, масового вирощування елітних дерев, для створення розсадників високої якості, клонових плантацій з метою підвищення ефективності лісовідновлення та лісорозведення.

Перші дослідження в культурі *in vitro* дуба були присвячені отриманню калюсної культури і лише в одній з них відмічено утворення одиничних морфоструктур. Більш успішним було вивчення морфогенезу в калюсі, який отримано з сегментів зародка дуба ліванського [1]. Авторам вдалося індукувати масове формування бруньок і пагонів. Але отримання рослин-регенерантів через калюсну культуру не гарантує їх генетичної однорідності [2, 3], і використувати такий спосіб для мікроклонального розмноження цінних видів деревних рослин слід з обережністю. Великої уваги заслуговують роботи Чалупи з регенерації деревних рослин, в тому числі і дуба звичайного, за допомогою культури апікальних і пазушних бруньок [4]. В подальшому цей метод був використаний ним для мікроклонального розмноження відселектованих фенотипів дуба звичайного у віці від 2 місяців до 1 року [5]. З ювенільним вихідним матеріалом цього ж виду працювали і румунські вчені. Їх результати були зведені до отримання калюса і утворення пагонів в культурі бруньок [6]. Іспанські вчені для отримання рослин-регенерантів дуба звичайного в культурі *in vitro* в якості вихідних експлантів використовували ювенільні проростки, 3–4-місячні сіянці і дорослі (у віці 50 років) дерева. В останньому випадку експланти для культури отримували із латеральних пагонів, індукованих від пенька дорослого дерева [7].

Г. П. Буговою, Л. Л. Скробовою було досліджено морфогенез і регенерацію рослин – регенерантів дуба звичайного в культурі *in vitro*. Було вивчено генотипну варіабельність морфогенної активності експлантів ізольованих від порослевих пагонів та 3–4 місячних сіянців. Отримані дані свідчать про значну гено-

типу залежність морфогенних процесів в культурі *in vitro* у дуба звичайного [8].

Т. С. Момот, А. А. Яценко-Хмелевський, А. М. Смірнов (Санкт-Петербурзька лісотехнічна академія) проводили дослідження ізольованих коренів дуба звичайного в культурі *in vitro*. Отримані дані свідчать про високу інтенсивність росту коренів дуба звичайного в ізольованій культурі порівняно з аналогічними показниками росту ізольованих коренів інших деревних рослин [9].

І. П. Жук, Р. М. Карпінський досліджували морфогенну активність апікальних і латеральних бруньок дерев різного віку (від 7 до 30 років), а також порослевих пагонів дорослих дерев і ювенільних паростків. Отримані результати свідчать про виразну регенераційну здатність в культурі *in vitro*, яку виявляють експланти (вузлові сегменти, ділянки з верхньою брунькою), ізольовані з верхньої частини пагонів пенькуватої чи відрослої від коренів і стовбура дорослих дерев порослі [10].

Об'єктами наших досліджень були особливості розмноження в культурі *in vitro* дуба звичайного, кленів гостролистого і псевдоплатанового, які належать до головних лісоутворюючих порід і є господарськи цінними видами, які важко розмножуються вегетативним способом.

У роботі ми провели добір стерилізуючої речовини, концентрації, час експозиції для отримання асептичної культури із експлантів, вивчили вплив регуляторів росту на морфогенетичний потенціал експлантів даних видів деревних рослин.

### **Матеріали і методи**

У якості рослини-донора використовували 2–3-річні та 20–60-річні дерева.

Вихідними експлантами слугували зрілі зародки, апікальні та бічні бруньки, сегменти річного приросту.

Стерилізація зародків дуба звичайного була поступовою. Спочатку пропалювали жолуді у полум'ї спиртівки, знімали захисну оболонку, промивали у мильному розчині 15 хв., відмивали у проточній  $H_2O$  15 хв. та споліскували у дистильованій  $H_2O$ . Далі проводилось ізолювання зародка з частиною ендосперму. Зародки опускали у 70%-й  $C_2H_5OH$  на 30 с, стерилізували у розчині гіпохлориду натрію та тричі по 10 хв. відмивали у стерильній  $H_2O$ .

Стерилізація апікальних та бічних бруньок, сегментів пагонів полягає у знятті 2-3 покривних лусок (експлант брунька), промиванні у мильному розчині 15 хв., відмиванні у проточній  $H_2O$  15 хв., споліскуванні у дистильованій  $H_2O$ , опусканні у 0,03%-ий  $KMnO_4$  на 7-8 хв. Далі експланти витримували у 70%-ому  $C_2H_5OH$  до 1 хв., стерилізували у розчині гіпохлориду натрію та тричі по 10 хв. відмивали у стерильній  $H_2O$ . У асептичних умовах відрізки пагонів розрізали на сегменти з однією брунькою, яку звільняли від покривних лусок.

Асептичною вважалась культура зародків на 7-8 добу, культура бруньок – на 14-15 добу.

У якості стерилізуючої речовини у всіх випадках використовували комерційні розчини гіпохлориду натрію – "Білізна" і "Domestos", які брали у співвідношенні за об'ємом ( $NaClO$  до стерильної  $H_2O$ ). Було випробувано декілька варіантів стерилізації залежно від вихідного експланту (див. табл. 1).

Отримані асептичні експланти переносили на живильне середовище. Для вирощування культур використовували базове середовище МС з повним або зменшеним вдвічі вмістом мінеральних елементів.

До складу живильного середовища додавали: фітогормони БАП (0,1-2 мг/л), кінетин (0,25-1 мг/л), НОК (0,1-2 мг/л), ІОК (0,025-2 мг/л), ГК (0,25-1 мг/л); органічні добавки, зокрема гідролізат казеїну (1 г/л). Для абсорбування фенольних сполук використовували активоване вугілля (50-100 мг/л). В окремих випадках для отримання більшого відсотка асептичних експлантів використовували антибіотик цифотаксін (0,4 г/л). Експланти вирощували при освітленні 3-4 тис. лк люмінесцентними лампами, температурі 24-26 °С і відносній вологості 70% та 16-ти годинному фотоперіоді. На кожний варіант модифікованого середовища висаджували по 15 експлантів (див. табл.2).

## Результати та обговорення

Однією з основних умов успішного вирощування *in vitro* рослин є отримання добре ростучої асептичної культури. У табл. 1 наведено результати отриманих при стерилізації зрілих зародків, апікальних та бічних бруньок дуба та кленів.

Аналізуючи дані табл. 1, можна зробити такі висновки: найкращих результатів при стерилізації зародків дуба звичайного комерційними розчинами гіпохлориду натрію отримано при відношенні  $NaClO$  до  $H_2O$  як 1 : 3 і часу експозиції 15 хв., де відсоток асептичних експлантів становив 90-100%. При стерилізації  $NaClO$  у відношенні до  $H_2O$  як 1:2 і при часі експозиції 10 і 15 хв., незважаючи на отриманий високий відсоток асептичних експлантів (90-100%), життєздатних було лише 0-20%.

Нами було випробувано декілька варіантів стерилізації бруньок. Успішна стерилізація (60-90%) отриманих



**Особливості мікроклонального розмноження дуба звичайного (*Quercus robur* L.)...**

**Таблиця 1.** Вплив гіпохлориду натрію (NaClO) на експланти при отриманні асептичної культури

№ з/п	Деревна порода	Первинний експлант	Відношення NaClO до H <sub>2</sub> O у розчині	Час експозиції	Відсоток асептичних експлантів
1	Дуб звичайний	зрілі зародки	1 : 2	10	90–100
				15	90–100
			1 : 3	10	70–80
				15	80–90
			1 : 4	10	40–50
				15	50–60
		апикальні і бічні бруньки	1 : 1	15	30–40
			1 : 1	20	50–60
			1 : 1	30	80–90
		сегменти пагонів з апікальними і бічними бруньками	1 : 1	15	1–2
				20	2–3
				30	4–5
			1 : 2	15	1–2
				20	1–2
				30	2–3
1 : 3	15		1–2		
	20		1–2		
	30		2–3		
2	Клен псевдоплатановий	апикальні і бічні бруньки	1 : 1	15	30–40
			1 : 1	20	50–60
			1 : 1	30	60–70
		сегменти пагонів з апікальними і бічними бруньками	1 : 1	15	1–2
				20	2–3
				30	3–4
			1 : 2	15	1–2
				20	1–2
				30	2–3
		1 : 3	15	1–2	
			20	1–2	
			30	2–3	
3	Клен гостролистий	апикальні і бічні бруньки	1 : 1	15	40–50
			1 : 1	20	60–70
			1 : 1	30	70–80
		сегменти пагонів з апікальними і бічними бруньками	1 : 1	15	2–3
				20	4–5
				30	5–7
			1 : 2	15	1–2
				20	1–2
				30	2–3
		1 : 3	15	1–2	
			20	1–2	

асептичних експлантів із бруньок спостерігається при відношенні NaClO до H<sub>2</sub>O як 1 : 1 і часу експозиції 30 хв.

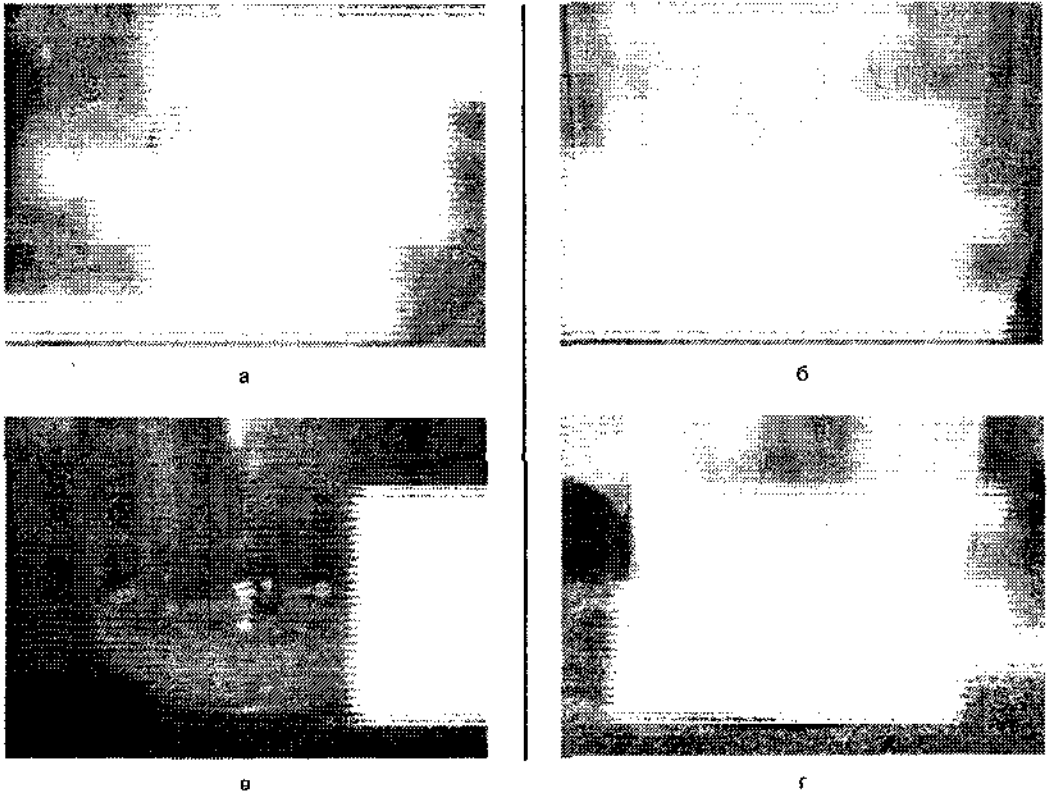
Гіпохлорид натрію взятий у різних відношеннях до стерильної води і при різному часі експозиції не ефективний для отримання асептичної культури із сегментів пагонів річного приросту да-

них видів. При введенні в культуру *in vitro* спостерігається значне грибокве (на 2–3 добу) і бактеріальне (на 7–10 добу) зараження 96–99% (рис. 1г).

У процесі культивування експлантів в умовах *in vitro* використовували середовище МС з різним вмістом регуляторів росту (табл. 2).

**Таблиця 2.** Вплив різних класів фітогормонів на життєздатність експлантів

№ з/п	Склад живильного середовища	Кількість посаджених експлантів, шт.	Відсоток життєздатних експлантів		
			через 7 днів	через 14 днів	через 21 день
<i>Зрілі зародки дуба звичайного</i>					
1	1мг/л кін + 1 мг/л НОК + 1г/л гідролізату казеїну + 50 мг/л акт. вугілля	15	100	40	–
2	2 мг/л БАП + 50 мг/л акт. вугілля	15	100	20	–
3	0,25 мг/л кін + 50 мг/л акт. вугілля	15	100	70	30
4	0,1 мг/л БАП + 50 мг/л акт. вугілля	15	100	80	70
5	безгормональне + 50 мг/л акт. вугілля	15	100	100	80
<i>Апікальні та бічні бруньки дуба звичайного</i>					
1	0,4 мг/л БАП + 0,5 мг/л ГК + 100 мг/л акт. вугілля	15	100	80	70
2	0,6 мг/л БАП + 0,25 мг/л ГК + 0,02 мг/л Ad + 100 мг/л акт. вугілля	15	100	90	80
3	0,6 мг/л БАП + 0,25 мг/л ГК + 0,02 мг/л Ad	15	20	10	–
4	2 мг/л БАП + 1 мг/л ГК + 100 мг/л акт. вугілля	15	100	70	50
5	безгормональне + 100 мг/л акт. вугілля	15	100	70	20
6	1 мг/л кін + 100 мг/л акт. вугілля	15	100	60	50
7	1–2 мг/л НОК + 100 мг/л акт. вугілля	15	100	70	70
<i>Апікальні та бічні бруньки кленів псевдоплатанового та гостролистого</i>					
1	0,1–0,4 мг/л БАП + 0,025–0,05 мг/л ІОК + 0,005 мг/л Ad	15	100	80	70
2	0,25 мг/л кін	15	100	70	50
3	безгормональне	15	100	80	80
4	1/2 макросолей + 1/2 інозиту + 1/2 глюкози + 1мг/л ІОК + 0,1 мг/л БАП	15	100	50	30
5	2 мг/л ІОК	15	100	70	70
6	0,4 мг/л БАП + 0,1 мг/л НОК + 0,02 г Ad	15	100	80	70
7	0,4 г/л цифотаксину	15	100	70	70



**Рисунок 1.** Прямий та непрямий морфогенез в культурі *in vitro*: а – прямий морфогенез у експланту клена псевдолатанового на середовищі з регуляторами росту (0,1 мг/л БАП + 0,025 мг/л ЮК + 0,005 мг/л Ад); б – прямий морфогенез у експланту клена псевдолатанового на безгормональному середовищі; в – початок калюсоутворення у експлантів клена псевдолатанового; г – асептична культура сегментів пагонів дуба звичайного.

Аналізуючи дані таблиці 2, можна зробити такі висновки: введення експлантів (зрілих зародків та бруньок) дуба звичайного в культуру *in vitro* супроводжується потемнінням тканини (на 6–10 добу), припиненням росту та її загибеллю внаслідок значного виділення фенольних сполук. Тому необхідно додавати абсорбент. Активоване вугілля додавали для зародків у концентрації 50 мг/л, для бруньок – 100 мг/л.

Найбільш сприятливим для морфогенезу зрілих зародків в культурі *in vitro* є середовище МС безгормональне та

з низькою концентрацією БАП (0,1 мг/л). Додаткове внесення та високі концентрації ауксинів та цитокинінів призводять до припинення росту і загибелі експланту.

Найкраще на життєздатність апікальної меристеми дуба звичайного вплинуло додавання в середовище 0,6 мг/л БАП + 0,25 мг/л ГК + 0,02 мг/л Ад + 100 мг/л активованого вугілля та 0,4 мг/л БАП + 0,5 мг/л ГК + 100 мг/л активованого вугілля. Культивування на безгормональному середовищі не призводить до морфогенної актив-

ності. Під дією 1–2 мг/л НОК спостерігався ріст апікальної меристеми. Дія кінетину у концентрації 1 мг/л істотно не впливає на ріст.

Успішний морфогенез (прямий і непрямий) у експлантів бруньок кленів спостерігається на безгормональному середовищі. Коли експлантом слугувала брунька без покривних лусок, проходив процес калюсоутворення (рис. 1в), коли брунька оточена 1 рядом покривних лусок – пагоноутворення (рис. 1б). Позитивних результатів дало додавання у середовище 0,1–0,4 мг/л БАП + 0,025–0,05 мг/л ІОК + 0,005 мг/л Ад (рис. 1а). На двох вище наведених варіантах середовища за 30 днів експланти досягали розміру 1–1,2 см. При зменшенні вдвічі концентрації макросолей, інозиту, глюкози з додаванням 1 мг/л ІОК та 0,1 мг/л БАП спостерігається 30% життєздатних експлантів. При додаванні у середовище 0,25 мг/л кін інтенсивність морфогенезу знижувалась. Внесення у середовище 2 мг/л ІОК не спричиняло утворення калюсу, а навпаки індукувало прямий морфогенез, за 1 міс. експланти досягали розміру 1 см. Додавання у середовище 0,4 г/л цифотаксину не спричиняло до загибелі експланта, а навпаки відбувалось інтенсивне пагоноутворення. На середовищі з цифотаксином за 1 міс. апікальна культура досягала розміру до 2–2,5 см. Використовуючи 6 варіантів середовища (0,4 мг/л БАП + 0,1 мг/л НОК + 0,02 мг/л Ад), де експлантом слугувала брунька без покривних лусок, спостерігали інтенсивне калюсоутворення.

## Висновки

1. Найкращих результатів при стерилізації зародків дуба звичайного комерційними розчинами гіпохлориду

натрію отримано при відношенні NaClO до H<sub>2</sub>O як 1 : 3 і часу експозиції 15 хв., де відсоток асептичних експлантів становив 90–100%.

2. Успішна стерилізація (60–90%) отриманих асептичних експлантів із бруньок спостерігається при відношенні NaClO до H<sub>2</sub>O як 1:1 і часу експозиції 30 хв.

3. Зародки дуба звичайного та бруньки клена псевдоплатанового в культурі *in vitro* виявили високий морфогенетичний потенціал

4. Найбільш сприятливим для морфогенезу зрілих зародків в культурі *in vitro* є середовище МС з низькою концентрацією БАП (0,1 мг/л) та безгормональне середовище.

5. Успішний морфогенез (прямий і непрямий) у експлантів бруньок кленів відбувається на безгормональному середовищі.

## Перелік літератури

1. *Srivastava P. S., Steinbauer A.* In vitro culture of embryo segments of *Quercus libani*: organogenesis and callus growth as a differential response to experimental conditions // *Z. Pflanzenphysiol.* – 1982. – 106, № 1. – P. 93.
2. *Катаева Н. В., Бутенко Р. Г.* Клональное размножение растений. – М.: Наука. – 1986. – 96 с.
3. *Boulay M.* Aspects pratiques de la multiplication in vitro des essences forestieres // *Extrait des Ann. AFOCELL.* – 1984. – P. 7.
4. *Chalupa V.* In vitro propagation of some broad-leaved forest trees // *Comm. Inst. Forest. Cech.* – 1979. – №11. – P. 159.
5. *Chalupa V.* In vitro propagation of Oak (*Quercus robur* L.) and Linden (*Tilia cordata* Mill) // *Biolog. plant. (Praha).* – 1984. – V. 26, № 5. – P. 374.
6. *Jordan M., Grigorescu A., Enescu V. et al.* Multiplicarea clonala // *Rev. Padur. Ind. Lemn., celul. si hirtie. Silvicult.* – 1982. – An. 97, № 3. – P. 131

7. Vieitez A. M., San-Jose M. C., Vieitez E. *In vitro* plantlet regeneration from mature *Quercus robur* // J. Hortic. Sci.– 1985.– 60, № 1.– P. 99.
8. Бутова Г. П., Скрובהва Л. Л. Морфогенез и регенерация дуба черешчатого в культуре *in vitro* // Физиология растений.– 1988.– 35, № 5.– С. 1023–1030.
9. Момот Т. С., Яценко-Хмелевский А. А., Смирнов А. М. Культура *in vitro* изолированных корней дуба черешчатого (*Quercus robur L.*).– Известия высших учебных заведений. Лесной журнал, Архангельск.– 1975.– № 5.– С. 26–28.
10. Жук І. П., Карпінський Р. М. Морфогенез удуба звичайного в культурі *in vitro*.– Лісовий журнал, К.– 1993.– № 1.– С. 18–20.

Представлено Т. М. Чеченевою  
Надійшла 17.01.2006

**ОСОБЕННОСТИ МИКРОКЛОНАЛЬНОГО РАЗМНОЖЕНИЯ ДУБА ЧЕРЕШЧАТОГО (*QUERCUS ROBUR L.*), КЛЕНОВ ОСТРОЛИСТОГО (*ACER PLATANOIDES L.*) И ПСЕВДОПЛАТАНОВОГО (*ACER PSEUDOPLATANUS L.*)**

А. Пинчук, О. Чернобров

Национальный аграрный университет,  
лаборатория фитовирусологии  
и биотехнологии,  
Украина, 03041, г. Киев,

ул. Героев обороны, 15,  
virlab@nauu.kiev.ua

В статье рассмотрены особенности микроклонального размножения дуба черешчатого (*Quercus robur L.*), кленов остролистого (*Acer platanoides L.*) и псевдоплатанового (*Acer pseudoplatanus L.*), изучены условия стерилизации эксплантов, а также влияние регуляторов роста и составляющих питательной среды.

**Ключевые слова:** микроклональное размножение, клен остролистый, клен псевдоплатановый.

**PECULIARITIES OF MICROPROPAGATION OF ENGLISH OAK (*QUERCUS ROBUR L.*), NORWAY MAPLE (*ACER PLATANOIDES L.*) AND SYCAMORE (*ACER PSEUDOPLATANUS L.*)**

A. Pinchuk, O. Chornobrov

National agricultural university,  
laboratory phytovirology and biotechnology,  
Ukraine, 03041, Kiev, Geroev oboronu st., 15,  
virlab@nauu.kiev.ua

The features of micropropagation of English oak (*Quercus robur L.*), Norway maple (*Acer platanoides L.*) and sycamore (*Acer pseudoplatanus L.*) are shown. The conditions of explants sterilization, the influence of growth regulators and medium components are studied.

**Key words:** micropropagation, English oak, Norway maple.

УДК 633.854.54:581.143.6

## **ВЛИЯНИЕ СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ НА РЕГЕНЕРАЦИЮ ПОБЕГОВ ИЗ КАЛЛУСА ПЫЛЬНИКОВ ЛЬНА МАСЛИЧНОГО**

**А. И. СОРОКА**

Институт масличных культур УААН,  
Украина, г. Запорожье

*Исследовано влияние состава питательной среды на органогенез каллуса пыльников льна масличного. Показано, что процессы инициации регенерации зависят от количества цитокинина в среде.*

*Ключевые слова: пыльники льна масличного, регенерация, каллус*

**ВВЕДЕНИЕ.** Лен является важной культурой во многих странах с умеренным климатом и возделывается как для получения натуральных волокон, так и для производства льняного масла, особенно широко применяющегося в промышленности [1, 2]. Новые сорта льна с уменьшенным количеством линоленовой кислоты представляют большую ценность как продукт питания. И хотя в настоящее время на Украине лен не возделывается так широко, как он того заслуживает, однако из года в год посевы льна расширяются и в настоящее время они составляют около 50 тыс. га.

Селекция льна могла бы быть значительно ускорена при использовании биотехнологических приемов и, в частности, за счет получения гаплоидных или дигаплоидных растений через культуру пыльников. Так, стабилизация генома, на которую при традиционной селекции уходит обычно 4–6 лет, с применением биотехнологий достигается в течение одного поколения [3]. Получаемые дигаплоиды сразу представляют собой нерасщепляющиеся селекционные линии, которые при наличии ряда хозяйственно-ценных признаков могут использоваться и как готовые сорта.

Получение гаплоидов возможно путем культивирования как завязей, так и пыльников или выделенной из них незрелой пыльцы. Однако, в настоящее время гаплоидные (или дигаплоидные) растения льна в культуре пыльников сложно получить напрямую [4, 5]. Обычно образованию гаплоидов предшествует промежуточная стадия, на которой образуется каллус из микроспор, которые стали на спорофитный путь развития вместо привычного гаметофитного.

© А. И. СОРОКА, 2006

В нашей работе изучалось влияние базового и гормонального состава питательной среды на регенерацию, а также удлинение побегов из каллуса, полученного из пыльников льна в связи с тем, что данные вопросы слабо освещены в научной литературе.

### **Материалы и методы**

Для изучения органогенеза в качестве исходного материала использовали каллус, полученный при культивировании пыльников различных гибридных растений льна. Бутоны стерилизовали разбавленным раствором хозяйственного отбеливателя "Белизна", а выделенные из них в асептических условиях пыльники высаживали на искусственную питательную среду LMA-1 [6], где их культивировали в темноте в течение месяца в контролируемых температурных условиях. Полученный из пыльников каллус пересаживали в чашки Петри на модифицированные искусственные питательные среды LMA-1 и  $N_6$  [7] с различным (2, 4 и 6 мг/л) содержанием 6-бензиламинопурина (БАП). В дальнейшем этот каллус (6 шт. на чашку) культивировали при комнатной температуре и 16-часовом фотопериоде. Через каждые 4–5 недель их пассировали на новую питательную среду, подсчитывая при этом количество каллусов, регенерировавших побеги и корни, а также проводя наблюдение за развитием самого каллуса.

Для изучения удлинения побегов в качестве материала использовали каллусы с регенерированными побегами, полученные из пыльников льна. Каллусы льна высаживали в пяти повторностях в чашки Петри на 5 питательных сред ( $N_6$  29–33), которые различались между собой содержани-

ем фитогормонов, витаминов и микроэлементов (бора). Культивирование проводили по стандартным методикам на протяжении двух пассажей. Подсчитывали количество побегов, длиной не менее чем 10 мм.

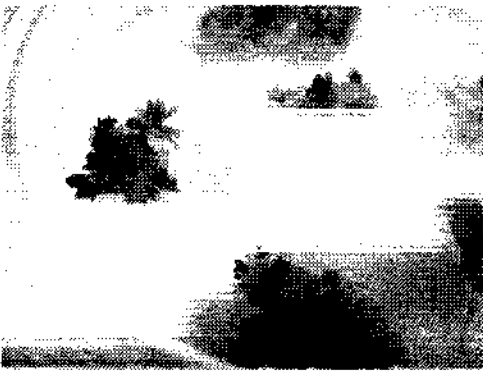
### **Результаты и обсуждение**

Для развития каллуса содержание в среде БАП в количестве 2 мг/л оказалось наиболее подходящим. В сравнении с вариантами, где концентрация БАП была 4 и 6 мг/л, здесь было значительно больше хорошо развитых каллусов. Концентрация БАП 4 мг/л оказалась промежуточной – количество нормально развитых каллусов в этом варианте было большим, чем в варианте с 6 мг/л БАП, но меньшим, чем в варианте с минимальным содержанием данного цитокинина. Отмеченная закономерность наблюдалась как при культивировании каллусов на среде LMA-1, так и на среде  $N_6$ , хотя в последнем случае различия между вариантами с 4 и 6 мг/л БАП были незначительными. Скорее всего это связано с влиянием базового состава самой среды  $N_6$ , а не с различиями в концентрации БАП. Так, если на среде LMA-1 максимальная концентрация БАП довольно сильно угнетала развитие каллуса (с 63,8 до 26,6%), то на среде  $N_6$  процент нормально развитых каллусов уменьшался лишь незначительно (с 83,3 до 73,3%).

Что касается органогенеза, то ни на одной из изученных сред в течение первых 4 недель культивирования каллусов не наблюдалось образования ни побегов, ни корешков. Различные концентрации БАП в этом случае также были неэффективны. Однако ситуация существенно изменилась после культивиро-

вания каллусов льна на тех же средах еще в течение одной недели. В этом случае образование участков регенерации было зафиксировано как на среде LMA-1, так и на среде N<sub>6</sub> (табл. 1). Проявились и различия между вариантами с различными концентрациями БАП. Так, на среде LMA-1 регенерация корней происходила при концентрации БАП 2 и 4 мг/л, однако побеги образовывались только в том случае, когда концентрация БАП была минимальной. При содержании БАП 6 мг/л не было замечено роста ни корней, ни побегов.

Немного иначе выглядела ситуация в случае среды N<sub>6</sub>. Корни на этой среде регенерировали при всех изученных концентрациях БАП, побеги же образовывались лишь на средах с повышенным содержанием данного фитогормона, а именно там, где его концентрация в среде достигала 4 и 6 мг/л (рис.).



**Рисунок.** Органогенез в культуре каллуса льна на среде N<sub>6</sub> с бензиламинопурином.

На интенсивности органогенеза пересадка на свежую питательную среду отразилась негативно. Ранее регенерированные органы часто дедифференцировались, что в результате привело к значительному общему снижению процента регенерации, как побегов, так и корней. Особенно это было заметно в

вариантах с концентрацией БАП 4 и 6 мг/л, где не было зафиксировано ни одного каллуса с регенерированными корнями (4 мг/л БАП) и побегами (6 мг/л БАП). Более низкое содержание БАП (2 мг/л) не приводило к изменению принципиальной картины с органогенезом, уменьшалось лишь количество каллусов, характеризующихся какими-либо процессами регенерации.

В целом можно сказать, что процессы инициации регенерации меньше зависят от базового состава сред LMA-1 и N<sub>6</sub>, а больше от количества цитокинина в среде. Органогенез значительно лучше идет на средах, содержащих 2 и 4 мг/л БАП, чем 6 мг/л.

Другая часть нашей работы касалась удлинения регенерированных побегов. Изучался рост побегов на пяти средах с минеральной основой среды МС [8]. За исключением среды № 30 остальные среды содержали в разных сочетаниях фитогормоны БАП, НУК, ГК, аминокислоты серин и глутамин, витамин В<sub>1</sub> и микроэлемент бор.

При культивировании каллусов с регенерацией в течение месяца (1 пассаж) лишь на некоторых из пяти изученных сред наблюдали удлинившиеся побеги. Их максимальное количество составило 10,7 % (табл. 2).

После второго пассажа удлиненные побеги отмечены практически на всех средах, но наименьшее их количество было на среде 30, а наибольшее – на среде 33. В последнем случае почти каждый третий побег удлинялся.

Среда № 30 оказалась наименее подходящей для удлинения побегов льна. Это можно считать закономерным, поскольку она не содержит никаких добавок. Наиболее пригодной для удлинения побегов можно считать среду 33, но и в этом случае процесс был генотипоспецифичен.



## Влияние состава питательной среды на регенерацию побегов из каллуса ...

**Таблица 1.** Влияние состава питательной среды на процессы органогенеза в культуре каллуса из пыльников льна F<sub>1</sub> 6-8-гнездный x M-22

№ пассажа	2 мг/л БАП			4 мг/л БАП			6 мг/л БАП		
	всего каллусов, шт.	каллусов с корнями, %	каллусов с побегами, %	всего каллусов, шт.	каллусов с корнями, %	каллусов с побегами, %	всего каллусов, шт.	каллусов с корнями, %	каллусов с побегами, %
<b>LMA1</b>									
I 4 нед.	36	0	0	36	0	0	30	0	0
I 5 нед.	36	19,4 ± 6,53	13,8 ± 6,33	36	11,0 ± 5,21	0	24	0	0
II	30	10,0 ± 5,47	3,3 ± 1,81	18	0	0	24	0	0
<b>N<sub>6</sub></b>									
I 4 нед.	30	0	0	30	0	0	30	0	0
I 5 нед.	30	26,6 ± 8,10	0	30	10,0 ± 5,47	43,3 ± 9,03	30	3,3 ± 3,11	13,3 ± 6,14
II	30	3,3 ± 3,11	0	30	0	16,6 ± 6,85	24	0	0

**Таблица 2.** Влияние состава питательной среды на удлинение побегов льна

Среда, №	Каллусов с регенерац., шт.	Удлинившихся побегов, %	Каллусов с регенерац., шт.	Удлинившихся побегов, %
	I пассаж		II пассаж	
<b>Генотип F<sub>1</sub> 4 x 5</b>				
29	27	3,7	27	3,7
30	27	0	10	0
31	25	4,0	18	5,5
32	28	10,7	27	0
33	26	3,85	20	5,0
<b>Генотип 470</b>				
29	29	0	15	6,7
30	23	0	20	5,0
31	22	0	12	8,3
32	22	0	15	6,7
33	19	10,5	19	31,6

## Выводы

Таким образом, по результатам данного эксперимента лучший рост регенерированных побегов наблюдался на среде МС-33. Эта среда содержит ряд добавок, в частности, кроме других фитогормонов, 0,2 мг/л  $GA_3$ , некоторые аминокислоты и увеличенное вдвое количество борной кислоты.

## Список литературы

1. Keijzer P., Metz P. Breeding of flax for fibre production in Western Europe // The Biology and Processing of Flax. Belfast. – 1993. – P. 33 – 67.
2. Жученко А. А., Рожмина Т. А. Мировой генофонд льна и основные направления его использования // Льнян. дело. – 1998. – № 2. – С. 9–18.
3. Ницше В., Венцель Г. Гаплоиды в селекции растений. – М.: Колос, 1980. – 128 с.
4. Dedicova B., Hricova A., Samaj J., Pretova A. Studies in flax anther cultures // European Community COST - 824 Gametic Embryogenesis, 1997. – Sjusjoen (Lillehammer), Norway, 1997. – P. 28.
5. Obert B., Dedicova B., Hricova A., Samaj J., Pretova A. Flax anther culture: effect of genotype, cold treatment and media // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. – 2004. – 79, № 2. – P. 233–238.
6. Поляков А. В., Пролетова Н. В. Питательная среда для культивирования пыльников льна. Пат. № 2120741. Россия: Всероссийский НИИ льна. Бюл. № 30. – 1998.
7. Chu C. C. The N6 medium and its applications to anther culture of cereal crops // Proc.

Symp. on Plant Tissue Culture, Beijing, China. – 1978. – Science Press. – P. 43–50.

8. Murashige J., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // *Physiol. Plant.* – 1962. – 15. – P. 473–497.

Представлено Т. Н. Чеченовой  
Поступила 20.01.2006

ВПЛИВ СКЛАДУ ЖИВИЛЬНОГО СЕРЕДОВИЩА НА РЕГЕНЕРАЦІЮ ПАГОНІВ З КАЛІОСУ ПИЛЯКІВ ЛЬОНУ ОЛІЙНОГО

A. I. Soroka

Інститут олійних культур УААН,  
Україна, м. Запоріжжя

Досліджено вплив складу живильного середовища на органогенез каліосу пиляків льону олійного. Показано, що процеси ініціації регенерації залежать від кількості цитокініну в середовищі.

Ключові слова: пиляки льону олійного, регенерація, каліос.

CONTRIBUTION OF NUTRIENT MEDIUM COMPOSITION TO SHOOT REGENERATION FROM ANTHER CALLUS OF LINE OIL-YIELDING

A. I. Soroka

Institute of Oil-yielding cultures UAAS  
Ukraine, Zaporizhia

Contribution of nutrient medium composition to callus organogenesis of Line oil-yielding anther has been studied. Initiation of regeneration was found to vary with cytokinin amount in nutrient medium.

Key words: Line oil-yielding, anther, regeneration, callus.

УДК 577.12 + 582.923.1: 57.086.83

## ОТРИМАННЯ ТА БІОХІМІЧНИЙ АНАЛІЗ КУЛЬТУРИ ТКАНИН ТИРЛИЧУ БЕЗСТЕБЛОВОГО (*GENTIANA ACAULIS* L.)

Н. М. СТРАШНЮК<sup>1</sup>, О. М. ЛЕСЬКОВА<sup>1</sup>, В. М. МЕЛЬНИК<sup>2</sup>, В. А. КУНАХ<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Тернопільський національний педагогічний університет  
імені Володимира Гнатюка,  
Україна, 46027, м. Тернопіль, вул. М. Кривоноса, 2,  
strashniuk@mail.ru;

<sup>2</sup>Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,  
Україна, 03143, м. Київ, вул. Акад. Заболотного, 150,  
kunakh@imbg.org.ua

Отримано культуру тканин *G. acaulis*, здатну до тривалого росту *in vitro*. Досліджено динаміку приросту біомаси калюсу та синтезу в ньому ксантонів і флавоноїдів; виявлено обернено пропорційну залежність між цими показниками. Встановлено, що вміст ксантонів і флавоноїдів був максимальним на 40 добу пасажу і в кілька разів перевищував такий у коренях і надземній частині інтактних рослин *G. acaulis*. Обговорюється можливий зв'язок між здатністю калюсних тканин до синтезу біологічно активних речовин та їх генетичною стабільністю.

Ключові слова: *Gentiana acaulis*, культура тканин рослин, ксантони, флавоноїди

**В**ступ. Метод культури рослинних тканин *in vitro* поряд із використанням у фундаментальних дослідженнях знайшов широке практичне застосування у різних напрямках експериментальної біології. Одними з таких прикладних аспектів використання культури *in vitro* є збереження генофонду рідкісних лікарських видів рослин та забезпечення фармацевтичної промисловості цінною сировиною з одночасним збереженням цілісності природних фітокомплексів. До видів, природні ресурси яких з кожним роком зменшуються, відносяться види роду *Gentiana* L. – лікарські рослини, деякі з котрих (наприклад, *G. acaulis* L.) є рідкісними, потребують охорони і занесені до Червоної книги України [1]. Введення в культуру *in vitro* рослин цих цінних видів дозволить в перспективі отримати альтернативне джерело біологічно активних речовин (БАР), що поліпшують функціональну діяльність травних органів, здійснюють нормалізуючий вплив на метаболічні функції печінки тощо.

Відомо, що в культурі тканин під впливом умов культивування відбуваються зміни вторинного метаболізму, що можуть бути викликані різними чинниками: відсутністю диференціювання клітин у деяких калюсних і суспензійних культурах; відмінностями біосинтетичного потенціалу культур тканин, одержаних з інтактних рослин з різних місцезростань та з різних частин рослини; структурними та функціональними перебудовами геномів культивованих клітин [2, 3]. Культури *in vitro* у деяких випадках нездатні до синтезу цінних вторинних метаболітів, зокрема це торкається алкалоїдів та ксантонів. Однією з причин вважається високий рівень генетичної мінливості, наслідком якої є втрата здатності до біосинтезу цих речовин. З огляду на це, необхідним є не лише введення виду в культуру *in vitro*, але і всестороннє вивчення отриманих культур.

Метою роботи було введення в культуру *in vitro* *G. ascaulis*, отримання стабільної культури тканин цього виду, здатної до необмежено тривалого росту на штучних живильних середовищах, дослідження її фізіолого-біохімічних особливостей.

### Матеріали і методи

У роботі використовували насіння *G. ascaulis*, зібране на південно-західному схилі г. Туркул (1750 м н.р.м.) Чорногірського масиву Карпат, з якого після стерилізації у 15% розчині перексиду водню протягом 2 год 15 хв отримували асептичні проростки, вирощувані *in vitro*. Для індукції калюсогенезу листкові, стеблові і кореневі експланти з 1,5–2 місячних рослин висаджували на живильне середовище Мурасіге-Скуга (МС) [4] з половинним вмістом

макро- і мікросолей (МС/2), доповнене різними комбінаціями концентрацій фітогормонів 6-бензиламінопурину (БАП) і дихлорфеноксиоцтової кислоти (2,4-Д). Для з'ясування фізіолого-біохімічних особливостей *G. ascaulis* в культурі *in vitro* встановлювали залежність між динамікою приросту сухої маси та накопиченням флавоноїдів і ксантонів у стабільному сформованому калюсі кореневого походження 33-го пасажу протягом 45 днів культивування. Приріст і вміст БАП визначали через кожні 5 діб до 20 доби та через 10 діб – до закінчення експерименту.

Сумарний вміст флавоноїдів і ксантонів визначали спектрофотометрично та хромато-спектрофотометрично, відповідно, за модифікованими нами методиками [5, 6]. В якості стандартів використовували рутин і мангіферин, відповідно. Усі результати опрацьовували статистично за Лакінім [7] з використанням стандартних програм Sigma Plot for Windows.

### Результати та обговорення

Для індукції калюсогенезу нами як базове використане живильне середовище МС/2, доповнене чотирма різними варіантами комбінацій фітогормонів БАП (0,1 і 0,2 мг/л) та 2,4-Д (0,5 і 1 мг/л). Результати проведених досліджень показали, що найбільш оптимальним для утворення та проліферації калюсу *G. ascaulis* є варіант з 0,1 мг/л БАП і 0,5 мг/л 2,4-Д. На усіх середовищах з іншими комбінаціями концентрацій фітогормонів калюс хоча й утворювався, однак характеризувався сповільненим ростом, а через 10–12 діб спостерігали його потемніння і некроз. Найвищим відсоток калюсогенезу був на корневих експлантах. Окрім

того, калюс кореневого походження характеризувався найкращим ростом, і тому був використаний для подальших досліджень.

Дослідження взаємозв'язку між динамікою приросту сформованого стабільного калюсу *G. ascaulis* і накопиченням у ньому ксантонів і флавоноїдів показало, що протягом перших 20 діб пасажу відбувається зменшення синтезу ксантонів, порівняно з першим днем (рис. 1). Вміст флавоноїдів на 5 добу був досить високим, проте вже на 10 добу цей показник зменшувався у 2,5 рази, тоді як приріст біомаси протягом цього періоду збільшується в 1,7 рази. З 15-ї по 35-ту добу вміст флавоноїдів практично не змінювався, порівняно з 10 добою, і залишався невисоким. У той же час з 10-ї по 15-ту добу відбувався найбільш інтенсивний ріст калюсу: його відносний приріст на 15 добу був максимальний і становив 1,1. Вміст ксантонів і флавоноїдів дещо

збільшувався на 30 добу культивування, тоді як приріст калюсу в цей час, порівняно з 15 добою, зменшувався в 1,6 рази. Після 30 доби ріст калюсу продовжував сповільнюватися: відносний приріст його сухої маси становив 0,6-0,7, у той час як на 40 добу культивування показники вмісту ксантонів і флавоноїдів у досліджуваному калюсі були найвищими і складали 3,52% і 4,77%, відповідно. Приріст калюсу на 40 добу, порівняно з 15-ю, зменшувався в 1,8 рази. Порівнюючи динаміку накопичення БАР у калюсній культурі із динамікою приросту калюсу (рис. 1), слід відзначити обернено пропорційну залежність: коли приріст біомаси зменшується – вміст БАР збільшується, що часто спостерігається в культурах тканин [2]. Очевидно, в даному випадку на 40 добу культивування ріст калюсної культури *G. ascaulis* сповільнюється, а весь потенціал спрямовується на синтез вторинних метаболітів.

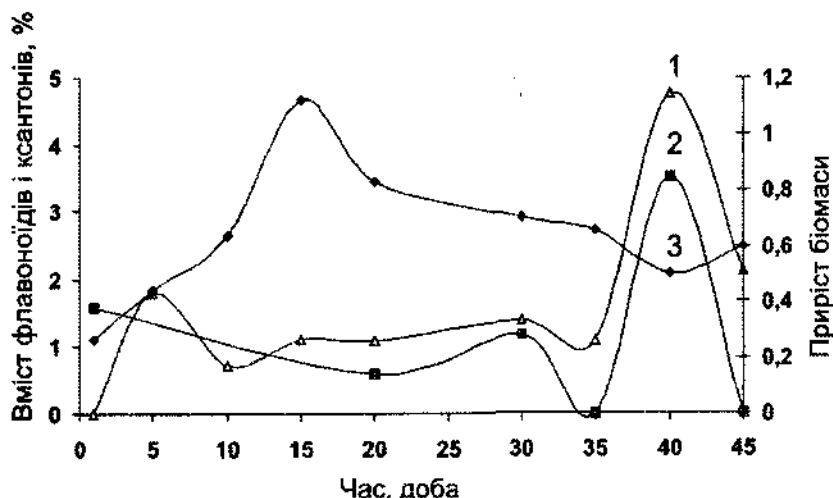


Рисунок 1. Динаміка приросту біомаси в культурі тканин *G. ascaulis* протягом пасажу та синтезу в ній флавоноїдів і ксантонів:

1 – вміст флавоноїдів у сухій біомасі, %; 2 – вміст ксантонів у сухій біомасі, %; 3 – відносний приріст біомаси

Порівняння отриманих результатів вмісту БАР в калюсі *G. ascaulis* та інтактних рослинах показало досить високу активність синтезу ксантонів і флавоноїдів в культурі *in vitro*. Максимальний вміст ксантонів у калюсі перевищував такий не лише у коренях інтактних рослин *G. ascaulis* з туркульської (у 4,8 рази) і реберської (у 12,2 рази) популяції, але й у надземних частинах рослин (туркульської – у 1,67 рази, реберської – у 1,27 рази) (рис. 2А), хоч у природі в надземних частинах рослин ксантонів синтезується більше, ніж у коренях [8]. Вміст флавоноїдів в калюсній культурі перевищував такий в

коренях інтактних рослин *G. ascaulis* з туркульської популяції в 3,9 рази, з реберської – в 2,9 рази, а також у надземній частині рослин реберської популяції – в 2,1 рази, однак був дещо нижчий, ніж у надземній частині рослин туркульської популяції (рис. 2Б).

У літературі відсутні дані, що стосуються синтезу флавоноїдів і ксантонів у культурі тканин видів роду *Gentiana* L., проте відомо, що у деяких випадках культура *in vitro* тирличів втрачає здатність синтезувати інші вторинні метаболіти. Наприклад, проведено порівняльний аналіз вмісту секоїридоїдів у листках інтактних рослин та калюсі *G. cruciata*. Показано, що в листках інтактних рослин амарогентин присутній у достатній кількості, тоді як у калюсі виявлено його залишкові кількості. Проте, в калюсі *G. cruciata* синтезувалися деякі секоїридоїди, не характерні для інтактних рослин [9].

Підсумовуючи результати проведених досліджень, слід відзначити, що прослідковується взаємозв'язок між проліферацією калюсу *G. ascaulis*, синтезом в ньому БАР та умовами культивування *in vitro*. При введенні в культуру *in vitro* важливим завданням є підбір таких умов, які б одночасно забезпечували і ріст калюсу, і синтез в ньому цінних вторинних метаболітів. Перешкодою на шляху максимальної реалізації біосинтетичного потенціалу культур часто є антагонізм між процесами проліферації і накопичення БАР. Підібране нами живильне середовище сприяє проходженню обох цих процесів, однак приріст біомаси (максимум на 15 добу) та синтез флавоноїдів і ксантонів (максимум на 40 добу) у калюсній тканині *G. ascaulis* чітко розмежовані в часі. Виходом з такої ситуації є відбір матеріалу для подальшого пасажування на 21

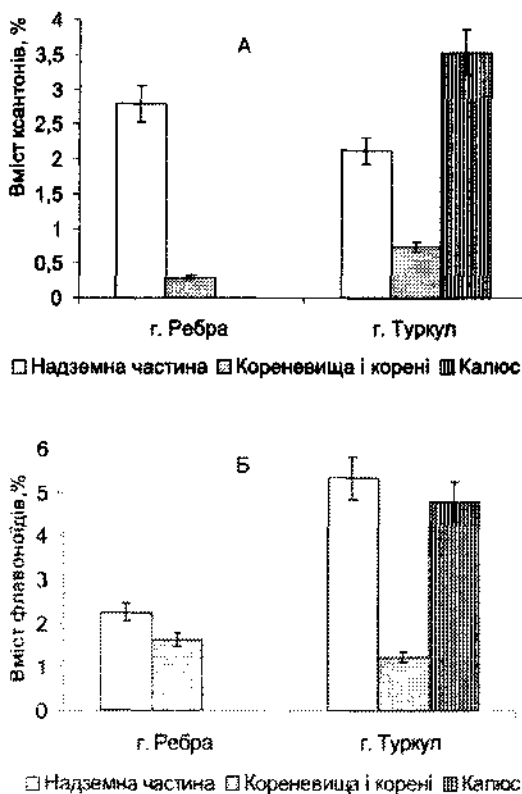


Рисунок 2. Сумарний вміст ксантонів (А) та флавоноїдів (Б) в інтактних рослинах туркульської і реберської популяцій та в культурі тканин *G. ascaulis*

добу, тоді як для отримання БАР тривалість пасажу потрібно продовжувати до 40 доби.

З літератури відомо, що накопичення продуктів спеціалізованого обміну клітинами *in vitro*, як і будь-яка інша фенотипова ознака, є результатом взаємодії генотипу і умов культивування [2]. Проведені раніше молекулярно-генетичні дослідження калюсу *G. ascaulis* показали, що в ньому із збільшенням тривалості культивування (кількості пасажів) відбувається поступове зменшення копійності генів 18S-25S рРНК, порівняно з геномом вихідної рослини [10]. Проте, не виявлено помітних якісних змін довжини повторів 18S-25S рДНК та розташування сайтів пізнавання для деяких рестриктаз. Дослідження генів 5S рРНК калюсної тканини *G. ascaulis* показали зміни в метилюванні 5S рДНК, порівняно з листком рослини [11]. Подібні, але менш значні відмінності було виявлено також між різними диференційованими тканинами інтактних рослин інших видів тирличів. Отже, зміна рівня метилювання 5S рДНК в культивованих клітинах може бути обумовлена їх дедиференціацією, пов'язаною зі зміною функціонального статусу. Відомо, що на рівень геномної мінливості суттєво впливає вміст у живильному середовищі екзогенних фітогормонів [2]. Виходячи з цього, можна припустити, що низький рівень геномної мінливості культивованих тканин *G. ascaulis* зумовлений досить низьким вмістом БАП і 2,4-Д (0,1 і 0,5 мг/л, відповідно) у живильному середовищі, на якому культивували калюс. Отже, отримані дані свідчать про те, що тривале вирощування клітин *G. ascaulis* в умовах *in vitro* впливає на генетичну стабільність/мінливість калюсу, що призводить до виникнення різноманітних геномних (а також епі-

геномних) порушень. Проте зважаючи на високу генотипову мінливість тирличів у природі [12–14], не виключено, що виявлені в культурі *in vitro* зміни є реалізацією запрограмованої генетичної інформації, яка заблокована в геномі інтактних рослин, проте реалізується в культурі під впливом умов *in vitro*.

Таким чином, підібрані нами умови культивування на фоні низького рівня геномної мінливості культури тканин *G. ascaulis* забезпечують вищий, порівняно з інтактними рослинами, вміст БАР у ній.

## **Висновки**

Отримано культуру тканин кореневого походження *G. ascaulis*, здатну до тривалого вирощування на живильному середовищі МС/2, доповненому 0,1 мг/л БАП і 0,5 мг/л 2,4-Д. Досліджено динаміку приросту біомаси калюсу та синтезу в ньому ксантонів і флавоноїдів протягом пасажу. Показано обернено пропорційну залежність між швидкістю росту і накопиченням БАР. Встановлено, що вміст ксантонів і флавоноїдів протягом пасажу змінювався – був максимальним на 40 добу культивування, і перевищував аналогічні показники у коренях та надземних частинах інтактних рослин *G. ascaulis* туркульської та реберської популяцій.

## **Перелік літератури**

1. Червона книга України. Рослинний світ / Редкол.: Ю.Р. Шеляг-Сосонко (відп. ред.) та ін. – К.: "Українська енциклопедія" ім. М.П. Бажана, 1996. – 608 с.
2. Кунах В. А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. – К.: Логос, 2005. – 730 с.
3. Носов А. М. Культура клеток высших растений – уникальная система, модель. инструмент // Физиол. раст. – 1999. – 46, № 6. – С. 837–844.

4. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant.* – 1962. – 15, №13 – P. 473–497.
5. Беликов В. В., Шрайбер М. С. Методы анализа флавоноидных соединений // *Фармация.* – 1970. – № 1. – С. 66–71.
6. Николаева Г. Г., Глызин В. И., Младенцева М. С., Шейченко В. И., Патудин А. В. Ксантоны *Gentiana lutea* // *Химия природ. соедин.* – 1983. – № 1. – С. 107–108.
7. Лакин Г. Ф. Биометрия: Учебное пособие для биологических специальностей вузов. – М.: Высш. школа, 1980. – 293 с.
8. Денисова-Дятлова О. А., Глызин В. И. Природные ксантоны // *Успехи химии.* – 1982. – Вып. 10. – С. 1753–1773.
9. Wesolowska M., Skrzypczak L., Dudzinska R. Rodzaj *Gentiana L.* w kulturze *in vitro* // *Acta Polon. Pharm.* – 1985. – 42, № 1. – P. 79–83.
10. Mel'nyk V. M., Spiridonova K. V., Andreiev I. O., Strashnyuk N. M., Kunakh V. A. Rearrangements of the 18S–25S ribosomal RNA nuclear gene in culture *in vitro* of some *Gentiana L.* species // *Бюл. Никіт. ботан. саду.* – 2002. – № 86. – С. 63–66.
11. Андреев І. О., Спіридонова К. В., Мельник В. М., Кунах В. А. Міхвідовий поліморфізм та зміни в культурі *in vitro* генів 5S рРНК у представників роду Тирлич (*Gentiana L.*) // *Доп. НАН України.* – 2004. – № 6. – С. 189–192.
12. Yuan Y.-M., Kupfer Ph., Doyle J. J. Infrageneric phylogeny of the genus *Gentiana* (*Gentianaceae*) inferred from nucleotide sequences of the internal transcribed spacers (ITS) of nuclear ribosomal DNA // *Amer. J. Bot.* – 1996. – 83, № 5. – P. 641–652.
13. Мельник В. М., Андреев І. О., Спіридонова К. В., Кунах В. А. Рестрикційне картування та варіабельність 18S–25S рибосомних генів деяких видів роду *Gentiana L.* // *Цитология и генетика.* – 2003. – 37, № 5. – С. 65–71.
14. Мельник В. М., Спіридонова К. В., Андреев І. О., Страшнюк Н. М., Кунах В. А. Варіабельність ядерної 18S–25S рДНК *Gentiana lutea L.* в природі та в культурі

тканин *in vitro* // *Цитология и генетика.* – 2004. – 38, № 3. – С. 16–21.

Представлено М. В. Кучуком  
Надійшла 20.01.2006

#### ПОЛУЧЕНИЕ И БИОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ КУЛЬТУРЫ ТКАНЕЙ ГОРЕЧАВКИ БЕССТЕБЕЛЬНОЙ (*GENTIANA ACAULIS L.*)

Н. М. Страшнюк<sup>1</sup>, Е. Н. Леськова<sup>1</sup>,  
В. Н. Мельник<sup>2</sup>, В. А. Кунах<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Тернопольский национальный педагогический университет имени Владимира Гнатюка, 46027, Украина, г. Тернополь, ул. М. Кривоноса, 2, [strashniuk@mail.ru](mailto:strashniuk@mail.ru);

<sup>2</sup>Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, 03143, Украина, г. Киев, ул. Акад. Заболотного, 150, [kunakh@imbg.org.ua](mailto:kunakh@imbg.org.ua)

Получено культуру тканей *G. acaulis*, способную к длительному росту *in vitro*. Исследовано динамику прироста биомассы каллуса и синтеза в нем ксантонов и флавоноидов; обнаружено обратно пропорциональную зависимость между этими показателями. Установлено, что содержание ксантонов и флавоноидов было максимальным на 40 сутки пассажа и в несколько раз превышало такое в корнях и надземной части интактных растений *G. acaulis*. Обсуждается возможная связь между способностью каллусных тканей к синтезу биологически активных веществ и их генетической стабильностью.

*Ключевые слова:* *Gentiana acaulis*, культура тканей растений, ксантоны, флавоноиды.

#### OBTAINMENT AND BIOCHEMICAL ANALYSIS OF *GENTIANA ACAULIS L.* TISSUE CULTURE

N. M. Strashniuk<sup>1</sup>, O. M. Les'kova<sup>1</sup>,  
V. M. Mel'nyk<sup>2</sup>, V. A. Kunakh<sup>2</sup>



'Ternopil' National  
Volodymyr Hnatiuk Pedagogical University,  
46027, Ukraine, Ternopil', M. Kryvonosa str., 2,  
*strashniuk@mail.ru*;

<sup>2</sup>Institute of Molecular Biology and Genetics,  
NAS of Ukraine,  
03143, Ukraine, Kyiv,  
Acad. Zabolotnogo str., 150,  
*kunakh@imbg.org.ua*

Tissue culture of *G. acaulis* capable to long-term maintenance *in vitro* has been generated. Dynamics of the callus biomass surplus

and synthesis of the xanthonenes and flavonoids in it was studied; inversely proportional dependence between them was established. Content of xanthonenes and flavonoids was found to be maximal on the 40-th day of passage and several time exceeded that in roots and above-ground section of intact *G. acaulis* plants. Putative correlation between the ability of the callus tissues to the biologically active substances synthesis and their genetic stability has been discussed.

**Key words:** *Gentiana acaulis*, plant tissue culture, xanthonenes, flavonoids.

УДК 633.854.54

## **ВЛИЯНИЕ ФИТОГОРМОНОВ НА КАЛЛУСОГЕНЕЗ В КУЛЬТУРЕ ПЫЛЬНИКОВ МАКА МАСЛИЧНОГО**

В. В. СТРЕЛЬНИКОВА, А. И. СОРОКА

Институт масличных культур УААН,  
г. Запорожье

*Изучено влияние сред с различным содержанием фитогормонов 2,4-Д и кинетина на инициацию каллусогенеза и новообразований на пыльниках мака масличного. Выявлены варианты сред, на которых наблюдали морфологические изменения пыльников, каллусогенез на самом пыльнике и на тычиночной нити. Наиболее активно данные процессы проходили на трёх средах, где 2,4-Д и кинетин находились в соотношении 1 : 1, 1 : 2 и 1 : 4. На средах, где присутствовал только кинетин (без 2,4-Д), независимо от концентрации, новообразований не наблюдалось.*

*Ключевые слова:* пыльники мака масличного, регенерация, каллус

**ВВЕДЕНИЕ.** Сегодня селекция мака масличного направлена на создание высокопродуктивных и высокомасличных сортов и гибридов, характеризующихся низким содержанием наркотических алкалоидов (менее 0,15%), что не позволяет изготавливать наркотические вещества [1].

В мире уже выведены такие сорта мака, которые имеют очень низкое суммарное содержание алкалоидов, и морфина в частности. Так, в Польше выведены сорта Przemko, Michaiko и Mieszko (содержание морфина <0,05–0,04%), в Индии – сорт Sujata [2].

Результативность селекционной работы в значительной степени зависит от наличия разнообразного исходного материала, в частности источников хозяйственно-ценных признаков и от возможности быстро создавать константные формы, не расщепляющиеся в последующих поколениях.

Для нашей работы использовался один из перспективных биотехнологических приемов – метод культуры пыльников. Данный метод применяется, в основном, для получения гаплоидных растений, с помощью которых можно решать ряд генетических и селекционных задач. Основная из них – значительное сокращение срока для получения гомозиготного материала.

Однако, часто в культуре пыльников индуцируются и каллусные ткани. Установлено также, что в определенных условиях культивирования пыльников прямой эмбриоидогенез не всегда приводит к регенерации и формированию гаплоидного проростка. Эмбриоиды на исходной среде могут образовывать каллус и в этом случае регенерация растений происходит через дифференциацию вторичных меристематических зон (вторичный эмбриоидогенез), либо путем органогенеза [3].

Растения-регенеранты, полученные из каллуса, заметно отличаются от исходного материала. Широкий спектр вариантов, образующихся из культивируемого материала, является отражением глубокой клеточной дестабилизации, за которой следуют действие отбора и вторичные наследственные изменения в популяции клеток. Это явление используется для создания новых растительных форм "соматональных вариантов". Наблюдаемая изменчивость имеет большое значение при применении культуры клеток и тканей для улучшения сельскохозяйственных культур [4].

На данный момент времени получение константного материала у представителей семейства *Papaveraceae* через культуру пыльников мало изучено [5]. Поэтому исследования в этом направлении представляются важными и своевременными.

### **Материалы и методы**

Целью нашей работы было исследование влияния состава питательных сред, в частности содержания и соотношения таких фитогормонов как 2,4-Д и кинетин, на инициацию каллусогенеза в культуре пыльников мака масличного.

В качестве материала использовали пыльники мака масличного сорта Кристалл (ИМК УААН). Растения выращивали в условиях фитотрона. Части растений на стадии "склоненного бутона" выдерживали при пониженной температуре в течение одних суток. Далее бутоны стерилизовали в 70%-м этаноле и в хлорамине Б с последующим промыванием стерильной водой. Пыльники на стадии одноядерной пыльцы асептически выделяли и культивировали на агаризованных питательных средах (на основе среды Мурасиге-Скуга), отличающихся соотношением фитогормонов 2,4-Д и кинетин в концентрациях от 0,0 до 4,0 мг/л. При этом использовали стандартные методики, применяемые в экспериментальной биотехнологии [6, 7]. В дальнейшем пыльники с новообразованиями пассировали на свежую питательную среду с наиболее оптимальным содержанием ауксина и цитокинина, которое было определено в течение опыта. На протяжении трех месяцев проводили анализ, учитывая морфологию и количество новообразований.

### **Результаты и обсуждение**

При культивировании пыльников мака масличного на средах с различным содержанием и соотношением фитогормонов наблюдали следующие особенности. В течение первых двух недель не отмечали появления процессов каллусообразования, можно было видеть только изменения цвета пыльников – часть из них приобрели сероватый или коричневый цвет. Причем наибольший процент потемнения наблюдался на первых девяти средах, где содержание гормонов было наименьшим (табл.). Число потемневших

пыльников постепенно возрастало на протяжении всего опыта.

Явные морфологические изменения начались с третьей недели культивирования пыльников. Можно выделить 4 типа изменений: новообразования на пыльнике, каллус на тычиночной нити, новообразования невыясненного типа и набухание пыльников. Стенки таких набухших пыльников стали прозрачными, сильно оводнились, сами пыльники уве-

личились в размерах, нарушилась целостность тканей пыльников. В дальнейшем на них образовывался каллус. Такие изменения наблюдались на средах № 10, 11 и 15 с частотой 27,3, 13,3 и 9,3% соответственно (см. табл., рис.).

Новообразования на пыльниках появились на третьей неделе культивирования на средах № 12–15 и 20 в виде небольшого плотного образования, растущего из щели на стенке пыльни-

**Таблица.** Влияние фитогормонов 2,4-Д и кинетина на процесс инициации новообразований в пыльниках мака

Вариант среды			Посажено пыльников, шт.	Новообразования на пыльнике		Каллус на тычиночной нити		Новообразования невыясненного типа	
№ п/п	2,4-Д	Кин		%	Ош.	%	Ош.	%	Ош.
1	0,0	0,1	48	0		0		0	
2	0,0	1,0	61	0		0		0	
3	0,0	2,0	24	0		0		0	
4	0,0	4,0	52	0		0		0	
5	0,1	0,0	60	0		0		0	
6	0,1	0,1	38	0		0		0	
7	0,1	1,0	54	0		9,3	3,94	0	
8	0,1	2,0	54	0		0		0	
9	0,1	4,0	55	0		0		0	
10	1,0	0,0	55	0		0		0	
11	1,0	0,1	45	0		4,4	3,07	0	
12	1,0	1,0	47	12,5	4,82	31,9	6,80	8,5	4,07
13	1,0	2,0	46	6,5	3,64	30,4	6,78	17,4	5,59
14	1,0	4,0	45	22,2	6,20	20,0	5,96	11,1	4,68
15	2,0	0,0	86	0		0		0	
16	2,0	0,1	66	0		0		0	
17	2,0	1,0	39	0		12,8	5,35	0	
18	2,0	2,0	45	0		6,7	3,72	0	
19	2,0	4,0	60	0		0		0	
20	4,0	0,0	49	4,1	2,83	0		12,2	4,68
21	4,0	0,1	49	0		0		0	
22	4,0	1,0	50	0		0		0	
23	4,0	2,0	67	0		34,3	5,80	0	
24	4,0	4,0	54	0		0		1,9	1,83



Рисунок. Новообразование на пыльнике мака масличного.

ка (рис.). При дальнейшем пассаже пыльников с новообразованиями сами пыльники потемнели, а новообразования прекратили развитие.

На средах 10–14, 17, 18 и 23 наблюдалось развитие каллуса из соматических тканей тычиночной нити. Эти изменения отмечали также начиная с третьей недели культивирования пыльников, и со временем объем каллусной массы увеличивался. К концу 3-го месяца культивирования часть таких каллусов потемнела, часть – не изменила своего естественного желтовато-белого цвета. На средах № 13 и 23 наблюдался процесс соматического эмбриогенеза: на поверхности рыхлого желтоватого каллуса появились глобулярные структуры белого цвета, резко отличающиеся по внешнему виду от общей каллусной массы. При пересадке данные структуры легко отделялись от каллуса и друг от друга. Результаты опыта суммированы в таблице.

### Выводы

Изучено влияние сред с различным содержанием фитогормонов 2,4-Д и кинетина на инициацию каллусогенеза и новообразований на пыльниках мака

масличного. Выявлены варианты сред, на которых наблюдали морфологические изменения пыльников, каллусогенез на самом пыльнике и на тычиночной нити. Наиболее активно данные процессы проходили на трёх средах, где 2,4-Д и кинетин находились в соотношении 1 : 1, 1 : 2 и 1 : 4. На средах, где присутствовал только кинетин (без 2,4-Д), независимо от концентрации, новообразований не наблюдалось.

Следует отметить, что полученные новообразования в дальнейшем не развивались, поэтому необходима последующая оптимизация состава питательных сред для культивирования пыльников мака.

### Список литературы

1. Гайдаш В. Д. Мак. Посібник. – Луцьк: МКФ “Християнське життя”, 2002. – 184 с.
2. Sharma J. R., Lal R. K., Gupta A. P., Misra H. O. et al. Development of non-narcotic (opiumless and alkaloid-free) opium poppy *Papaver somniferum* // Plant. Breed. – 1999. – 118. – № 5. – P. 449–452.
3. Грищенко Е. И., Блюм Я. Б. Особенности эмбрионного развития *in vitro* пыльцевых зерен *Brassica napus* // Цитология и генетика. – 2001. – № 5. – С. 65–73.
4. Кунах В. А. Биотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіологічно-біохімічні основи. – К.: Логос, 2005. – 730 с.
5. Elbern V. Antherenkultur und Regeneration haploider Pflanzen von Mohn (*Papaver somniferum*) // Landbauforsch. Volkenrode. – 1984. – 34. – № 1. – S. 63–66.
6. Калинин Ф. Л., Сарнацкая В. В., Полищук В. Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. – К.: Наук. думка, 1980. – 488 с.
7. Бутенко Р. Г. Биотехнология растений: культура клеток. – М.: ВО “Агропромиздат”, 1989. – 279 с.

Представлено Т. Н. Чеченовой  
Поступила 20.01.2006

ВПЛИВ ФІТОГОРМОНІВ  
НА КАЛЮСОГЕНЕЗ  
В КУЛЬТУРІ ПИЛЯКІВ МАКУ ОЛІЙНОГО

В. В. Стрельникова, А. І. Сорока

Інститут олійних культур УААН,  
м. Запоріжжя

Досліджено вплив середовищ з різним вмістом фітогормонів 2,4-Д та кінетину на ініціацію калюсогенезу і новоутворень на пиляках маку олійного. Виявлено варіанти середовищ, на яких спостерігали морфологічні зміни пиляків, калюсогенез на самому пиляку і на тичинковій нитці. Найактивніше ці процеси проходили на трьох середовищах, де 2,4-Д і кінетин знаходились у співвідношенні 1 : 1, 1 : 2 і 1 : 4. На середовищах, де був тільки кінетин (без 2,4-Д), незалежно від концентрації, новоутворень не спостерігали.

*Ключові слова:* пиляки маку олійного, регенерація, калюс.

CONTRIBUTION OF PHYTOHORMONES TO  
CALLUSOGENESIS IN ANHER CULTURE OF  
POPPY OIL-YIELDING

Strelnikova V.V., Soroka A. I.

Institute of Oil-yielding cultures UAAS  
Ukraine, Zaporizhia

Contribution of nutrient media to harbor differing 2,4-D and kinetin composition to initiation of callusogenesis and neoplasm formation on Poppy oil-yielding anthers has been studied. Nutrient media variants to exhibit anther morphological changes, callusogenesis on the anther itself and on the anther thread. Were identified. Most actively these events took place on three media, where 2,4-D and kinetin showed ratios 1 : 1, 1 : 2 and 1 : 4. Nutrient media to harbor exclusively kinetin (with 2,4-D omitted) independently on its concentration neoplasm formation failed to occur. The neoplasms generated, however, further stopped to develop, that's why subsequent optimization of the nutrient media composition for poppy anther culturing is needed.

*Key words:* Poppy oil-yielding, anther, callusogenesis.

УДК: 575.113. 575.224

## ЕТАПИ РОЗВИТКУ В УКРАЇНІ МОЛЕКУЛЯРНОЇ ГЕНЕТИКИ БАКУЛОВІРУСІВ

І. П. КОК, Л. І. СТРОКОВСЬКА, Е. А. КОЗЛОВ, О. П. СОЛОМКО

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,  
Україна, 03143, Київ, вул. Акад. Заболотного, буд. 150,  
alexei@imbg.org.ua

*В огляді, присвяченому сторіччю з дня народження академіка С. М. Гершензона, фундатора української бакуловірусології, розглянуто досягнення українських вчених у вивченні будови та біології бакуловірусів, структури їх ДНК та вірусного білка полієдрину, створення вітчизняної бакуловірусної експресійної системи синтезу гетерологічних білків.*

*Ключові слова: бакуловіруси, вірусного білка полієдрин, бакуловірусологія*

**Б**акуловіруси, до яких належать віруси ядерного полієдрозу (ВЯП) і гранульозу (ВГ) – численне сімейство вірусів комах. Вони цікаві з погляду фундаментальної науки і важливі для практики. По перше, бакуловіруси є перспективними моделями для вивчення таких загальних питань молекулярної біології і генетики, як реплікація кільцевих молекул ДНК, структурно функціональна організація геномів, регуляція транскрипції, природа вірусної латентності. По друге, бакуловіруси беруть участь в обмеженні чисельності шкідливих комах, а тому їх використовують у якості безпечних для людини і природи вірусних інсектицидів при захисті рослин у сільському і лісовому господарствах. По третє, інфекційна кільцева рекомбінантна ДНК бакуловірусів може застосовуватися для ефективного біотехнологічного синтезу ряду білків і великих пептидів. Для практичного використання необхідне знання структури і властивостей окремих вірусів, у тому числі і на молекулярному рівні.

Основи молекулярної генетики бакуловірусів були закладені в АН УРСР на моделях декількох ВЯП і успішно розвивалися в СРСР і в інших країнах. Мета даної статті – коротко розглянути історію розвитку цього наукового напрямку, що є логічним продовженням систематичних біологічних, вірусологічних і генетичних досліджень, що наприкінці 40-х – початку 50-х років започаткував академік АН УРСР С. М. Гершензон, уперше підійшовши до дослідження бакуловірусів з молекулярно-генетичних позицій.

## Початковий етап роботи з бакуловірусами

Вперше в історії науки вивчення ролі ДНК у генетичних процесах було почато С. М. Гершензоном у 1937 р., а в 1939 р. він відкрив у дослідях на дрозофілі мутагенність тимусної ДНК. Ці дослідження були продовжені після Великої Вітчизняної війни і привели до висновку про те, що ДНК бере участь у репродукції генів.

Молекулярно-генетичний підхід С. М. Гершензон застосував і до вивчення бакуловірусів. Ці ентомопатогенні віруси потрапили в поле його зору наприкінці 40-х – початку 50-х років при розробці їм питань акліматизації дубового шовкопряда в Україні і з'ясуванні причин спалахів вірусного захворювання – жовтяниці (ядерного поліедрозу) цієї корисної комахи. Результати вивчення епізоотології, гістопатології і цитології ядерного поліедрозу, а потім самого вірусу і його латентності дозволили С. М. Гершензону запропонувати способи боротьби з жовтяницею [1].

У цей період у світовій літературі інтенсивно обговорювалася нова ідея про роль ДНК як "речовини спадковості", носія генетичної інформації. З великим інтересом було зустрінуте повідомлення А. Херши і М. Чейз у 1952 р. про те, що фаг, в процесі інфікування бактерії, вводить у неї свою ДНК із мінімальною кількістю білка, а основна маса білка оболонки фага залишається зовні. Раніше були відомі дослідження О.Ейвери і співавтор., що у 1944 р. показали участь ДНК у явищі генетичної трансформації у бактерій. У 1953 р. з'явилася стаття Дж Уотсона та Ф Кріка, присвячена розшифруванню структури ДНК. Однак на той час ще не була виявлена інфекційність цілком вільних від

білків вірусних нуклеїнових кислот [НК]: про інфекційну РНК ВТМ стало відомо в 1956 р., а про інфекційну ДНК вірусу поліоми у 1956 р. Лише в 1955 р. були проведені дослідження по реконструкції ВТМ, результати яких показали, що генетичні властивості вірусу визначаються НК, а не білком.

На початку 50-х років стали відомими біологічні властивості бакуловірусів, факти існування їх в активній або латентній формі, деякі біохімічні та електронномікроскопічні характеристики, отримані в основному Г. Бергольдом: інфекційність паличкоподібних віріонів, а не білка поліедрів, присутність ДНК у віріонах, входження інфекційних віріонів (близько 5%) до складу поліедрів – білкових тіл включень, амінокислотний склад і деякі властивості білка поліедрів. Грунтуючись на цих уривчастих даних, С. М. Гершензон у 1954 р. поставив дослідження по відтворенню вірусу ядерного поліедрозу (ВЯП) із ДНК і неінфекційного білка і одержав активний поліедрений вірус [2]. ДНК без білка в цих дослідженнях не викликала розвитку ядерного поліедрозу – захворюваність оброблених препаратом ДНК комах була на рівні контролю, тобто на рівні спонтанного поліедрозу через активацію латентного вірусу. Такий же результат був і в наступних дослідженнях Г. Бергольда, про які він повідомив на IV Міжнародному біохімічному конгресі у Відні в 1958 р. Ці дослідження С. М. Гершензона з ДНК вірусу стали відправною точкою подальших досліджень інфекційності препаратів ДНК вірусного походження.

Вирішуючи одну з бакуловірусних проблем, поставлену Г. Бергольдом ще в 1947 р. – проблему походження білка поліедрів, С. М. Гершензон і до неї підійшов з генетичних позицій: у дослідженнях по перехресному зараженню комах різних видів вірусами, що відрізняли-



ся формою поліедрів, він з'ясував, що ця властивість поліедрів залежить в основному від вірусу, а не від заражених клітин [3]. Звідси виходило, що генетична інформація, яка визначає властивості поліедрів, закодована у вірусній ДНК, а не в ДНК клітини. Власне кажучи, ідея С. М. Гершензона про те, що структура поліедрів визначається структурою поліедрину, що залежить від вірусного гена, лягла в основу всієї роботи з білками бакуловірусів, що у 1961 р. почав професор С. Б. Серебряний зі співробітниками.

С. М. Гершензон визначив, що білок поліедрів кодується геномом вірусу. Він прийшов до такого висновку не тільки на основі результатів дослідів по перехресному зараженню комах, але й завдяки тому, що одержав мутанти вірусу, що відрізняються за формою поліедрів [4]. Порівнюючи свої експериментальні дані, отримані при вивченні латентного вірусоносійства у комах, з явищем лізогенії у бактерій, С. М. Гершензон зробив висновок, що латентність бакуловірусів може бути пов'язана з інтеграцією генома вірусу з геномом клітини хазяїна [5]. Вивчення цього питання за допомогою біологічних методів не привело до його рішення, але ідея С. М. Гершензона виявилася надалі стартовою точкою для розвитку досліджень латентності ВЯП на молекулярному рівні.

У цей початковий період досліджень розроблено різні варіанти методів виділення препаратів НК із здорових і заражених вірусом комах, проведено ряд досліджень нуклеотидного складу і властивостей цих НК за допомогою біохімічних і фізичних методів [6]. З 1960 р. С. М. Гершензон зі співробітниками почав розробляти проблему передачі генетичної інформації з РНК на ДНК на моделі ВЯП [7]. Однак тоді

ще не було технічних можливостей для розвитку як цих досліджень, так і для дослідів Л. Кавальєрі (1963 р.) з ДНК-полімеразою кишкової палички, що виявляла, начебто, незвичайні властивості прискорення синтезу ДНК на РНК (вірніше полінуклеотидів), та Г. Темина у 1964 р., який виявив вірусоспецифічну ДНК у складі генома клітини при її зараженні вірусом саркоми Рауса, який містить РНК. Тільки в 1970 р. Г. Темин зміг знайти фермент, що прискорює синтез ДНК на РНК і названий В. О. Енгельгардтом ревертазою.

### **Другий період вивчення бакуловірусів**

На початку другого періоду вивчення бакуловірусів С. М. Гершензон сформулював проблему різнобічного фундаментального дослідження бакуловірусів на різних рівнях, їх репродукції і взаємодії з клітинами з метою пошуків шляхів боротьби з вірусними інфекціями корисних комах і використанням вірусів для зниження чисельності комах шкідників [8]. Цей період досліджень бакуловірусів на молекулярному рівні характеризується виявленням інфекційності ДНК і вивченням її особливостей в препаратах ДНК вірусного походження при ядерному поліедрозі шовковичного шовкопряда, виявленням величезної кільцевої ДНК цього вірусу, розробкою нової моделі структури віріона, визначенням дійсного розміру молекул поліедрину.

В перших препаратах НК, одержаних із інфікованої гусені тутового шовкопряда (ТШ) ДНК не була інфекційною. В подальшому, застосовуючи м'яку депротеїнізацію вдалося одержати препарат інфекційної ДНК. Їхня активність зникла після обробки ДНКазою і на неї не діяв прогрів при

температурі 70 і навіть 100 °С з наступним охолодженням на льоду (умови денатурації лінійної ДНК). Витримування денатурації без втрати інфекційності вказувало на кільцеву структуру інфекційної ДНК [9]. Приблизно в цей же час К. Онодера і співробітники одержали інфекційну ДНК з очищеного ВЯП ТШ і знайшли, що її середня молекулярна маса не перевищує  $2 \times 10^6$  дальтонів. На невелику молекулярну масу вірусної ДНК вказували і дані Г. Бергольда, але цьому, начебто, суперечили розрахунки, засновані на вмісті ДНК у віріонах. Здавалося, що Г. Бергольд правий, розміщуючи у своїй відомій моделі віріона палочковидну серцевину, що складається із субодиниць (а в них повинні були міститися невеликі молекули ДНК). Створювалося враження, що геном ВЯП складається не з однієї молекули ДНК, як в інших вірусів, а з декількох чи навіть багатьох кільцевих молекул.

Однак у 1967 р. при вивченні інфекційної віріонної ДНК із застосуванням електронної мікроскопії нами були знайдені величезні (близько 100 Мда) кільцеві молекули ДНК [10]. У той час геном у вигляді кільця (набагато більшого, ніж у ВЯП) був відомий тільки у бактерій. У 1967 р. у бактерій знайшли велику кільцеву плазмидну ДНК. Але позахромосомні ДНК у клітинах тварин являли собою невеликі мітохондріальні кільцеві ДНК (10 Мда); віруси ж групи папова, що розмножуються, як і ВЯП, у ядрах клітин містили ще меншу кільцеву ДНК. Розміри і форма ДНК ВЯП здавалися якимось виключенням, якщо не артефактом.

Електронна мікроскопія в сполученні з різними способами впливу на віріони ВЯП ТШ дала також дуже цікаві результати, що вказували на принци-

пові відмінності видимої структури віріона від її моделей, запропонованих раніше Г. Бергольдом, А. Кригом або М. Понсеном. Виходячи зі своїх даних, Е. А. Козлов [11] запропонував нову модель: усередині віріона він розташував одну згорнуту велику кільцеву ДНК, з'єднану з білком і одягнену білковим трубчастим капсидом (нуклеокапсид), а зовні мембрану. Ця модель з невеликими змінами в загальному вигляді визнається і в даний час.

У цей же період було з'ясоване і питання про розмір поліедреного білка. Починаючи з робіт Г. Бергольда, накопичилась безліч суперечливих даних про гетерогенність білків, що нібито входять до складу поліедрів і розрізняються за молекулярною масою. Уперше під керівництвом С. Б. Серебряного були розроблені нові методи одержання поліедреного білка і виявилось, що дані про множинність білків – це артефакти, обумовлені руйнуванням одного єдиного білка – поліедрину. Справа в тім, що до складу поліедрів входить лужна протеаза. Якщо її не інактувати, вона руйнує поліедрин, і з'являються поліпептиди різного розміру. Молекулярна маса поліедрину при ядерному поліедролі ТШ виявилася рівної 28 000 дальтонів [12]. Ці результати дуже вплинули на хід дослідження первинної структури поліедрину, що почалося з 1963–1964 р. Змінився і підхід до вивчення інших білків вірусного походження як у нашій країні, так і за кордоном.

### Третій період розвитку молекулярної генетики бакуловірусів

Третій період характеризується залученням у коло досліджень структури нових бакуловірусних ДНК і білків, спро-

бами вивчення деяких сторін реплікації й експресії генома бакуловірусів, розшифровкою первинної структури поліедрини і закінчується визначенням меж коливань розмірів геномів цих вірусів. Експериментальні матеріали вчених нашого інституту і закордонних дослідників проаналізовані в першій монографії по молекулярній біології і генетиці бакуловірусів [13]. У комплексному вивченні вірусних НК брали участь біохіміки, вірусологи і фахівці з культур клітин, фахівці з електронної мікроскопії. Специфічне кропітке визначення амінокислотної послідовності поліедринів продовжували співробітники С. Б. Серебряного.

У 1972 р. були опубліковані наші дані про кільцеву структуру і велику молекулярну масу ДНК другого з вірусів ядерного поліедрозу вірусу великої вощаної молі (БВМ). Були розроблені методи одержання й очищення цього вірусу, що знаходиться в клітинах у вільному вигляді (вільний вірус), тому що поліедри виявилися нестійкими, з них важко було вилучити вірус, а потім і ДНК у нативному стані. Як і у ВЯП ТШ інфекційність ДНК якого перевіряли і на культурах клітин, ДНК із ВЯП БВМ була інфекційною для личинок БВМ чеської лінії, у яких не буває, як і в культурах клітин, спонтанного поліедрозу. У молекул ДНК ВЯП БВМ вивчався і нуклеотидний склад, і різні фізико-хімічні показники.

З 1972 р. дослідження макромолекулярної структури бакуловірусних ДНК почалися за кордоном: спершу в лабораторії М. Саммерса (США), а потім і в деяких інших. За досить короткий термін часу було обстежено близько 30 бакуловірусів різних видів. В усіх випадках ДНК була кільцевою, її молекулярна маса коливалася від 60 до 100 МДа, при обережному виділенні і цен-

трифугуванні в градієнті щільності хлористого цезію з бромистим етидієм часто виявлялися суперспіралізовані, ковалентно замкнуті молекули ДНК (до 30%). У наших дослідах теж була знайдена ковалентно замкнута ДНК, як у ВЯП БВМ, так і ТШ [14], непарного [15] і кільчастого шовкопрядів [16].

Однак результати всіх цих досліджень кільцевої структури ДНК і її контурної довжини, коефіцієнта седиментації не відповідали на запитання про розмір геному бакуловірусів: кільцева ДНК могла виявитися полігеномною. Навіть визначення інфекційності після денатурації різних форм молекул вірусної ДНК, де було показано, що тільки кільцеві ДНК інфекційні (відкрита форма і різні форми ковалентно замкнутих молекул) для личинок БВМ чи культур клітин, що перевиваються, а не лінійні, не відповіло на це питання. Тільки вивчення кінетики реасоціації вірусної ДНК, а також проведення її рестрикційного аналізу показали, що розмір геному практично збігається з розміром кільцевої вірусної ДНК [13, 17].

### **Сучасний період розвитку досліджень бакуловірусів**

Дослідження бакуловірусів на молекулярному рівні в цьому періоді почалися з фізичного картування геномів бакуловірусів за допомогою специфічних бактеріальних ендонуклеаз – рестриктаз. Результати такого картування в 1979 р. підтвердили кільцеву структуру їх геномів. Була вивчена динаміка синтезів вірусоспецифічних білків, ферментів і ДНК не на цілих комах, як раніше, а на культурах клітин. Факти і висновки, отримані раніше співробітниками нашого інституту, були підтверджені за кордоном. Так, у 1980 р.

знайдено перші докази правильності генетичних даних С. М. Гершензона про кодування білка поліедрів вірусним геномом і його ж твердження про зв'язок форми поліедрів зі структурою поліедрину. Було знайдено білок, що входить до складу серцевини віріона. Цей білок був включений у модель віріона Е. А. Козловим ще в 1967 р. З'явилися також підтвердження наших даних про зв'язок структури й інфекційності різних форм віріонної ДНК.

У нашому інституті були вивчені поліедрини ВЯП комах одинадцяти різних видів і один гранулін [18]. Виявилося, що кожний з цих білків тіл включень складається з одного поліпептидного ланцюга з молекулярною масою 28 000 дальтонів (у гранульозу – 27 500 дальтонів). Лужна протеаза, що присутня у поліедрах, розщеплює поліедрини в тих самих чи близьких ділянках, але з різною ефективністю. У гранулах при гранульозі озимої совки (ОС) присутня більш активна протеаза, ніж у поліедрах. Амінокислотні склади всіх досліджених поліедринів та грануліна дуже подібні. Пептидні карти триптичних гідролізатів п'яти поліедринів мало відрізняються один від одного, але великі розходження помітні між поліедрином та грануліном. Між грануліном і поліедринами виявлені принципові розходження в амінокислотних послідовностях біля N-кінців: у поліедринів цей кінець захищений від дії пептидаз, а в грануліна – не захищений. Більш детально ступінь гомології різних поліедринів у порівнянні з грануліном була виявлена у первинній структурі. Знайдено константні і варіабельні ділянки амінокислотних послідовностей. Показано, що ступінь гомології між поліедринами дуже висока, не нижче 82%, а між поліедринами і грануліном не перевищує 60%.

Дослідження зчеплених олігомерних форм (катенанів) вірусної ДНК ВЯП було першим етапом у розробці структурного аспекту реплікації бакуловірусного геному. Як відомо, іноді катенани виявляються в препаратах вірусної ДНК. З'ясувалося, що вони походять, у випадку ВЯП БВМ, із вірусоподібних подовжених вірусних часточок подвійної чи потрійної довжини [19]. Подібні ж катенани і зчеплені форми, навіть з більшою кількістю кілець знайдені нами у ВЯП кільчастого шовкопряда. У вірусів сімейства папова подвійні катенани в заражених вірусом клітинах розглядаються як реплікативні форми ДНК на останньому етапі реплікації перед роз'єднанням дочірніх кільцевих молекул. У бакуловірусів катенани знаходяться у фракції вільного, а іноді й включеного в поліедри вірусу.

Наявність катенанів свідчить на користь реплікації вірусної ДНК за моделлю Кернса, через проміжні тетраструктури і це добре пов'язується з виявленням кількох місць ініціації реплікації.

Аналіз первинної структури геномної ДНК бакуловірусів за допомогою ряду фізикохімічних методів засвідчив про відсутність блочної будови геному та унікальність нуклеотидної послідовності, що не містить значних або множинних повторів.

Дуже цікавим і важливим у теоретичному і практичному відношеннях є питання про те, як реплікується ДНК латентного вірусу. У 1981 р. нами було розпочато дослідження і цієї проблеми, поставленої С. М. Гершензоном. Використовували підходи, які використовувались для рішення аналогічної задачі у онкогенних вірусів хребетних. Для визначення кількості геномів вірусу, що приходить на диплоїдну клітин-

ну застосували метод прискорення реасоціації міченої вірусний ДНК чи її рестрикційних фрагментів у присутності препаратів клітинної ДНК. Виявлено, що в здорових лялечках та ембріонах ТШ міститься декілька вірусних геномів на клітину, що було характерним і для личинок БВМ із різних її популяцій. Цікаво, що вірусна ДНК була знайдена й у личинок БВМ чеської (празької) лінії в умовах досліду, при яких виявляється 50–80% унікальних нуклеотидних послідовностей геному вірусу. У комах цієї лінії спонтанного поліедрозу не буває, а тому вважалось, що вони не містять латентного вірусу.

Ковалентне з'єднання нуклеотидних послідовностей вірусної і клітинної ДНК при латентній інфекції у ТШ було виявлено методом Саузерна [20,21], а в БВМ – методом "мережі" по Вармусу в сполученні з визначенням кінетики реасоціації ДНК [22]. Ці дані вказують на інтеграцію геному вірусу в геном клітини і реплікацію ДНК латентного вірусу в складі геному клітини, що підтверджує припущення С. М. Гершензона. Додаткові докази можуть бути отримані методами генної інженерії. Кількість і природа граничних районів стикування вірусних і клітинних нуклеотидних послідовностей, питання регуляції латентного стану ВЯП і можливої експресії геному латентного вірусу – це позначки подальшого дослідження латентності бакуловірусів на молекулярному рівні.

Логічним розвитком досліджень з молекулярної біології і генетики бакуловірусів в Інституті молекулярної біології і генетики НАН України стало визначення фізичних карт геномів вірусів ядерного поліедрозу *Galleria mellonella* [Gm], *Bombyx mori* [Bm][23], *Malacosoma neustria* [Mn] [24], локалізації у

геномах двох з них гена поліедрину та його функціонально важливих ділянок [25]. У процесі цих досліджень було виявлено нестабільність геному ВЯП Мл та новий тип природної модифікації бакуловірусного геному. Для бакуловірусів відомо кілька типів геномних перебудов при тривалому пасируванні в культурі клітин. Деякі з них після серії пасажів мали вставки у вигляді транспозоноподібних елементів геному клітини хазяїна, чи дуплікованих ділянок вірусного геному, або з'являлися делеційні мутанти. Виявлена модифікація геному ВЯП Мл проявлялася через 35 пасажів у виникненні "гарячої точки" ділянки геному, специфічної для дії всіх досліджуваних рестриктаз. Ця модифікація, скоріше за все, є наслідком взаємодії вірусу з непермісивним хазяїном [26].

### Практичне значення фундаментальних досліджень

С. М. Гершензон завжди вважав, що глибоке фундаментальне вивчення бакуловірусів зрештою приведе до практично важливих результатів. Результати фундаментального вивчення співробітниками С. М. Гершензона та в інших лабораторіях структури й інфекційності ДНК ВЯП, первинної структури поліедрину і його гена, встановлення кільцевої структури геномної ДНК, а також картування геному ВЯП каліфорнійської совки (США) привели зрештою до розробки нового вектора на базі цього бакуловіруса. У культурі клітин комах в умовах котрансфекції вірусною і плазмідною ДНК з інтегрованим чужорідним геном під промотором гену поліедрину відбувається рекомбінація, результатом якої є поява вірусу, що містить рекомбінантну ге-

номну ДНК з цільовим геном. У клітинах, заражених рекомбінантним вірусом з вбудованим у його ДНК чужим геном замість частини гена поліедрину, відбувається інтенсивний синтез білка, первинна структура якого кодується чужерідним геном.

Починаючи з 1983 року все більшого розповсюдження набувають бакуловірусні експресійні системи (БЕС), що являють собою лінії клітин або організмів комах, інфіковані рекомбінантними бакуловірусами з інтегрованими гетерологічними генами. Слід відзначити, що багато білків, для яких не було досягнуто високого рівня експресії в інших геноінженерних системах, у БЕС експресуються в кількостях, що в 10–100 разів перевищують такі, одержані в згаданих системах.

Нами була створена вітчизняна бакуловірусна геноінженерна система на базі ВЯП Мл та культури клітин дубового шовкопряду МСАР1[27]. У нашому відділі було сконструйовано серію так званих "транспортних векторів" для клонування гетерологічних генів під сильним промотором гена поліедрину та сконструйовано рекомбінантні віруси з генами бактеріальної  $\beta$ -галактозидази, пролактину людини та інші. Дослідження ефективності новоствореної бакуловірусної геноінженерної системи з модельним геном бактеріальної  $\beta$ -галактозидази показало її високу ефективність та перспективність як базової для синтезу рекомбінантних білків. Подальші зусилля було зосереджено на одержанні рекомбінантного білка-гормону людини пролактину. Використовуючи один з модифікованих транспортних векторів – плазмиду рМ1.2, вдалося одержати високопродуктивний рекомбінантний бакуловірус, який у культурі клітин комах екс-

пресував гормон в технологічних кількостях [28]. В подальшому було вдосконалено методи очищення рекомбінантного білка [29] та одержано його секрецію в культуральне середовище [30].

Результати досліджень макромолекулярної структури геному ряду бакуловірусів, виконаних у відділі біохімічної генетики ІМБіГ НАНУ разом з результатами досліджень вірусних білків у відділі С.Б. Серебряного дозволили завершити багаторічну дискусію про морфологію бакуловірусів створенням моделі структури бакуловірусного віріону, яка дійсна і сьогодні. Отримані дані стали основою для розвитку нового напрямку – дослідження молекулярних механізмів репродукції бакуловірусів, удосконалення геноінженерних бакуловірусних систем, дослідження молекулярних механізмів реплікації геному бакуловіруса, дослідження нових векторних властивостей бакуловірусів.

#### Перелік літератури

1. Гершензон С. М. Про причини епізоотій жовтяниці дубового шовкопряду // Екологія дубового шовкопряду. – К.: Вид-во АН УРСР. – 1954. – С. 90–135.
2. Гершензон С. М. Утворення активного поліедреного вірусу з нуклеїнової кислоти і білка поза організмом // Доповіді АН УРСР – 1956. – № 5. – С. 492–493.
3. Гершензон С. М. О видової специфічності вірусів поліедреної болізни насекомых // Микробиологія. – 1955. – 24. – вып. 1. – С. 90–98.
4. Гершензон С. М. Мутация полиедренных вирусов // ДАН СССР. – 1959. – 128, № 3. – С. 522–525.
5. Гершензон С. М. Явление латентности у полиедренных вирусов насекомых // Журн. общ. биологии. – 1961. – 22, № 1. – С. 32–44.

6. Кок И. П. Нуклеиновые кислоты насекомых и их вирусов // К.: Наук. думка. – 1973. – С. 227.
7. Гершензон С. М., Кок И. П., Вітас К. Й., Добровольська Г. М., Скуратовська І. Н. Утворення за допомогою РНК хазяїна вірусу, що містить ДНК // Доповіді АН УРСР. – 1960. – № 12. – С. 35.
8. Гершензон С. М. Дослідження вірусів тварин в Академії наук Української РСР // Мікробіол. журнал. – 1967. – 29, № 6. – С. 422–428.
9. Добровольська Г. М., Кок И. П., Смірнова І. А., Чистякова А. В. Біологічна активність препаратів ДНК, виділених із заражених вірусом ядерного поліедрозу тканин шовковичного шовкопряда // Мікробіол. журнал. – 1965. – 27, № 6. – С. 73–77.
10. Кок И. П., Chistiakova A. V., Gudz Gorbana A. P., Solomko A. P. Infectivity and structure of DNA of the virus of nuclear polyhedrosis of the silkworm // In: XIIIth Int Congr. Entomol.: Abstr. Papers (Moscow, Aug. 1968). – Leningrad: Nauka. – 1968. – P. 127.
11. Kozlov E. A., Alexeenko I. P. Electron microscope investigation of the structure of the NPV of the silkworm, *Bombix mori* // J. Insect Pathol. – 1967. – 9, № 3. – P. 413–419.
12. Козлов Э. А., Левитина Т. Л., Серебряный С. Б. и др. Определение молекулярного веса полиэдренного белка тел включений ВЯП тутового шелкопряда // Биохимия. – 1973. – 38, № 5. – С. 1015–1019.
13. Кок И. П., Скуратовская И. Н., Строковская Л. И. Молекулярные основы репродукции бакуловирусов // К.: Наук. думка. – 1980. – С. 176.
14. Скуратовская И. Н., Строковская Л. И., Алексеенко Л. П., Кок И. П. Особенности получения суперспиральной ДНК ВЯП тутового шелкопряда // Вирусные болезни растений и насекомых, Елгава. – Тр. ЛСХА. – Вып. 181. – 1980. – С. 90–93.
15. Черепенко Е. И., Мартыненко Е. И., Кок И. П. Физикохимическое изучение ДНК ВЯП непарного шелкопряда *Port-hetria dispar* // Укр. биохим. журн. – 1984. – 56, № 6 – С. 14–19.
16. Кок И. П., Алексеенко Л. П., Строковская Л. И., Скуратовская И. Н. Репликация генома вируса ядерного полиедроза (ВЯП) // 16-я конф. ФЕБО (г. Москва, июнь 1984 г.): Тез. докл. – М., 1984. – С. 231.
17. Кок И. П., Skuratovskaya I. N. Macromolecular structure of infective genome (DNA) from NPVs infecting *Lepidoptera* // Proc. Intern. colloq. invertebr. pathol. and XIth Ann. meet. Soc. invertebr. pathol. (Prague, Sept. 1117, 1978). – Prague, 1978. – P. 62.
18. Козлов Э. А. Структура и свойства белка тел включений бакуловирусов: Автореф. дис. ... докт. биол. наук. – Киев, 1983. – 43 с.
19. Строковская Л. И., Скуратовская И. Н., Томчук Н. Н., Кок И. П. Вирусоподобные частицы двойной и тройной длины и их связь с кольцевыми сцепленными формами ДНК при ядерном полиедрозе // Вирусные болезни растений и насекомых. – Тр. ЛСХА; Вып. 181. – Елгава, 1980. – С. 101–108.
20. Скуратовская И. Н., Строковская Л. И., Кок И. П. Обнаружение нуклеотидных последовательностей ДНК ВЯП тутового шелкопряда в геноме клеток хозяина при латентной инфекции // Микробиол. журн. – 1982. – 44, № 1. – С. 86–87.
21. Skuratovskaya I., Strokovskaya L., Alexeenko L., Kok I. Replication of baculovirus genome at productive and latent infections: Structural aspects // Sixth Intern. Congr. virol. (Sept. 1–7, 1984). – Sendai, 1984. – P. 334.
22. Мирюта Н. Ю., Строковская Л., Кок И. П., Скуратовская И. Н. Обнаружение ковалентно связанного с ДНК клетки генома бакуловируса у большой вошинной моли пражской линии // Биополимеры и клетка. – 1985. – № 2. – С. 106–108.
23. Строковская Л. И., Менделева Н. В., Кихно И. М. Физическое картирование геномов вирусов ядерного полиедроза тутового шелкопряда и большой

- вощинной моли // Макромолекулы клеток и вирусов.– К.: Наук. думка.– 1986.– С. 101.
24. Строковская Л. И. Физическое картирование генома вируса ядерного полиэдроза кольчатого шелкопряда // Биополимеры и клетка.– 1997.– 13, № 2.– С. 86–89.
25. Petrenko A. I., Strokovskaja L. I., Solomko A. P. Nucleotide sequences of *Malacosoma neustria* nuclear polyhedrosis virus polyhedrin gene // Биополимеры и клетка.– 1994.– 10, № 34.– С. 105.
26. Строковская Л. И., Кихно И. М., Соломко А. П. Новый вид модификации бакуловирусных геномов в культуре клеток насекомых // Доповіді НАН України.– 1997, № 7.– С. 174–179.
27. Строковская Л. И., Веселовский О. В., Кихно И. М., Скуратовская И. Н., Мирюта Н. Ю., Петренко А. И., Соломко А. П. Экспрессивный бакуловирусный вектор на основе вируса ядерного человеческого гена пролактина в клетках насекомых с использованием бакуловирусного вектора на основе вируса ядерного полиэдроза кольчатого шелкопряда // Доповіді НАН України.– 1997.– №1.– С. 166–169.
28. Bartozevicz Z., Szolajska E., Strokovskaja L., Michalik J., Kikhno I., Solomko A. Expression and one-step purification of intracellular human prolactin in insect cells // Protein expression and purification.– 2001.– 22.– P. 242–248.
29. Строковская Л. И., Кихно И. М., Мелешко Р. А., Соломко А. П. Экспрессия секретируемого рекомбинантного пролактина человека в клетках насекомых // Биополимери і клітина.– 2004.– 20, № 4.– С. 325–330.

Представлено Л. Л. Лукаш  
Надійшла 17.01.2006

## ЭТАПЫ РАЗВИТИЯ В УКРАИНЕ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ГЕНЕТИКИ БАКУЛОВИРУСОВ

І. П. Кок, Л. І. Строковская, Э. А. Козлов, А. П. Соломко

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины,  
Украина, 03143, Киев,  
ул. Акад. Заболотного, д. 150,  
alexei@imbg.org.ua

В обзоре, посвященном столетию со дня рождения академика С. М. Гершензона, основателя украинской бакуловирусологии, рассматриваются достижения украинских ученых в изучении строения и биологии бакуловирусов, структуры их ДНК и вирусного белка полиэдрина, создания отечественной бакуловирусной экспрессионной системы синтеза гетерологичных белков.  
**Ключевые слова:** бакуловирусы, вирусный белок полиэдрин, бакуловирусология.

## STAGES OF DEVELOPMENT IN UKRAINE MOLECULAR GENETICS OF BACULOVIRUSES

I. P. Kok, L. I. Strokovskaja, E. A. Kozlov, A. P. Solomko

Institute of molecular biology and genetics of Natl. Acad. Sci. of Ukraine,  
Ukraine, 03143, Kiev, Akad. Zabolotnogo str., 150,  
alexei@imbg.org.ua

In the review devoted to century from birthday of the academician S.M.Gershenzon, founder of Ukrainian baculovirology, the achievement of the Ukrainian scientists in study of a structure and biology baculoviruses, structure them DNA and virus protein polyhedrine, creation of native baculovirus expression system of synthesis geterologous proteins are considered.

**Key words:** baculoviruses, virus protein polyhedrine, baculovirology.



УДК: 575:633.15:113:027.2

## ДНК-ТЕХНОЛОГІЇ В РОСЛИННИЦТВІ УКРАЇНИ

Ю. М. СИВОЛАП

Південний біотехнологічний центр,  
Україна, 65036, Одеса, Овідіопольська дор.,3,  
genom2005@ukr.net

*Обговорено проблеми сучасної біотехнології в рослинництві України. Сучасні біотехнології в рослинництві мають три напрями: використання культури тканин і органів in vitro, ДНК-технології (молекулярні маркери), генно-модифіковані (біотехнологічні) рослини. В Україні не виправдано блоковано створення і використання генно-модифікованих рослин. У той же час успішно розвиваються технології з використанням ДНК маркерів на основі ПЛР-аналізу. ДНК-маркери впроваджені в генетику, селекцію, насінництво і охорону прав на сорти рослин. Створено інформаційний банк даних алельного складу добраних мікросателітних локусів, що характеризує унікальність сортів. Ринок споживання біотехнологічної продукції в Україні не сформований.*

*Ключові слова: біотехнологія, ДНК-технологія, рослинництво*

**В** економіці України рослинництво традиційно посідає суттєве місце. Продукція рослинництва, і перш за все, якісне зерно є об'єктом експорту і ще за минулих часів Україна була "хлібним кошиком Європи". Українські сорти покладені в початок родоводу американських і канадських сортів пшениці. За 100 років селекції рослин методологія поліпшення сільськогосподарських культур зазнала низки значних змін, починаючи з добору з місцевих популяцій на початку 20 століття і закінчуючи другою "зеленою революцією" кінця 20 – початку 21 століть. Перша "зелена революція" відбулась за рахунок впровадження досягнень класичної генетики та інтенсивного використання добрив і хімікатів, що привело до підвищення продуктивності сільськогосподарських культур і створило проблему забруднення навколишнього середовища і ерозії ґрунту. Друга "зелена революція" є продуктом сучасної біотехнології, що базується на досягненнях молекулярної генетики і культури тканин і органів *in vitro*. Важливим моментом є використання генетично обумовленої стійкості до гербіцидів, хвороб і шкідників, що зменшує навантаження рослинництва хімікатами і здешевлює продукцію.

Сучасна біотехнологія привела до значного підвищення ефективності сільського господарства розвинених країн. Використовуючи їх

досвід Китай та Індія, Південно-Африканська Республіка та ряд країн "третього світу" широко впроваджують сучасні біотехнології в рослинництво. Доки Україна перманентно вирішує проблеми політичного й економічного характеру і не виділяє потрібні кошти для розвитку біологічної науки, світове сільське господарство стало принципово новим за рахунок впровадження "хай тек" – біотехнології.

У сучасній агробіотехнології визначилось три основні напрями: генно-модифіковані рослини, молекулярні маркери, культура тканин і органів *in vitro*. Впровадження трансгенних рослин і молекулярних маркерів у селекційну практику сприяло її вдосконаленню і здешевило продукцію рослинництва. Трансгенні рослини займали у 2005 році площу понад 90 мільйонів гектарів і їх посіви з кожним роком розширюються в середньому на 10%. За десять років площа під біотехнологічними (генно-модифікованими) рослинами збільшилась у 50 разів. Використання молекулярних маркерів щорічно приносить прибуток у 15 мільярдів доларів. Запровадження культури тканин *in vitro* для отримання віддалених гібридів і константних дигаплоїдних форм розширило генетичну базу і скоротило строки отримання сортів з 10–12 до 2–5 років.

### Генно-модифіковані рослини

Українські вчені були серед перших у світі, хто досліджував вплив екзогенної ДНК на рослини. Слідом за Сое і Sarkar [1] роботи В. А. Кордюма, В. В. Моргуна [2], Ю. М. Сиволапа [3] характеризували предгенноінженерний період і заклали основу сучасної генної інженерії рослин. Відсутність фінансування з боку

уряду цих досліджень після 1991 року призвело до того, що генно-інженерні роботи в Україні припинились і більшість спеціалістів виїхала на Захід. Уряд України зайняв позицію блокування фінансування досліджень з генної інженерії сільськогосподарських рослин. Це посилилось намаганнями наблизитись до Об'єднаної Європи, яка об'явила мораторій на ГМО. Країни Західної Європи ввели мораторій на ГМО з метою протекції свого ринку від більш дешевих і якісних трансгенних сортів і продуктів їх переробки виробництва США, які випередили Європу в розробці генно-інженерних технологій. У той же час уряди західноєвропейських країн спрямували великі кошти на досягнення паритету зі США з сучасної біотехнології. У 2005 році в Європі вже реєструються продукти і сорти з ГМО, трансгенні рослини вирощуються в Німеччині, Франції, Іспанії і Чеській Республіці, а Україна завдяки короткозорій політиці уряду опинилась на узбіччі магістрального шляху розвитку сучасного рослинництва. Тим часом генно-модифіковані рослини та їх продукти розповсюджуються на території України. Оскільки провідні біотехнологічні центри України не мали змоги розвивати генно-інженерні технології і не мають сучасного спеціального обладнання для детекції ГМО, то їх розповсюдження ведеться безконтрольно. Це може бути небезпечним, оскільки не всі сорти ГМ рослин є безпечними для екології. Крім того, відсутність можливості детекції ГМО призводить до використання у селекційних програмах українськими селекціонерами генетичного матеріалу закордонного походження з генетичними конструкціями. Якщо це буде випадково викрито, то ми згідно міжнародних договорів вимушені буде-

мо платити значні штрафи. Для того, щоб використання ГМО не створювало проблем сучасному рослинництву в науково-дослідних установах країн Європи і Америки, організована мережа спеціальних лабораторій, які здійснюють контроль за трансгенними рослинами. В Україні такі лабораторії відсутні і це є реальною загрозою безконтрольного розповсюдження насіння сортів рослин і продуктів рослинництва з чужинними або модифікованими генами, що може бути небезпечним для вітчизняного рослинництва і екології. Створилась загроза для навколишнього середовища внаслідок можливого забруднення бур'янів генами стійкості до гербіцидів та іншими синтетичними генами стійкості до стресів. Харчові продукти з ГМ потребують маркування. Україна, яка ще 10 років тому проводила світового рівня дослідження геному сільськогосподарських рослин, зараз опинилась на рівні бідніших африканських країн.

### **Молекулярні маркери**

Шлях до використання молекулярних маркерів у генетиці і селекції рослин був відкритий завдяки вдосконаленню методів визначення специфічності структури ДНК. Молекулярним маркерам в генетиці і селекції передували дослідження біохімічних білкових маркерів. Роботами О. О. Созінова [4] і його послідовників розроблено принципи і методологію використання запасних білків у селекції і насінництві. Розробці молекулярних маркерів сприяли досягнення молекулярної генетики в галузі визначення молекулярно-генетичного поліморфізму і створення системи ПЛР-аналізу [5]. Використання молекулярних маркерів пер-

шого покоління (ПДРФ-аналіз) було досить складним і затратним, а ПЛР-маркери дозволили проводити дослідження молекулярно-генетичного поліморфізму в масштабах, що задовольняють потреби генетики і селекції. Молекулярні маркери мають суттєві переваги перед біохімічними і морфологічними. Вони "покривають" увесь геном, а не тільки кодуєчу, як білки, фракцію. Для аналізу можуть бути використані будь які тканини рослини (зерно, листя, корені, стебла) незалежно від стадії онтогенезу.

Завдяки впровадженню технології ПЛР-аналізу в різні напрями генетико-селекційних досліджень за відносно короткий строк розроблено ряд варіантів ПЛР-маркерів, які відрізняються за кількістю генерованих ампліконів і характером спадкування. Багатолокусні, біалельні, домінантні маркери RAPD, ISSR, IRAP, REMAP використовуються для уточнення систематичних схем, визначення філогенетичних взаємовідносин між видами-донорами агрономічно важливих ознак і культурними видами, а також філогенетичних взаємовідносин між сортами одного виду. Окремі гени у складі геному дивергували і еволюціонували з різною швидкістю, тому для об'єктивної оцінки еволюції геномів треба дослідити якомога більше ділянок ДНК з різних фракцій. Вважають, що якщо доповнення новими даними не впливає суттєво на профіль дендрограми, то можна вважати достатніми кількість досліджених локусів. Практика показала, що в багатьох випадках використання 10 багатолокусних праймерів, які генерують 150–170 ампліконів, достатньо для побудови схем, що відбивають філофеногенетичні взаємовідносини.

У генетико-селекційних дослідженнях велике значення має оцінка джерел зародкової плазми, що використовується для поліпшення культурних рослин. Нами були досліджені внутрішньовидові філогенетичні взаємовідносини у родів *Triticeae*, *Hordeum*, *Vitis*, *Helianthus*, *Beta*. та ін. За допомогою молекулярних маркерів Sivolap, Chebotar et al. [6] уточнено філогенетичні взаємовідносини між видами *Triticeae*. Результати ПЛР-аналізу показали [7] що *Hordeum spontaneum*, *Hordeum agriocrithon*, *Hordeum lagunculiforme* є здичавілими формами культурного ячменю *Hordeum vulgare*; *Hordeum chilense*, який значно відрізняється фенотипово від культурного ячменю, віддалений і генетично; *Hordeum chilense* генетично ближче до *Secale cereale*, ніж до ячменю. RAPD аналіз дозволив провести диференціювання різних таксономічних груп винограду і розподілити види залежно від рівня генетичного віддалення [8]. Генетичну спорідненість 35 видів *Helianthus*, *Simsia foetida*, *Titonia speciosa* досліджено [9]. З'ясовано і уточнено систематичне положення ряду видів *Helianthus*. Шаюк та ін. [10] для диференціації видів роду *Beta* L. добрана панель з 11 RAPD-праймерів з високим рівнем мультиплексності і гетерозиготності. Згідно генетичних дистанцій види розподілені в три кластери, які відповідають секціям роду. Розподіл видів у кластерах подібний до класифікації В. П. Зосимовича. Виявлена генетична близькість цукрового буряка до *B. maritima* і віддаленість від *B. cicla*.

Оцінка генетичних взаємовідносин між сортами одного виду є важливим елементом добору вихідного селекційного матеріалу. Відомі випадки використання одних і тих самих генотипів

кукурудзи (ВІР 44, А 344) під різними назвами, створення сортів пшениці за свідомо невірної вказаним родоводом. Так, нами показано, що відомі в минулому сорти пшениці Миронівська 264 і Білоцерківська 198, які за документами мали різне походження, створені від однієї комбінації схрещування [11]. Визначення генетичних дистанцій між лініями повинно враховуватись при гібридній селекції [12].

Технологічність ПЛР-аналізу дозволяє оперувати великими кількостями зразків, що забезпечує потреби селекційних масштабів. При створенні сортів селекціонер веде добір на агрономічні ознаки, у формуванні яких беруть участь десятки і сотні генів. У польових дослідженнях здійснюється фенотипова оцінка, яка досить часто не є об'єктивною, що потребує мінімум трьохрічних повторностей. У популяції, що розщеплюється, багато рослин не несуть потрібної ознаки або знаходяться в гетерозиготі і передають в наступний рік покоління, як "селекційний тягар". Використання молекулярних маркерів дозволить визначити рослини, що несуть потрібні гени в гомозиготному стані і позбавитись від зайвих рослин "селекційного тягара". Таким чином, селекційний процес набуває більшої ефективності за рахунок визначення потрібних рослин у ранніх поколіннях і зменшення популяції, що тестується.

Об'єктом маркування є агрономічно важливі ознаки (гени), за якими ведеться добір у процесі селекції в популяції, що розщеплюється. Це, перш за все, гени стійкості до біотичних і абіотичних стресів. Більшість сортів зернових сільськогосподарських культур мають потенціал врожайності порядку 100 центнерів. Досягненню потенціала

лу заважають втрати від ураженістю хворобами, расовий склад яких постійно змінюється. Тому селекціонер вимушений постійно створювати нові сорти з генами, що забезпечують стійкість до нових рас збудників. Це перманентний процес, який потребує координованої роботи фітопатологів, молекулярних генетиків і селекціонерів. Маркування генів стійкості до збудників і контроль за передачею цих генів у поліпшуваній популяції є елементом сучасної селекції.

У світі створено декілька молекулярних карт м'якої пшениці. Хромосомна локалізація визначена більше ніж для 300 генів. Молекулярні маркери розроблені: до генів запасних білків (Gli, Glu), що пов'язані з хлібопекарськими якостями; до генів Ha, що впливають на тестуру ендосперму: до генів Wx, що контролюють склад крохмалю; до генів Ppd, відповідальних за фотоперіодичну чутливість; до генів Vrn чутливості до яровизації; до генів Alt1, Fr, Kpa стійкості до абіотичних факторів та ін. У 2004 році опублікована консенсусна мікросателітна карта м'якої пшениці, отримана шляхом об'єднання чотирьох незалежних генетичних карт. При створенні цієї карти використані WMC маркери, розроблені у Пшеничному Мікросателітному Консорціумі (Wheat Microsatellite Consortium), в Інституті дослідження зернових культур в Гатерслебені GWM, GWD, в Національному дослідницькому інституті агрономії в Клермон-Феррані CFA, CFD, а також BARC маркери. Прокартовано 1235 мікросателітних маркерів, які покривають 2569 сМ геному, при середній відстані 2,2 сМ. У Південному біотехнологічному центрі (м. Одеса), використовуючи ці дані, розгорнуто

роботи з дослідження генетичного поліморфізму сортів пшениці України за генами Wx, Vrn, Ppd, Gli, Glu та ін.

Морозозимостійкість озимих культур є важливим чинником, що забезпечує стабільний врожай. Суворозима 2002–2003 р. показала, що неповага до цієї ознаки в селекції призводить до сумних наслідків. 65 відсотків сортів озимих, що мали низький і середній рівень зимостійкості, не витримали умов зими і загинули. І хоч ми живемо в період глобального потепління, ніхто не дасть гарантії, що така зима не повториться. Тому сорти пшениці повинні мати високий рівень зимостійкості, для надання якого треба приділяти увагу генетиці цієї ознаки. Морозозимостійкість є полігенною ознакою, у формуванні якої беруть участь гени типу розвитку, стресові гени (колд шоки) та ін. Серед культурних злаків важко знайти придатні донори високої морозостійкості. Внаслідок схрещування пшениці з житом у геном пшениці переносяться гени, що погіршують якість борошна. Тому треба розробити програми віддаленої гібридизації пшениці з дикими злаками, які мають високий показник морозозимостійкості і не погіршують якість борошна. Це, перш за все, егілопси, які несуть втрачені культурними рослинами гени стійкості до хвороб і гени стійкості до абіотичних стресів.

Важливим елементом селекції є поліпшення якості продукції. В останні роки посилюється попит на сорти, борошно яких підходить для виготовлення макарон, локшини, кондитерських виробів. У ячменю виявлені алелі генів, що кодують амілазу і мають вплив на активність останньої і на пивоварні властивості солоду. Вони є об'єктом дослідження в Південному біотехноло-

гічному центрі (ПБЦ, м. Одеса). Виявлена гетерогенність більшості українських сортів за ознаками якості. З використанням молекулярних маркерів створено можливість поліпшення сортів за рахунок добору генотипів з необхідними алелями.

У ПБЦ здійснено теоретичну і практичну розробку технології отримання ДНК-маркерів для визначення відповідності нових сортів DUS-тесту. Розроблено ДНК-технологію диференціації, ідентифікації і реєстрації у вигляді генетичних формул генотипів найважливіших сільськогосподарських культур. Створено електронну базу даних ДНК-профілювання сортів і гібридів. Сорт характеризується унікальним набором алелів добраних локусів. Генетичні формули відбивають алельний стан високополіморфних локусів. Порівняння генетичних формул у базі даних дозволяє провести аналіз на новизну кандидатів у сорти, вклад нових алелів на різних етапах селекції і зробити прогноз розвитку селекції окремої культури на найближчий час. За допомогою розробленої системи ідентифікації і паспортизації сортів досить легко захищати права селекціонера на сорт. Якщо сорт має молекулярно-генетичний паспорт, зареєстрований в Південному біотехнологічному центрі, як запланованому експертному закладі Держслужби з охорони прав на сорти рослин, то це є основою для визначення його в посівах, зерні, борошні. У наш час, коли можливі порушення прав оригінаторів і власників сортів, експертний висновок визначення сорту на основі ДНК профілювання є актуальним і ефективним засобом.

#### Перелік літератури

1. Coe E., Sarkar K. Preparation of nucleic acids and a genetic transformation attempt in maize. – Crop Science. – 1966. – V. 6. – P. 432–435.
2. Кордюм В. А., Моргун В. В., Черних С. И. Передача доміантного алеля гена Su у кукурудзи за допомогою екзогенної ДНК // Доповіді АН УРСР. – Сер. Б. – 1974. – № 8. – С. 759–762.
3. Сиволап Ю. М., Стельмах А. Ф., Образцов И. С., Лукьянюк С. Ф. Изучение генетических эффектов экзогенных ДНК у гороха // Научно-техн. – Бюллетень ВСГИ, 1976. – С. 34–37.
4. Созинов А. А. Полиморфизм белков и его значение в генетике и селекции. – М.: Наука, 1985. – 272 с.
5. Сиволап Ю. М. Использование ПЦР – анализа в генетико-селекционных исследованиях (научно-методическое руководство). – К.: Аграрная наука, 1998. – 156 с.
6. Sivolap Yu., Chebotar S., Rybalka A. Inter- and intraspecies genetic polymorphism of Triticeae // Plant Genome III, The Intern. Conf. of the Status of Plant Genome Research. – 1995. – San Diego. – P. 77.
7. Сиволап Ю. М., Календарь Р. Н. Генетический полиморфизм ячменя, выявляемый ПЦР с произвольными праймерами // Генетика. – 1995. – 31, № 10. – С. 1358–1364.
8. Сиволап Ю. М., Балашова И. А., Трошин Л. П. Исследование генетического полиморфизма винограда при помощи RAPD-анализа // Цитология и генетика. – 1996. – 30, № 6. – С. 33–37.
9. Солоденко А. Е., Сиволап Ю. М., Бурилов В. В. Исследование молекулярно-генетического полиморфизма подсолнечника на меж- и внутривидовом уровнях // Молекулярно-генетические маркеры растений: Тез. докл. Межд. Конф. 11–17 ноября. – Ялта. – С. 82–83.
10. Shayuk L., Roik N., Sivolap Y. Application of the RAPD – markers for species differentiation of the genus *Beta* L. // The International Conference on the Status of Plant, Animal & Microbe Genomes Research January 12 – 16, 2002. – С. 226.

11. Сиволап Ю. М., Галаев А. В., Нестерев В. Г. Дифференциация и идентификация пшеницы и тритикале при помощи ДНК-типирования // Вісн. укр. тов-ва генет. і селекц.– 2004.– 2, №1.– С. 3–15.
12. Сиволап Ю. М., Кожухова Н. Е., Доменюк В. П., Білоусов А. О. ДНК-маркери в селекції та насінництві кукурудзи // Вісн. аграрної науки.– 2003.– № 6.– С. 45–48.

Представлено В. А. Кунахом  
Надійшла 24.02.2006

#### ДНК-ТЕХНОЛОГИИ В РАСТЕНИЕВОДСТВЕ УКРАИНЫ

Ю. М. Сиволап

Южный биотехнологический центр,  
Украина, 65036,  
Одесса, Овидиопольская дор., 3,  
genom2005@ukr.net

Обсуждаются проблемы современной биотехнологии в растениеводстве Украины. Современные биотехнологии в растениеводстве развиваются в трех направлениях: использование культуры тканей и органов *in vitro*, ДНК-технологии (молекулярные маркеры), генно-модифицированные (биотехнологические) растения. В Украине неоправданно блокировано создание и использование генно-модифицированных растений. В то же время успешно развиваются технологии с использованием ДНК маркеров на основе ПЦР-анализа. ДНК-маркеры внедряются в генетику, селекцию, семеноводство и охрану прав на сорта растений. Создан информационный банк данных аллельного состава отобранных микросателлитных локусов, характе-

ризующего уникальность сортов. Рынок потребления биотехнологической продукции в растениеводстве Украины не сформирован.

*Ключевые слова:* биотехнология, ДНК-технология, растениеводство.

#### DNA TECHNOLOGY IN PLANT PRODUCTION OF UKRAINE

Yu. M. Sivolap

South Plant Biotechnology Center,  
Ukraine, 65036,  
Odessa, Ovidiopol'skaya Dor. ,3,  
genom2005@ukr.net

The problems of modern biotechnology come into question in the plant production of Ukraine. Contemporary biotechnology in the plant production has three directions: use of tissue and organs culture *in vitro*, DNA technology (molecular markers), gene modified (biotechnological) plants. In Ukraine the unjustified blocked creation and use of the gene-modified plants. At the same time successfully develop technologies with the use of DNA markers on the basis of PCR-analysis. DNA marker take place in genetics, breeding, seed distribution and defend of rights to the varieties of plants. Created informative data bank of allelic composition of the selected microsatellite loci, that characterizes the unicity of varieties. The market of consumption of biotechnological products in the plant production of Ukraine not is formed. *Key words:* biotechnology, DNA-technology, plant production.

## ТРИ КИТИ АКАДЕМІКА С. М. ГЕРШЕНЗОНА (ДО 100-ЛІТТЯ ВІД ДНЯ НАРОДЖЕННЯ)

С. С. МАЛЮТА



Сергій Михайлович ГЕРШЕНЗОН

**С**еред українських генетиків однією з найвидатніших постатей був і залишається Сергій Михайлович Гершензон – непересічна особистість, видатний вчений і педагог. Писати про Сергія Михайловича Гершензона – справа не з простих, але автор знав і спілкувався з С. М. Гершензоном з 1963 р. до останніх днів його життя, і попри всі складнощі цього спілкування, ніколи не переставав вважати себе учнем, а Сергія Михайловича – Учителем.

С. М. Гершензон народився 11 лютого 1906 р. у Москві, в родині російського інтелігента, відомого вченого-культуролога, історика російської літератури, професора-пушкінознавця М. О. Гершензона. Дитинство і юнацькі роки його пройшли у часто-

му спілкуванні із знайомими представниками російської літературної і філософської думки. Прекрасна освіта, спочатку в Пушкінській дослідній школі-колонії (яка не мала нічого спільного з колоніями, описаними у “Педагогічній поемі” А. С. Макаренка), а потім на біологічному відділенні фізико-математичного факультету Московського університету, одночасна робота в Інституті експериментальної біології, коли його вчителями були такі видатні вчені, як С. С. Четвериков і М. К. Кольцов, а соратниками – надалі визначні генетики Б. Л. Астауров, М. К. Беляєв, О. І. Балкашина, П. Х. Рокицький, безумовно, наклали свій відбиток на формування інтелекту і світогляду майбутнього академіка, становлення його як класика сучасної генетики, вченого з великими знаннями в різних галузях біології (і не лише), останнього із “могікан”, котрого, без сумніву, можна назвати вченим-енциклопедистом.



Наукову діяльність С. М. Гершензон розпочав у 1925 р. під керівництвом С. С. Четверикова з вивчення генетичної структури природних популяцій одного із видів дрозофіли – *Dr. obscura*. Ці дослідження стали дипломною роботою С. М. Гершензона, яку він захистив у 1927 р. і результати якої опубліковано в "Журнале експериментальної біології" в 1927 р. та в журналі "Genetics" у 1928 р. Взагалі напрямок популяційно-генетичних досліджень був для С. М. Гершензона надзвичайно продуктивним у творчому відношенні. До найважливіших досягнень С. М. Гершензона в цей період слід віднести відкриття та детальне дослідження гена, який спричиняє втрату самцями дрозофіли Y-хромосоми, внаслідок чого потомство стає майже повністю жіночої статі. Після цієї роботи подібні спадкові зміни співвідношення чисельності осіб різної статі в популяціях знайдено у різних видів тварин, а також у людини.

Ще одним важливим відкриттям С. М. Гершензона були докази насиченості природних популяцій дрозофіли не лише видимими морфологічними, але й летальними і напівлетальними мутаціями, а також мутаціями, які викликають стерильність. Ці результати стали підґрунтям для створення ним концепції, згідно з якою основну роль у мікроеволюції відіграють не рецесивні, а напівдомінантні і домінантні мутації, що можуть проявлятися і набувати еволюційного змісту уже в гетерозиготі. Ця концепція була розвинута при дослідженні генетичної будови популяцій наїзників (*Mormoniella vitripennis*) з родини хальцидид ряду перетинчастокрилих. Особливістю цих комах є те, що у них самці – гаплоїдні, а тому всі мутації мають фенотиповий прояв і відразу піддаються дії природ-

ного добору. Якщо зважити на те, що перетинчастокрилі комахи є однією з найшвидше еволюціонуючих груп, то стає очевидним, що "запас" мутацій у диплоїдних організмів не є обов'язковою умовою для еволюції на рівні виду або таксонів вищого порядку.

Третім важливим популяційно-генетичним дослідженням С. М. Гершензона стало вивчення природних популяцій хом'яків в Україні. На дуже великому матеріалі з різних регіонів України було показано, що меланізми у хом'яка (чорне забарвлення хутра), які виявляються в деяких місцевостях, мають аутосомно-домінантний характер успадкування і визначаються одним геном. Було виявлено існування центрів з підвищеною частотою трапляння меланістів та вивчено зміну частоти в різні роки та пори року, встановлено роль природного добору у зміні цієї частоти, постульовано адаптивне значення збалансованого диморфізму популяцій хом'яка за цією ознакою.

Природний талант, висока ерудованість не дали С. М. Гершензону зупинитися на одному популяційно-генетичному напрямку. Уже після переїзду його в 1937 році на запрошення Президії АН України до Києва, де після арешту І. Й. Агола він очолив відділ генетики Інституту зоології та кафедру генетики і дарвінізму в Київському університеті, паралельно з уже згадуваними дослідженнями на наїзнику і хом'яку він розпочинає абсолютно новий напрямок роботи в рамках започаткованої ще І. Й. Аголом теми "Роль біохімічних факторів у процесах спадковості". Вже перші досліді, результати яких було опубліковано в 1939 р. (С. М. Гершензон "Вызывание направленных мутаций у *Drosophila melanogaster*" – ДАН СССР, т. 25, № 3, С. 224–227), по-

казали, що вчений стикнувся з абсолютно неординарним явищем. Основні результати, отримані С. М. Гершензоном та його співробітниками при вивченні дії ДНК на дрозофілу, можна сформулювати таким чином: ДНК є сильним мутагеном; спектр індукованих за допомогою ДНК мутацій радикально відрізняється від спектра спонтанних мутацій або від спектра мутацій, індукованих фізичними чи хімічними мутагенами; ДНК викликає точкові мутації, тобто генні мутації і мікрodelеції, але не призводить до великих хромосомних перебудов; ДНК притаманна продовжена мутагенна дія – спричинення мутацій не лише в статевих і соматичних клітинах, наявних у момент введення ДНК, але й у багатьох наступних поколіннях; у соматичних клітинах мутагенез зумовлює появу чисельних мозаїків мутантних тканин; коли мутують ранні генеративні клітини, то з'являються "пучки" мутантних особин серед нащадків мух, на яких впливали мутагеном; деякі індуковані генні мутації виявляються нестабільними – вони часто ревертують до норми або переходять до іншого алельного стану.

Ці відкриття виявилися настільки незвичними, що окремі генетики поставилися до них скептично, з недовірою. Надто вже по-новому сприймалися такі дані у той час, коли ще ніхто не знав про хоч якусь причетність ДНК до спадковості. Виходячи з цих результатів ще на зорі розвитку досліджень в царині хімічного мутагенезу С. М. Гершензоном було зроблено пророчий висновок: "Особливо часте мутування деяких генів під впливом препарату ДНК призводить до уявлень стосовно різної хімічної будови ДНК різних генних молекул" (переклад з російської мій – С. М.) (Журнал общей биологии,

1948, т. 9, № 2). Далі автор припускає, що "дія ДНК втручається в процес репродукції генів і, як наслідок, деякі заново утворені гени відрізняються за структурою від батьківських генів. Якщо таке пояснення вірне, то це означає, що тимонуклеїнова кислота відіграє важливу роль у репродукції генів". Проте продовжити роботу та підтвердити ці пророчі ідеї не судилося.

Після серпневої сесії ВАСГНІЛ 1948 р. керований С. М. Гершензоном відділ генетики в Інституті зоології АН УРСР було розпущено, дослідження з генетики припинено. С. М. Гершензона звільнили також з посади завідувача кафедри дарвінізму і генетики Київського університету ім. Т. Г. Шевченка.

Наукові експерименти на дрозофілі поновилися аж із середини 60-х років. Роботи автора цих рядків, Ю. М. Александрова та ін., виконані під керівництвом С. М. Гершензона, показали, що високополімерна чужорідна ДНК, виділена з різних про- і еукаріотів, ДНК і РНК різних неінфекційних для дрозофіли вірусів, самі віруси, а також синтетичні полінуклеотиди здатні проникати у соматичні і статеві клітини та викликати мутації. Вивчення мутагенної дії вірусів і їхніх нуклеїнових кислот, синтетичних полінуклеотидів повністю підтвердило висновки, зроблені С. М. Гершензоном стосовно того, що спадкові зміни внаслідок їхнього впливу виникають переважно в обмеженому числі локусів, специфічних для кожного з мутагенних чинників, що такі мутаційні зміни часто спричинюють спадкову дестабілізацію певних генів, яка має множинний характер, тобто охоплює відразу низку локусів досліджуваної хромосоми.

Вивчення мутагенної дії вірусів дозволило С. М. Гершензону та автору цих рядків сформулювати новий погляд на

еволюційно-генетичну роль вірусів, розглядаючи їх не лише як збудників тих чи інших хвороб (інфекційні агенти – регулятори чисельності), але і як сильні мутагенні чинники, що відіграють важливу роль в еволюції інших форм живого (Цитологія и генетика, 1967, № 1).

С. М. Гершензон справді був “ненаситним” у своїх наукових пошуках. У період гонінь на генетику після сумнозвісної сесії ВАСГНІЛ 1948 р. протягом 20 років він працював у галузі вірусології, спочатку в Інституті зоології, а потім в Інституті мікробіології і вірусології АН УРСР. Цей період вимушеної “бездіяльності” у генетиці С. М. Гершензон плідно використав і зробив кілька цікавих наукових знахідок у сфері вірусології, генетики вірусів тварин та молекулярної біології. Йому вдалося довести, що вірусосоюство у комах (дубового, тутового шовкопрядів, інших лускокрилих) за своєю природою подібне до латентного стану у профагів, тобто зумовлене інтеграцією геному вірусів у геном комах, а спалахи жовтяниці, пов’язані з вірусами ядерного поліедрозу, пояснювалися не екзогенними інфекційними агентами, а активацією латентних вірусів. С. М. Гершензон показав, що активація латентного вірусу ядерного поліедрозу відбувається при сильних стресових змінах екологічних чинників: голодуванні, холодових затримках розвитку, змінах водного режиму, режиму харчування тощо. Ці висновки дали можливість реорганізувати систему захисту від епізоотії і істотно знизити втрати і вартість при промисловому вирощуванні шовкопрядів.

Вивчаючи жовтяницю тутового шовкопряда, С. М. Гершензон розробив простий і надійний метод фарбування

ребер і кутів кристалів поліедрів – білкових включень, які формуються в клітинах, уражених відповідним вірусом. Це дало йому можливість, по-перше, здійснити порівняльне дослідження кристалів-поліедрів різної природи та встановити номогенетичні принципи їхньої симетрії. З’ясувалося, що в усіх лускокрилих комах кристали належали тільки до одного класу симетрії – кубічної сингонії, а конкретніше, до гексатетраедричного. Це – “в нормі”. По-друге, поряд із звичайною формою С. М. Гершензон спостерігав і “аномальні” мутантні форми: гекса- і тетраедричні. Заражаючи гусінь сумішшю різних за формою поліедрів або моноформними суспензіями, він виявив, що відмінності у формі кристалів є спадковими і визначаються мутаціями в генах білків оболонки, а не зумовлені умовами кристалізації.

У процесі вивчення епізоотії жовтяниці шовковичного і дубового шовкопрядів С. М. Гершензон провів широкомасштабні дослідження з перехресного зараження одним і тим же вірусом понад 50 видів лускокрилих і, навпаки, із зараження одного виду різними вірусами та показав, що низка вірусів може уражувати різні в систематичному відношенні види. Фактично, це були перші досліді з біоценотичної вірусології.

Але чи не найінтригуючішим з наукових досягнень С. М. Гершензона було передбачення ним зворотної транскрипції – РНК-залежного синтезу ДНК у вірусу ядерного поліедрозу. В досліді, які проводили у відділі, здорову гусінь “заражали” шляхом ін’єкцій РНК, виділеної з хворої гусені. Ставили низку контролів, у тому числі обробку РНКазою і ДНКазою, використання для зараження гусені – донора РНК штамів вірусів, що відрізнялися за формою

поліедрів, – в усіх випадках результат був однозначним: все вказувало на те, що, справді, на матриці РНК мала синтезуватися ДНК. Публікації С. М. Гершензона і його співробітників викликали масу заперечень, сумнівів і навіть ... підозр. Дійсно, в період неподільного панування центральної догми молекулярної біології не можна було відступати від канонів. І сьогодні важко собі уявити, як із десятків кДНК (а геном вірусу ядерного поліедру має молекулярну масу понад 100 МДа, складається з десятків генів, які транскрибуються у відповідні іРНК), які мали б за допомогою зворотної транскрипції некомпартменталізовано синтезуватися в клітині, могла самозібратися повноцінна молекула вірусного геному і дати старт інфекційному процесу. І це зараз, через 35 років після відкриття у 1970 р. Д. Балтімором і Г. Тьоміним ферменту зворотної транскрипції, за допомогою якого синтезовано тисячі і тисячі генів та який був одним із ключових у розшифруванні геному людини і решти уже розшифрованих на сьогодні геномів. На жаль, геніальну ідею на моделі вірусу ядерного поліедру так і не було підтверджено, хоча її з цікавістю сприйняла наукова спільнота. Для прикладу можна навести дві оцінки. Відомий вірусолог К. Сміт у 1967 р., аналізуючи досліді С. М. Гершензона і співробітників, писав: "Якщо ця робота підтвердиться, стане очевидним, що генетична інформація може передаватися не тільки від ДНК до РНК, але і в зворотному напрямку". Уже після отримання Нобелівської премії видатний молекулярний біолог С. Спігелмен у 1971 р. зазначав: "історичне уявлення про перевертання синтезу від РНК до ДНК існувало у вигляді невеликої ересі ще до того, як онкогенні віруси (йдеть-

ся про мишачі лейкемогенні віруси Гросса і Малоні, з яких вперше виділено зворотну транс-криптазу – С. М.) висунулися на перший план ... Воно було чітко висловлене для пояснення чудової серії експериментів, у яких, як повідомлялося, передача інформації ДНК-вмісного вірусу поліедру була здійснена за допомогою РНК, виділеної із заражених комах. Незалежно підтвердження цих фактів становило б непересічний інтерес".

Чого було більше у С. М. Гершензона? Великого осяяння чи не менш великого передбачення, невдало вибраної моделі чи помилок в експериментах? Відповісти важко, бо ніхто після 1971 р. результати дослідів С. М. Гершензона і співробітників не перевіряв.

С. М. Гершензон був неординарним вченим і неординарною людиною. Багато хто звинувачував його у "запозиченні" чужих ідей. І справді, молодий Гершензон перше завдання отримав від свого вчителя С. С. Четверикова, але він так експериментально і теоретично опрацював його, що серед генетиків-популяціоністів і еволюціоністів його ім'я стало поряд з іменем Учителя. Поняття стосовно того, що ДНК може відігравати значну роль у генетичних процесах, виникло у нього, за його ж словами, під впливом поглядів ще двох його вчителів: професора Московського університету А. Р. Кізеля та М. К. Кольцова (подібне припущення приблизно в той же час зробили й І. Й. Агол з М. Д. Тарнавським). Існує твердження, що насправді думка про те, що ДНК і віруси можуть бути мутагенними чинниками, запозичена С. М. Гершензоном у відомого письменника С. Льюїса. Може й так, але багато хто й до нього читав "Ероусміт" (саме в цьому романі є натяк на те, що патогени здатні виклика-

ти спадкові зміни в ураженому ними організмі), але хто ще зробив те, що вдалося С. М. Гершензону? Кажуть, що ідею про зворотну транскрипцію С. М. Гершензон вичитав у знаного мікробіолога і молекулярного генетика Г. Стента. Може й так (я особисто у Г. Стента подібних стверджень не знайшов), але хто, як не він, підняв цю проблему, надав їй розголосу та зробив усе доступне, щоб дослідити її?

Насінина проростає тільки на підготовленому ґрунті!

Сергій Михайлович Гершензон був непересічним педагогом і учителем. Усім відомі два видання його блискучого підручника "Основы современной генетики". Після відлучення від кафедри у 60–70-ті роки він організував кілька курсів лекцій з генетики для наукової молоді (якою тоді були люди мого покоління). Він любив молодь, допомагав їй зростати (але часто лише до якогось рівня, і "виживав" той, хто був бійцем, умів протистояти навіть Учителю) і сам знаходив у ній опору. Він знав мистецтво і літературу, зокрема, поезію. Мені доводилося чути кілька його власних прекрасних перекладів сонетів Вільяма Шекспіра.

С. М. Гершензон повністю сприйняв систему, створену більшовиками, і саме це примусило його каятися у 1948 р. в "усіх смертних гріхах", своїх і "менделізму-морганізму", але в остаточному підсумку він не зрадив науці, якій служив усе життя.

Академік Гершензон мав неабиякий організаторський хист: протягом тривалого часу він керував відділом, був керівником сектора вірусології і заступником директора Інституту мікробіології і вірусології АН України, організатором Інституту молекулярної біології і генетики АН України і першим виконуючим обов'язки його директора. Але Сергій Михайлович був ліпше вченим, аніж адміністратором, бійцівські риси не були в його характері. І коли виникли труднощі у створеному ним інституті, він віддав його в інші руки.

Цю меморіальну статтю названо: "Три кити академіка С. М. Гершензона". Зрозуміло, що мова йде про три найважливіших його наукових досягнення: генетико-популяційні дослідження, ДНК- і вірусіндукований мутагенез та зворотну транскрипцію. Насправді "китів" значно більше, але саме ці три створили йому ім'я, точніше, він на них стояв. А ім'я він створив собі сам.

Назавжди!

УДК 575.224

## **ИНСЕРЦИОННЫЙ МЕХАНИЗМ ДНК-МУТАГЕНЕЗА**

(К 100-ЛЕТИЮ СО ДНЯ РОЖДЕНИЯ С. М. ГЕРШЕНЗОНА)

И. С. КАРПОВА, Н. Г. ГОРОВЕНКО<sup>1</sup>, С. В. ПОДОЛЬСКАЯ<sup>1</sup>,  
З. И. РОССОХА<sup>1</sup>, Н. В. КОРЕЦКАЯ, В. В. ДМИТРЕНКО, С. Е. РЫМАРЬ

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины

Украина, 03143, г. Киев, ул. Заболотного, 150

<sup>1</sup>Национальная медицинская академия последипломного образования

им. П. Л. Шупика

Украина, 04112, г. Киев, ул. Дорогожицкая, 9

*Гипотеза С. М. Гершензона, касающаяся механизмов ДНК-мутагенеза, рассматривается в свете новых открытий в области молекулярной генетики. На бактериальной модели *Bacillus subtilis*, подтвердившей особенности ДНК-мутагенеза – специфичность и генетическую нестабильность мутаций, приведены доказательства в пользу их инсерционного механизма.*

*Ключевые слова: ДНК-мутагенез, *Bacillus subtilis*, генетическая нестабильность *Aiu*-повтор*

**В**СТУПЛЕНИЕ. С. М. Гершензон, обладая удивительным даром предвидения, высказывал идеи, намного опередившие время. В мировую науку он вошел как человек, впервые усомнившийся в правильности “центральной догмы” молекулярной биологии, согласно которой передача генетической информации осуществляется только в одном направлении – от ДНК к РНК.

Другому своему открытию и связанному с ним новому научному направлению – исследованию мутагенных свойств ДНК и других биополимеров – С. М. Гершензон посвятил более пяти десятилетий.

В силу своей парадоксальности это направление не сразу нашло признание. Первая публикация о возникновении мутаций у дрозофилы при воспитании личинок на среде с тимонуклеиновой кислотой датируется 1939 г. [1, 2]. Зарегистрировано данное открытие было под № 340 лишь 22 октября 1987 года, а официального признания в виде Государственной премии Украины оно было удостоено в 1998 г. уже после смерти автора. Развиваясь многие годы в стороне от магистрального пути, это направление прошло ряд этапов, углубляясь с каждым новым достижением генетической науки.

© И. С. КАРПОВА, Н. Г. ГОРОВЕНКО, С. В. ПОДОЛЬСКАЯ, З. И. РОССОХА и др., 2006

В то время как большинство генетиков концентрировалось на явлении наследственности, С. М. Гершензон был одним из первых и немногих, обратившихся к проблеме изменчивости. Ему открылась истина, что ДНК причастна к мутационному процессу как эволюционно значимому источнику биологического разнообразия, за долго до установления наследственной роли этой макромолекулы. Однако объяснить особенности ДНК-мутагенеза – избирательное мутирование отдельных генов при полной нечувствительности других, а также продолженное действие (генетическую нестабильность), приводившее к реверсиям или переходам мутации в другие аллельные состояния, в ранних своих работах С. М. Гершензон не мог.

Идею о возможном механизме ДНК-мутагенеза подсказало открытие бактериальных эписом, сделанное французскими учеными Жакобом и Моно в 1961 г. В этот период С. М. Гершензон формулирует гипотезу эписомоподобного действия, согласно которой фрагмент экзогенной ДНК прикрепляется к определенному локусу хромосомы по принципу частичной гомологии и в ряде поколений дестабилизирует его репликацию.

С началом эпохи “мобильной генетики” (80-е годы прошлого столетия) С. М. Гершензон делает новую редакцию своей гипотезы с учетом современного уровня генетических знаний о повсеместном распространении мобильных генетических элементов (МГЭ) и их роли в спонтанном мутагенезе. Представляется логичным, что ДНК-индуцированные мутации своей нестабильностью и транспозициями напоминают мутации, возникающие в природе вследствие инсерций и пе-

ремещений МГЭ. Фрагменты ДНК чужеродного происхождения могут играть роль самостоятельных новых мобильных элементов и/или активировать МГЭ, присутствующие в геноме реципиента [1].

Для проверки данной гипотезы С. М. Гершензон предложил И. С. Карповой разработать бактериальную модель. Выбор в качестве тест-системы непатогенной споровой бациллы *Bacillus subtilis*, способной поглощать ДНК любого происхождения из культуральной среды, оказался удачным. Особенности ДНК-мутагенеза, установленные ранее на дрозофиле: избирательность, нестабильность, способность к транспозициям, ярко проявились на бактериальной модели, что указывало на универсальность явления мутагенного действия ДНК и адекватность выбранного объекта для последующего изучения механизмов данного явления [3, 4].

Готовясь к празднованию 100-летнего юбилея выдающегося ученого и учителя академика С. М. Гершензона, мы решили, используя новые технологии, поставить ряд экспериментов для выяснения инсерционной природы интересной группы нестабильных мутаций, полученных ранее с помощью плазмид, содержащих *Alu*-повтор генома человека. К исследованиям в данном направлении Сергей Михайлович проявлял особый интерес.

## Материалы и методы

Штаммы и плазмиды, использованные в работе, представлены в табл. 1. Мутации с помощью плазмидной ДНК получали согласно разработанной нами методике [3]. Выделение хромо-

сомной и плазмидной ДНК, а также дот-блот гибридизацию проводили согласно стандартным методам [5]. Зондом для гибридизации была рекомбинантная плазида рAL1, содержащая вставку Alu-повтора генома человека. Праймеры и условия проведения полимеразной цепной реакции описаны в [6].

## Результаты и обсуждение

Уже на основании результатов ранних работ С. М. Гершензона возник важный вывод, что мутагенная активность ДНК определяется её смысловой последовательностью. Из этого следовало, что не любая ДНК может служить мутагенным фактором.

Таблица 1. Использованные в работе бактериальные штаммы и плазмиды

Штамм или плазида	Характеристика	Источник
<i>Bacillus subtilis</i> штамм Lys-42	ауксотроф по лейцину	из коллекции ЛИЯФ им. В.П. Константинова РАН (С.-Петербург)
Плазмиды		
рUC18	коммерческий вектор, который содержит полилинкерную последовательность в гене lacZ	из коллекции ИМБиг НАН Украины
рAL1	производная от рUC18, содержит по сайту BamH1 полилинкера один Alu-повтор генома человека (около 300 н.п.)	из коллекции Института цитологии РАН (С.-Петербург)
рWT	производная от рAL1, которая кроме Alu-повтора, содержит полноразмерный ген аполипопротеина А1 человека (4,3 т.н.п.)	автор Шульженко В.М., ИМБиг НАН Украины
рAins	сконструирована на основе рAL1, содержит ген инсулина человека	из коллекции отдела регуляторных механизмов клетки ИМБиг НАН Украины

Таблица 2. Индукция ауксотрофных мутаций с помощью рекомбинантных плазмид в компетентной культуре *Bacillus subtilis*

Вариант	Концентрация ДНК, мкг/мл	Количество		Частота мутантов, %	Отношение опыт/контроль	P
		проверенных колоний	мутантов			
Контроль	—	3223	5	0,15±0,068		
рUC18	50	1000	3	0,30±0,17	2,00	< 0,95
рAL1	50	1556	15	0,96±0,24	6,4	0,99
рWT	50	1200	17	1,42±0,34	9,47	0,99
	100	158	5	3,16±1,39	21,0	0,95
рAins	50	800	8	1,00±0,35	6,67	0,95



Появление технологии рекомбинантных молекул дало возможность сравнивать мутагенный эффект генно-инженерных конструкций с определенной полинуклеотидной последовательностью (табл. 2).

Оказалось, что ДНК коммерческой векторной плазмиды pUC18 не вызывала превышения частоты мутантов над спонтанным уровнем. Из серии производных от нее рекомбинантных плазмид наиболее простую конструкцию имела pAL1, которая содержала в своем составе Alu-повтор генома человека с промотором РНК-полимеразы III и энхансероподобными последовательностями. Вставка Alu-повтора существенно повлияла на мутагенный эффект молекулы ДНК. Клонированием полноразмерного гена аполипопротеина (*apoA1*) человека в составе pAL1 была получена высоко мутагенная конструкция pWT. В оптимальных условиях частота мутантов в 21 раз превышала контрольный уровень. Этот эффект нельзя объяснить увеличением размеров плазмиды, поскольку другая большая конструкция pBR322ins, где вместо *apoA1* и Alu-повтора встроена последовательность гена препроинсулина, полностью утратила мутагенную активность (данные не приведены). Мутагенная активность восстанавливалась при введении в состав конструкции Alu-повтора (плазмида pAins).

Среди ауксотрофов, полученных с помощью рекомбинантных ДНК, был проведен поиск потенциальных инсерционных мутантов (рис. 1). Методом дот-блот гибридизации проверены 57 мутантных клонов, выделенных в опытных пробах, и три мутанта, возникших спонтанно. Из них ДНК 25 клонов связалась с меткой, что можно было объяснить присутствием в геноме фрагмента

чужеродной ДНК. Поскольку плазмиды кишечной палочки и их производные в *B. subtilis* не реплицируются, вероятность загрязнения препаратов плазмидными ДНК, использовавшимися в качестве мутагенов, исключалась.

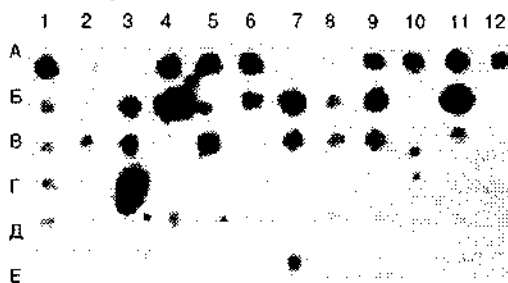
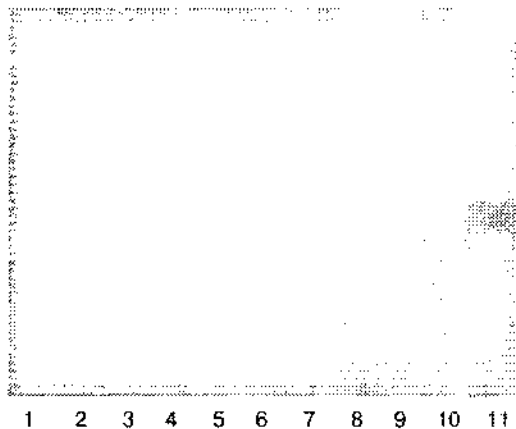


Рисунок 1. Поиск инсерционных мутантов с помощью дот-блот гибридизации.

Таким образом было выяснено, что в одинаковых условиях одни последовательности не проявляют мутагенной активности (pUC18, pBR322ins), в то время как активность других достоверно превышает спонтанный уровень. Последние отличались присутствием в своем составе Alu-повтора генома человека, что позволило приписать их высокую мутагенность активности данной последовательности.

С целью дальнейшего исследования судьбы интегрированной Alu-последовательности с помощью полимеразной цепной реакции, были отобраны три Alu-интегранта (№18, 27, 33), в посевах которых наиболее часто возникали видимые и ауксотрофные мозаики, свидетельствующие о продленном мутагенном эффекте. ДНК выделяли из 10 наиболее отличающихся колоний, где видимые изменения затрагивали такие признаки, как размеры и форма колонии, структура и консистенция поверхности, форма и структура края, структура центра колонии (поднятый или плоский), а также их

окраска. При проведении полимеразной цепной реакции были использованы праймеры для Alu-ПЦР, указанные в работе [6]. ДНК 6 из 10 проверенных клонов содержала амплифицированный фрагмент, длина которого составила около 600 н.п., что вдвое превышает средний размер Alu-повтора (рис. 2). ДНК двух контрольных штаммов *B. subtilis*, не контактировавших с рекомбинантными плазмидами, не содержала амплифицированных последовательностей. Полученные данные свидетельствуют в пользу интеграции мобильного элемента – Alu-повтора генома человека в хромосому бактерии.



**Рисунок 2.** Электрофореграмма продуктов амплификации ДНК-мутантов *Bacillus subtilis*, полученных с помощью рекомбинантной ДНК Alu-повтора генома человека: 1, 11 – маркер молекулярного веса (300 н.п.); 2–7 – Alu-интегранты *B. subtilis*; 8, 9 – контроль; штаммы Lys-42, SHgW; 10 – набор маркеров молекулярного веса.

Из литературы известно, что Alu-повторы составляют около 5% генома человека и высших приматов. Это короткие нуклеотидные последовательности (около 300 н.п.), которые разбросаны по всему геному и их количество достигает 300 – 500 тысяч. Считается, что Alu-повторы не кодируют

белки, но в их составе найдены разные функциональные сайты, а именно промотор РНК-полимеразы III, энхансероподобные структуры и др. Существует также гипотеза относительно роли Alu-повторов как специфических мишеней мутационного процесса, что приводит к генетической нестабильности и канцерогенезу [7].

Современный этап развития генетики характеризуется интегральными исследованиями полинуклеотидных последовательностей геномов многих организмов – от бактерий до человека. Установлено, что МГЭ составляют значительную часть ДНК эукариот. Так, в геноме дрозофилы они занимают около 22%, а кукурузы – 50% [8]. Также был установлен парадоксальный факт, что в геноме человека доля “менделевских генов” составляет менее 3%, а на МГЭ разных классов приходится около 42% [9]. Существует мнение, что избыточная ДНК не имеет определенных функций. Разные авторы называют её “эгоистической”, “паразитической” и даже “мусорной” [10]. С. М. Гершензон не разделял такое мнение и считал, что МГЭ в природе являются постоянно действующим источником изменчивости и вносят существенный вклад в эволюцию. С этой точки зрения экспериментальный ДНК-мутагенез моделирует эволюционный процесс *in vitro*.

Наши исследования на бактериальной модели подтверждают гипотезу С. М. Гершензона об инсерционной природе ДНК-мутагенеза, а также, на примере Alu-повтора человека, дают уникальную возможность исследовать генетические свойства “эгоистической” ДНК.

Список литературы

1. Гершензон С. М. Мутагенное действие ДНК, инсерции, транспозиции и нестабильные гены // Генетика и благосостояние человечества. – М.: Наука, 1981. – С. 70.
2. Гершензон С. М., Александров Ю. М., Милота С. С., Бужієвська Т. І., Карпова І. С., Ларченко К. А. Мутагенна дія нуклеїнових кислот і вірусів. – К.: Знання, 1999. – 29 с.
3. Карпова И. С., Пидлала О. В. Генетическая нестабильность у *Bacillus subtilis*, индуцируемая чужеродной ДНК // Мутагенное действие природных и синтетических полинуклеотидов. – Киев: Наук. думка, 1990. – С. 48–71.
4. Карпова І. С. Історія дослідження мутагенної дії нуклеїнових кислот на бактеріальній моделі – *Bacillus subtilis* // Генетика і селекція в Україні на межі тисячоліть. – К.: Логос, 2001. – С. 477–483.
5. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. – М.: Мир, 1984. – 480 с.
6. Zabarovsky E. R., Kashuba V. I., Kholodnyuk I. D., Zabarovska V. I., Stanbridge E. J., Klein G. Rapid mapping of NotI linking clones with differential hybridization and Alu-PCR // Genomics, 1994. – 21. – P. 486–489.
7. Muratani K., Hada T., Yamamoto Y. Inactivation of the cholinesterase gene by Alu-insertions possible mechanism for human gene transposition // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 1991. – 88, N 12. – P. 11315–11319.
8. Wessler S. R. Transposable elements and the evolution of gene expression // Symp. Soc. Exp. Biol. – 1998. – 51, N 1. – P. 115–122.
9. International Human Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome // Nature. – 2001. – 409. – P. 860–921.
10. Baltimore D. Our genome unveiled // Nature. – 2001. – V. 409. – P. 814–816.

Представлено В. А. Кунахом  
Поступила 15.02.2006

ІНСЕРЦІЙНИЙ МЕХАНІЗМ ДНК-МУТАГЕНЕЗУ  
(До 100-ліття від дня народження С. М. Гершензона)

І. С. Карпова, Н. Г. Горовенко<sup>1</sup>,  
С. В. Подольська<sup>1</sup>, З. І. Россоха<sup>1</sup>,  
Н. В. Корецька, В. В. Дмитренко, С. Ю. Римарь

Інститут молекулярної біології і генетики  
НАН України

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

<sup>1</sup> Національна медична академія післядипломної освіти ім. П. Л. Шупика

Україна, 04112, м. Київ,  
вул. Дорогожицька, 9

Гіпотеза С. М. Гершензона, котра стосується механізмів ДНК-мутагенезу, розглядається в світлі нових відкриттів в галузі молекулярної генетики. На бактеріальній моделі *Bacillus subtilis*, що підтвердила особливості ДНК-мутагенезу – специфічність та генетичну нестабільність мутацій, наведені докази на користь їх інсерційного механізму.

Ключові слова: ДНК-мутагенез, *Bacillus subtilis*, генетична нестабільність *Alu*-повтор.

INSERTIONAL MECHANISM OF DNA-MUTAGENESIS

(to centenary after S. M. Gershenson's birthday)

I. S. Karpova, N. G. Gorovenko<sup>1</sup>,  
S. V. Podolskaya<sup>1</sup>, Z. I. Rossokha<sup>1</sup>,  
N. V. Koretskaya, V. V. Dmytrenko, S. E. Ryman

Institute of Molecular Biology and Genetics  
NAS of Ukraine

Ukraine, 03143, Kyiv, Zabolotnoho Str., 150

<sup>1</sup> P. L. Shupick National Medicinal Academy of  
postgraduate education

Ukraine, 04112, Kyiv, Dorogozhitskaja Str., 9

The hypothesis of S. M. Gershenson concerning the mechanisms of DNA-mutagenesis is under consideration in connection with new discoveries in field of molecular genetics. Using *Bacillus subtilis* as the model, with what such peculiarity of DNA-mutagenesis as specificity and genetical instability of mutants where established, the insertional mechanism for the mutations have been proved.

Key words: DNA-mutagenesis, *Bacillus subtilis*, genetical instability, *Alu*-repeat.

## ВІКТОР АНАТОЛІЙОВИЧ КУНАХ

(ДО 60-ЛІТТЯ ВІД ДНЯ НАРОДЖЕННЯ)



Віктор Анатолійович КУНАХ

**28 квітня** виповнилося 60 років від дня народження доктора біологічних наук, професора, члена-кореспондента НАН України, Лауреата Державної премії України в галузі науки і техніки, Лауреата премії ім. В. Я. Юр'єва НАН України, Першого віце-президента Українського товариства генетиків і селекціонерів ім. М. І. Вавилова, головного редактора журналу "Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів" Віктора Анатолійовича Кунаха.

В. А. Кунах народився в с. Селець Черняхівського району Житомирської обл. в родині Анатолія Гнатовича та Василини Африканівни. Його дитинство та юність пройшли у с. Селець, м. Запоріжжя та селищі Томаківка Дніпропетровської обл., звідки родом його батько – нащадок запорізьких козаків. Після закінчення зі срібною медаллю Томаківської середньої школи у 1964 р. поступив на біологічний факультет Київського державного університету ім. Т. Г. Шевченка, який закінчив з відзнакою у 1969 р. за кваліфікацією "біолог-генетик, учитель біології і хімії".

Свої перші наукові дослідження з цитогенетичного вивчення рослинних клітин у культурі *in vitro* розпочав ще в студентські роки в Інституті ботаніки ім. М. Г. Холодного НАН України, де одночасно з навчанням на стаціонарі працював старшим лаборантом протягом 1966–1969 рр. У 1969–1971 рр. служив у лавах Радянської Армії. За успішне виконання бойових завдань під час військових навчань "Двіна" у 1970 р. гвардії лейтенанта В. А. Кунаха нагороджено медаллю "За воинскую доблесть. В ознаменованіе 100-летия со дня рождеия В. И. Ленина".

Після строкової служби і по теперішній час працює в Інституті молекулярної біології і генетики НАН України, пройшовши шлях від молодшого наукового співробітника до завідувача відділу генетики клітинних популяцій. Під керівництвом члена-кореспондента НАН України, професора, Лауреата Ленінської премії В. П. Зосимовича виконав і у 1975 р. захистив у Київському державному університеті ім. Т. Г. Шевченка кан-

дидатську дисертацію "Цитогенетичне вивчення клітинних популяцій у культурі ізольованих тканин рослин". Це була перша на теренах СРСР дисертація з генетики культивованих клітин рослин. У 1989 р. в Інституті цитології і генетики Сибірського відділення АН СРСР (м. Новосибірськ, Росія) захистив докторську дисертацію "Мінливість та добір в популяціях культивованих клітин рослин". В Інституті молекулярної біології і генетики НАН України у 1983 р. створив лабораторію генетики клітинних популяцій, яку в 1988 р. реорганізовано у відділ. У 1993 р. йому присвоєно вчене звання професора за спеціальністю "генетика", а у 1997 р. – обрано членом-кореспондентом НАН України зі спеціальності "фізіологія рослин, генетика".

Головний напрям наукових досліджень професора В. А. Кунаха – біологія культивованих *in vitro* клітин рослин. Його основні праці присвячено вивченню геномної мінливості у процесах дедиференціації та диференціації клітин, установленню закономірностей протікання процесів геномної мінливості та добору в клітинних популяціях, пошуку шляхів регуляції мінливості у популяціях культивованих клітин і створенню на цій основі високопродуктивних клітинних штамів – продуцентів біологічно активних речовин рослинного походження, перш за все лікарських речовин (фітопрепаратів). Започаткував в Україні генетичні дослідження культивованих клітин, є засновником нового наукового напрямку – генетики клітинних популяцій.

Видатним науковим досягненням В. А. Кунаха є теоретичне обґрунтування й експериментальне підтвердження положення про те, що культивовані *in vitro* клітини є новою, експеримен-

тально створеною системою, що характеризується своєрідністю ряду властивостей і особливостей, і, разом з тим, підкоряється загальнобіологічним популяційним закономірностям, зокрема, закону гомологічних рядів у спадковій мінливості М. І. Вавилова. Для популяцій культивованих клітин є властивим високий рівень мінливості, головною причиною якої є вичленування клітин зі складу цілісного організму, що призводить до порушення корелятивних зв'язків, передусім гормональної системи, обґрунтована провідна роль гормональної системи у регуляції рівня геномної мінливості клітинних популяцій рослин, доведено, що гормональні зміни в культурі *in vitro* спричинюють не лише виникнення генетичних порушень у клітинах, а й зміни напрямку клітинного добору.

Ґрунтуючись на власних дослідженнях, професор В. А. Кунах разом з колегами створив кілька десятків унікальних клітинних штамів цінних лікарських рослин, насамперед рідкісних, зникаючих та тропічних. Особливу увагу він приділяє рослинам, які підвищують стійкість організму людини до екстремальних чинників, мають антистресову, антимутагенну та радіопротекторну дію, застосовуються для профілактики і лікування серцево-судинних захворювань. Зокрема, створені та впроваджені у промисловість перші у світі високопродуктивні клітинні штами раувольфії зміїної (джерело протиаритмічного алкалоїду аймаліну), клітинні штами женьшеню, родіоли рожевої, унгернії Віктора тощо.

Віктор Анатолійович бере активну участь у підготовці наукових кадрів: читав і читає курси лекцій з клітинної селекції, молекулярної біології, біотехнології, генетики у Київському націо-

нальному університеті ім. Тараса Шевченка, Міжнародному Соломоновому університеті, Тернопільському національному педагогічному університеті ім. В. Гнатюка, Волинському державному педагогічному університеті ім. Лесі Українки та ін. Підготував трьох докторів наук та 15 кандидатів наук у галузі генетики, молекулярної генетики, клітинної біології, біотехнології, фізіології рослин, молекулярної біології, біохімії.

Автор монографії "Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи", співавтор підручника "Біотехнологія рослин", чотирьох томів із серії монографій "Біотехнологія в сільському господарстві й лісництві" видавництва "Шпрінгер", монографії "Анеуплоїдія" видавництва Алан Р. Ліс, Нью-Йорк. Опублікував понад 350 наукових праць і створив та запатентував 30 винаходів у галузі клітинної селекції та біотехнології рослин.

В. А. Кунах – член президії Українського товариства клітинних біологів, член редколегії журналу "Біополімери і клітина", член кількох спеціалізованих учених рад із захисту докторських дисертацій, експерт ВАКУ України тощо.

Відмінник освіти України, нагороджений медалями СРСР, зокрема, медаллю "За трудовое отличие", срібною і трьома бронзовими медалями ВДНГ СРСР, почесними грамотами Міністерства освіти і науки України, Президії НАН України, ВАКУ України, нагрудним знаком "Знак пошани" Київського міського голови тощо.

Бажаємо Віктору Анатолійовичу Кунаху міцного козацького здоров'я, щасливого творчого довголіття, подальших звершень та наснаги.

*Президія Українського товариства  
генетиків і селекціонерів  
ім. М. І. Вавилова  
Редколегія журналу  
"Вісник Українського товариства  
генетиків і селекціонерів"*

## ЯРОСЛАВ БОРИСОВИЧ БЛЮМ

(ДО 50-ЛІТТЯ ВІД ДНЯ НАРОДЖЕННЯ)

**Д**октор біологічних наук, професор, академік НАН України, перший заступник академіка-секретаря Відділення загальної біології НАН України, заступник директора Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, Лауреат премії ім. В. Я. Юр'єва НАН України Я. Б. Блюм народився 8 квітня 1956 р. в с. Топори Ружинського району на Житомирщині у родині вчителів. Під впливом батька з раннього дитинства зацікавився біологією, і після закінчення середньої школи із золотою медаллю поступив на біологічний факультет Київського державного університету ім. Т. Г. Шевченка у 1973 р. Навчався на кафедрі біохімії, де закінчив аспірантуру і працював асистентом, молодшим, а потім старшим науковим співробітником. Кандидатську дисертацію захистив у 1982 р., а докторську – у лютому 1988 р., невдовзі після переходу на роботу до Інституту ботаніки ім. М. Г. Холодного АН УРСР. З 1988 р. завідував лабораторією Відділення клітинної біології та генетичної інженерії, створеного акад. НАН України Ю. Ю. Глебою у цьому ж інституті (з 1998 р. – Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України), а з 2002 р. завідує відділом цього ж інституту (нині відділ геноміки та біотехнології). З січня 1992 р. після від'їзду Ю. Ю. Глеби на роботу за кордон Я. Б. Блюм став одночасно виконувати обов'язки директора інституту, будучи офіційно призначеним на посаду заступника директора у 1995 р.

Ярослав Борисович БЛЮМ

На початку свого наукового шляху Ярослав Борисович досліджував роль посттрансляційних модифікацій ядерних білків у регуляції надмолекулярної структури хроматину, розвинув уявлення про біохімічні механізми регуляції структурно-функціональних властивостей хроматину. Тепер він є визнаним у світі вченим у галузі клітинної біології і біотехнології рослин: досліджує молекулярну організацію і механізми функціонування цитоскелету клітин вищих рослин. Наприкінці 80-х – початку 90-х рр. вивчав роль мікротрубочок у процесах отримання та ста-

білізації соматичних гібридів рослин, отримав низку мутантних за білками цитоскелету ліній рослин, які були використані з метою створення соматичних гібридів та ізолювання генів тубуліну для створення трансгенних рослин зі стійкістю до гербіцидів з анти-мікротрубочковою активністю (динітроаніліни, фосфоамідати та фенілкарбамати). Вперше встановив значення посттрансляційних модифікацій тубуліну (фосфорилування, ацетилювання, полігютамилування та тирозилування/детирозилування) як одного з механізмів регуляції функціонування мікротрубочок рослинної клітини.

Сьогодні професор Я. Б. Блюм досліджує роль мікротрубочок у відповіді рослин на вплив абіотичних чинників із застосуванням методів функціональної геноміки для розробки біотехнологічних підходів регуляції функціонування цитоскелету та з метою адаптації клітин до даних факторів. Започаткував дослідження у галузі структурної біоінформатики рослин в Україні, розробивши трьовимірні моделі FtsZ-білків та тубулінів. Розробив нові маркерні системи на основі мутантних генів тубуліну для селекції трансгенних рослин в умовах *in vitro*. До кола його наукових інтересів входить також розробка нових прийомів створення трансгенних ліній культурних рослин і наукове обґрунтування їх безпечного використання, пошук генів стійкості до гербіцидів та фунгіцидів. Неодноразово організовував міжнародні наукові заходи з клітинної біології, геноміки, біотехнології рослин та біобезпеки.

Ярослав Борисович очолює комісію з питань біобезпеки при Міністерстві освіти і науки України, він голова ДНТП "Біотехнологія рослин та біобезпека".

У 2002 р. обраний першим віце-президентом Всеукраїнської асоціації біологів рослин, а у 2003 р. – співпрезидентом Товариства клітинних біологів та біотехнологів України. Автор і співавтор понад 350 наукових праць, у тому числі 4-х монографій та 5-ти патентів. Під його керівництвом захищено 14 кандидатських дисертацій.

Значний внесок у зміцнення міжнародних наукових зв'язків України він вніс як член Дорадчої ради НАТО з питань наук та технологій про життя (2002–2004 рр.). Співзасновник і член Ради директорів Чорноморської біотехнологічної асоціації, віце-президент та член наглядової ради Міжнародної організації "Громадські дослідження та регуляція в біотехнології", національний представник України у Федерації Європейських товариств біологів рослин та Міжнародній Асоціації культури тканин та клітин рослин і біотехнології.

Професор Я. Б. Блюм поєднує наукову роботу з педагогічною діяльністю на біологічному факультеті Київського національного університету імені Тараса Шевченка, де за його участю на базі Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України у 1989 р. була створена кафедра клітинної біології і генетичної інженерії цільового призначення, яку він очолив у 1992 р. Багато випускників цієї кафедри вже працюють у наукових та вищих навчальних закладах України і закордоном.

Бажаємо Ярославу Борисовичу міцного здоров'я, подальших творчих звершень, наснаги та щасливого довголіття.

Президія Українського товариства генетиків і селекціонерів ім. М. І. Вавилова  
Редколегія журналу  
"Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів"



## СТАН ТА ПРОБЛЕМИ РОЗВИТКУ БІОТЕХНОЛОГІЇ В УКРАЇНІ

(ЗА РЕЗУЛЬТАТАМИ НАУКОВОЇ КОНФЕРЕНЦІЇ)

В. А. КУНАХ

19–21 грудня 2005 року в м. Києві відбулася наукова конференція “Сучасна біотехнологія в сільському господарстві та медицині”, організована Українським товариством генетиків і селекціонерів ім. М.І.Вавилова за сприяння і підтримки Інституту молекулярної біології і генетики НАН України та Інституту цукрових буряків Української академії аграрних наук.

У роботі конференції, яка проходила в Інституті цукрових буряків УААН, взяли участь провідні біологи, аграрії, медики, підприємці, а також молоді вчені з Києва, Криму, Львова, Одеси, Донецька, Луганська, Запоріжжя, Тернополя, Житомира тощо. Всього було зареєстровано 108 учасників, які представляли 13 обласних відділень УТГіС ім. М.І. Вавилова, 36 наукових, навчальних та підприємницьких установ і організацій, у тому числі 24 установи з-поза меж м. Києва.

Відкрив конференцію привітанням та вступним словом президент УТГіС ім. М.І. Вавилова, директор Інституту цукрових буряків академік УААН **М. В. Поїк**. На пленарному засіданні 19 грудня 2005 р. було заслухано і обговорено 5 доповідей з найактуальніших напрямів сучасної біотехнології. Зокрема, академік НАН України та УААН **О. О. Созінов** (Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, м. Київ) виклав стан, проблеми і перспективи селекції рослин в Україні і світові тенденції розвитку цього напрямку. Його доповідь “Селекція рослин у вік геноміки і біотехнології” і доповідь академіка УААН **Ю. М. Сиволапа** (Південний біотехнологічний центр у рослинництві УААН і МОН України, м. Одеса) “Молекулярні маркери в рослинництві України” привернули увагу слухачів, викликали зливу питань і широке обговорення стану селекції рослин як в Україні, так і у світі.

Член-кореспондент НАН України **Я. Б. Блюм** (Інститут клітинної біології і генетичної інженерії НАН України, м. Київ) проаналізував потенціал геноміки для розвитку біотехнології рослин в Україні, напрями подальших досліджень з отримання трансгенних рослин, а також стан і тенденції застосування таких рослин у світовому сільському господарстві та харчовій промисловості.

З доповіддю "Тривалість життя людини і біотехнологія рослин" виступив член-кореспондент НАН України **В. А. Кунах** (Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, м. Київ). Доповідач проаналізував динаміку середньої та максимальної тривалості життя людини, навів статистику основних причин смертності, на конкретних прикладах обґрунтував необхідність подальшого розвитку біотехнології лікарських та найважливіших сільськогосподарських рослин, що, в кінцевому рахунку, поліпшує як лікування, так і якість та тривалість повноцінного життя людини.

Цікавою і пізнавальною, на думку учасників конференції, була доповідь члена-кореспондента НАН України, академіка АМН України **В. А. Кордюма** (Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, м. Київ) "Біотехнологія людини". Багато дискусій, особливо в кулуарах, викликали оригінальні погляди, твердження та цікаві експериментальні дані, отримані під керівництвом проф. В.А. Кордюма з лікування спадкових захворювань, виконаних на експериментальних тваринах як модельних об'єктах.

На пленарному засіданні 20 грудня було зроблено також 5 доповідей. З великою увагою і зацікавленістю учасники конференції вислухали доповіді члена-кореспондента АМН України **Н. Г. Горювенко** (Київська медична академія післядипломної освіти ім. П. Л. Шупіка, м. Київ) "Сучасні проблеми генетики мультифакторіальних захворювань", доктора біол. наук **М. В. Кучука** (Інститут клітинної біології і генетичної інженерії НАН України, м. Київ) "Отримання трансгенів та транспластомних рослин у деяких сільськогосподарських видів", доктора біол. наук **О. В. Мит-**

**рофанової** із співавторами (Нікітський ботанічний сад УААН, м. Ялта, Крим та Інститут біохімії і фізіології рослин і мікроорганізмів РАН, м. Саратов, Росія) "Біотехнологія оздоровлення кісточкових плодів дерев від вірусних хвороб", доктора біол. наук **Л. Л. Лукаш** (Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, м. Київ) "Біотехнології на основі стовбурових клітин людини", кандидата біол. наук **С. І. Ковтун** (Інститут розведення і генетики тварин УААН, с. Чубинське Київської обл.) "Біотехнологічні методи відтворення тварин".

У рамках конференції відбулося засідання двох секцій "Генні та клітинні технології та ДНК-технології" і "Мікроклональне розмноження, оздоровлення рослин та інші аспекти біотехнології", а також стендові сесії. Серед доповідей на секціях особливу увагу привернули доповіді доктора біол. наук **Л. О. Бугаєнко** зі співавторами (Південний філіал "Кримський агротехнологічний університет" національного аграрного університету, м. Сімферополь) "Розробка біотехнології мікроклонального розмноження і оздоровлення рослин лаванди", кандидата біол. наук **І. В. Митрофанової** із співавторами (Нікітський ботанічний сад УААН, м. Ялта, Крим та Інститут біохімії і фізіології рослин і мікроорганізмів РАН, м. Саратов, Росія) "Соматичний ембріогенез і регенерація рослин з листових експлантів каладіума (*Caladium hortulanum*)", кандидата біол. наук **Л. І. Сигиденко** (Луганський національний аграрний університет) "Арабідопсис як донор генів у селекції культурних рослин методами трансгенозу", доктора біол. наук **Д. В. Федорович** із співавторами (Інститут біології клітини НАН України, м. Львів) "Генно-інженерне конструю-

вання штамів флавіногенних дріжджів *Candida famata* з високою активністю рибофлавінокінази”, кандидата біол. наук **Н. Л. Щербак** із співавторами (Інститут клітинної біології і генетичної інженерії НАН України, м. Київ) “Вплив LOX-сайту, розташованого біля правого бордеру T-ДНК, на експресію безпромоторного *bar* гена”, кандидата біол. наук **П. Г. Коваленка** та члена-кореспондента НАН України **С. С. Малиюти** (Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, м. Київ) “Накопичення вторинних метаболітів (флавоноїдів і гліцирризину) у трансформованих коренях солодцю *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. після обробки їх грибом – еліситором, отриманим з ендоефітної мікоризи лікарської рослини перстачу”, кандидата мед. наук **З. І. Россохи** (Київська медична академія післядипломної освіти ім. П.Л. Шупіка, м. Київ) “Генетичні фактори у розвитку перинатальної патології новонароджених”, кандидата біол. наук **Г. П. Петюха** (Інститут цукрових буряків УААН, м. Київ) “Колонізація рослин картоплі бактерією роду *Pseudomonas in vitro*”, кандидата біол. наук **В. М. Мельника** із співавторами (Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, м. Київ та Тернопільський національний педагогічний університет ім. В. Гнатюка) “Культура *in vitro* тирличів *Gentiana* L. – перспективне джерело лікарської сировини” тощо.

У цілому, на конференції із 86 заявлених доповідей було заслухано та обговорено 10 пленарних доповідей, 15 доповідей на засіданнях секцій та 48 стендових повідомлень. На заключному засіданні було проведено загальну дискусію, на якій підбито підсумки стану та перспектив розвитку сучасних напрямів біотехнології в Україні. Кон-

статовано, що в деяких наукових закладах дослідження проводяться на світовому рівні. Проте, таких закладів в Україні менше десяти. У багатьох виступах відмічалось, що Україна за останні роки поступово втрачає, а за окремими напрямками вже втратила ті досить високі позиції, наприклад, з біотехнології рослин, які вона займала у 80–90-х роках минулого століття. Різко зменшилась кількість експериментальних досліджень з біотехнології тварин, на початкових стадіях розвитку зі значним відставанням від світового рівня знаходяться дослідження з медичних напрямів біотехнології. У багатьох науково-дослідних закладах та університетах згорнуто фундаментальні дослідження з сучасних напрямів біології, які лежать в основі подальшого розвитку різних біотехнологій. Рефреном звучала думка про те, що влада України просто ігнорує сучасні, а тому порівняно дорогі, наукові напрями, які конче необхідні як для подальшого розвитку новітніх біотехнологій, так і для підготовки спеціалістів у цих галузях. Висловлено низку пропозицій з поліпшення роботи членів УТГІС ім. М.І. Вавилова як на місцях, так і у керівних органах товариства. Схвально оцінено роботу Президії товариства, яка щороку організує наукові конференції з актуальних напрямів сучасної генетики, селекції, біотехнології, питань експериментальної еволюції організмів тощо.

Підводячи підсумки конференції, Президія УТГІС на своєму окремому засіданні рекомендувала редколегії журналу “Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів” розглянути можливість публікації у вигляді наукових статей кращих доповідей, представлених на конференції. Деякі з цих статей опубліковано у цьому числі журналу.

## ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРІВ

Редакція приймає до друку статті членів Українського товариства генетиків і селекціонерів ім. М. І. Вавилова з різних аспектів генетики, селекції, біотехнології, медичної генетики українською, російською або англійською мовами. До статті, написаної англійською мовою, додається український або російський переклад.

Обсяг експериментальних статей зі всіма матеріалами – до 12 сторінок, оглядових – до 26 сторінок машинописного тексту.

До тексту статті додаються направлення установи, де виконана робота, та/або голови первинної організації УТПС ім. М.І.Вавилова, в яких працює автор (автори).

Під час написання статті потрібно дотримуватись такого плану:

- вказати індекс УДК, назву статті, ініціали та прізвища авторів, повну назву установи (установ), поштову адресу установи (установ). У разі декількох авторів статті біля їхніх прізвищ та установ, в яких вони працюють вказується один і той самий верхній цифровий індекс;

- викласти короткий зміст публікації (анотацію), вказати ключові слова;

- вступ, в якому слід стисло подати стан проблеми і обґрунтування роботи;

- у розділі “Матеріали і методи” слід подати відомості про методи дослідження в розрізі, достатньому для їх відтворення;

- розділ “Результати та обговорення” має бути коротким, підсумкова частина статті повинна бути в кінці розділу;

- перелік літератури складається в порядку цитування і друкується на окремому аркуші. У тексті необхідно посилатися на відповідний номер джерела літератури у квадратних дужках. У списку необхідно навести прізвище та ініціали автора в оригінальній транскрипції курсивом, назву статті, журналу або книги. Для періодичних видань далі вказують рік видання, том, номер, перша та остання сторінки; для неперіодичних – місце видання, назва видавництва, рік видання, кількість сторінок. Детальні вимоги до переліку літератури дивіться у Бюлетні ВАК України, № 1, 2003 року.

Номери позицій на ілюстраціях розміщують за годинниковою стрілкою. Кожна позиція повинна мати пояснення у підписі під рисунком. Усі позначення мають відповідати чинним стандартам. На звороті кожної ілюстрації вказують її номер, назву статті, прізвище автора. Розміри ілюстрації не повинні перевищувати розміри друкованої сторінки журналу.

Формули та математичні знаки слід вписувати чорним чорнилом, чітко зображуючи кожну літеру, показник ступеня, індекс і розмічати таким чином:

- однотипні за написанням великі та малі літери будь-якого алфавіту простим олівцем;

- великі – двома рисками знизу, малі – двома рисками зверху;

- літери латинського алфавіту, подібні за написанням до українських, підкреслюють хвилястою лінією, грецького – червоним олівцем, готичні – синім;

- літери українського алфавіту у формулах підкреслюють квадратною дужкою знизу і на полях рукопису в колі подають їх роз’яснення (наприклад, К – укр.);

- елементи, що набираються у формулах прямим шрифтом, також підкреслюють квадратною дужкою;

- нарядкові індекси та показники ступеня позначають простим олівцем знаком підвищення (дужкою знизу), а порядкові індекси – знаком пониження (дужкою зверху). Формули нумерують (з правого боку в круглих дужках) лише ті, на які в тексті є посилання.

Рукопис статті надсилається на дискеті та паперових носіях (у двох примірниках, надрукованих через два інтервали у текстовому редакторі Word, шрифт № 12, Times New Roman).

До кожного примірника статті додаються резюме українською, російською та англійською мовами (6–8 рядків).

Перед словом “Резюме” пишуться (на всіх вищевказаних мовах): повна назва статті, ініціали і прізвища авторів, назви та адреси (поштової і електронні) установ. Безпосередньо після тексту резюме розміщуються ключові слова. У кінці аркуша – адреса (поштова та електронна) і телефон першого автора для зв’язку з редакцією.

Статтю підписують усі автори, вказуючи домашню адресу, номер домашнього та службового телефону, повну назву установи, її місцезнаходження.

**Матеріали, надіслані без дотримання зазначених вимог, редакція не розглядатиме.**

© УКРАЇНСЬКЕ ТОВАРИСТВО ГЕНЕТИКІВ І СЕЛЕКЦІОНЕРІВ, 2006

Комп'ютерна верстка

*І. Г. Васинюк*

Коректор

*К. С. Мірзамухамедова*

Технічний редактор

*М. С. Чабан*

Підписано до друку 06.06.2006. Формат 70 × 100 1/16. Папір офс.

№ 1. Гарнітура "Прагматика". Друк офс.

Ум. друк. арк. 11,3. Обл.-вид. арк. 11,76.

Наклад 300 прим. Зам. 2496.

Видавництво "ЛОГОС"

Свідоцтво ДК № 201 від 27.09.2000 р.

01030, Київ-30, вул. Богдана Хмельницького, 10, тел. 235-60-03

# ВІСНИК

УКРАЇНСЬКОГО ТОВАРИСТВА  
ГЕНЕТИКІВ І СЕЛЕКЦІОНЕРІВ

ISSN 1810-7834. ВІСН. УКР. ТОВ-ВА ГЕНЕТИКІВ І СЕЛЕКЦІОНЕРІВ, 2006, Том 4, № 1

