

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

Резюме

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

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

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

¹ ГНУ Всероссийский Научно-Исследовательский Институт Сельскохозяйственной биотехнологии РАСХН

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

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

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

⁴ Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН

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

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

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

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

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

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

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

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

Материалы и методы.

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

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

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

Результаты и обсуждение

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

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

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

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

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

Выводы

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

ЛИТЕРАТУРА

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

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

Резюме

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

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

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

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

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

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