

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.<sup>1</sup>, ФАЮРА Л.Р.<sup>1</sup>, ПРОТЧЕНКО О.В.<sup>1</sup>, ФЕДОРОВИЧ Д.В.<sup>1</sup>,  
БОРЕЦЬКИЙ Ю.Р.<sup>1</sup>, СИБІРНИЙ А.А.<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>Інститут біології клітини НАН України, Україна, 79005, Львів, вул. Драгоманова 14/16. <sup>2</sup>Rzeszów 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;

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

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

### Матеріали і методи

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

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

### Результати і обговорення

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

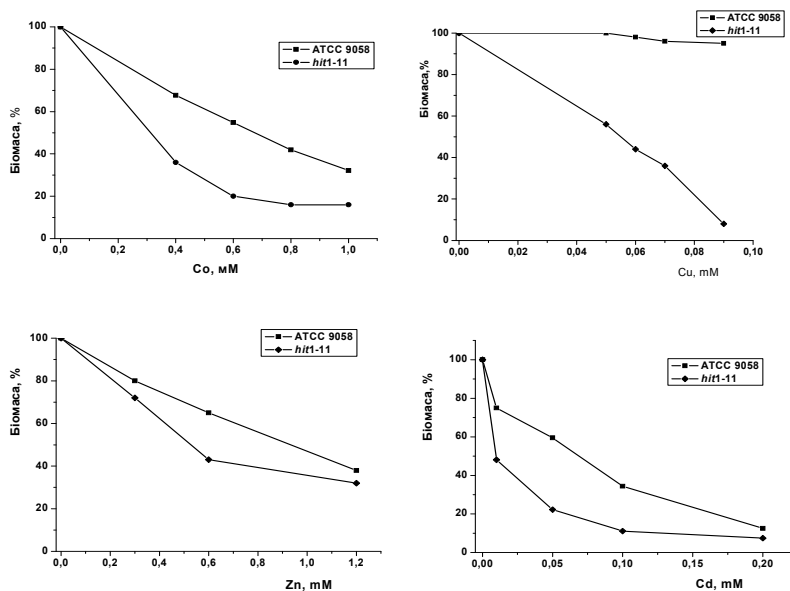


Рис.1 Вплив різних концентрацій іонів Co(II), Cu(II), Zn (II) і Cd(II) на ріст мутанта *hit1*

Зміни флавіногенної активності та асиміляції заліза під впливом іонів перехідних металів вивчали при концентраціях, які на 50% пригнічували ріст клітин дикого типу ATCC 9058 при інкубації клітин з логарифмічної фази росту у рідкому середовищі (1 мг/1 мл) протягом 12-24 годин. При інкубації дріжджів у середовищі, що містило Co (0,9 мМ), продуктивність флавіногенезу зростала у штама дикого типу ATCC 9058 у 5-6 разів, а у мутантів *rib80*, *rib81* та *hit1* – у 5-10 разів (табл.). Дуже сильне зростання продукції РФ (більше як у 20 разів) спостерігалось у найслабшого за флавіногенною активністю мутанта *red6*. Внесення в середовище 1 мМ CdCl<sub>2</sub> не викликало зростання продуктивності біосинтезу РФ у жодного з досліджуваних штамів, проте призводило до екскреції клітинами неідентифікованих сполук з голубою флюоресценцією в ультрафіолеті, можливо, похідних інтермедіатів флавіногенезу. Вплив іонів цинку (0,6 мМ) на продукцію флавінів був значно слабшим, ніж інших металів, а флавіногенна активність штаму *red6* за наявності цинку не змінювалась зовсім. Іони міді незначно змінювали флавіногенну активність досліджуваних штамів (дані не приведені).

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

Таблиця

Продуктивність флавіногенезу штамів дикого типу і мутантів дріжджів *P. guilliermondii*, інкубованих 12 год з/без 0,9 мМ CoCl<sub>2</sub> і 0,6 мМ ZnSO<sub>4</sub> (мкг РФ/ мг клітин)

Штам	ATCC9058 M±m	<i>rib80</i> M±m	<i>rib81</i> M±m	<i>hit1</i> M±m	<i>red6</i> M±m
Контроль	0.11±0.008	2.48±0.21	9.56±0.57	1.69±0.13	0.21±0.001
+Co	0.63±0.044	18.1±1.1	48.86±3.4	15.97±0.9	3.9±0.027
+Zn	0.19±0.015	7.5±0.52	15.1±0.9	5.01±0.4	0.22±0.0017

Про зміни в асиміляції заліза клітинами мутантів свідчить і зростання фериредуктазної активності клітин мутантів при інкубації в середовищі, що містить іони Co(II) і Cu(II). Раніше було показано, що клітини мутантів *rib80*, *rib81*, *hit1*, *red6* здатні з високою швидкістю відновлювати Fe<sup>3+</sup> до Fe<sup>2+</sup> [Бабяк і співав., 2001]. В присутності іонів Cd(II) або Zn(II) фериредуктазна активність клітин всіх мутантів знижувалась. Очевидно, за цих умов зростання вмісту заліза в клітинах зумовлене активацією систем поглинання цього металу, в які не залучена фериредуктаза.

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

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

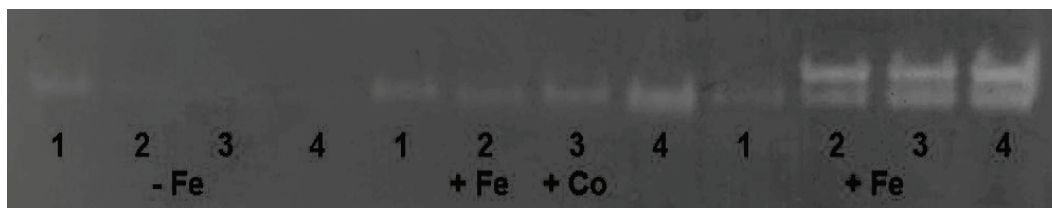


Рис. 2. Вплив умов вирощування на активність СОД в екстрактах клітин штаму дикого типу *P. guilliermondii*.

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

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

### Література

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

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

### Резюме

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

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

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

### СОКОЛОВА Е.И.

Луганский национальный аграрный университет,  
Украина, 91008, г. Луганск, Луганский национальный аграрный университет,  
e-mail: [s-e-i@mail.ru](mailto:s-e-i@mail.ru)

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

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

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

#### Материалы и методы

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

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