

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

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

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

**ЦИГАНКОВА В.А.<sup>1</sup>, ІУТИНСЬКА Г.О.<sup>2</sup>.**

<sup>1</sup>*Інститут біоорганічної хімії і нафтохімії НАН України  
02094, Київ, вул. Мурманська, 1*

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

## **ДОСЛІДЖЕННЯ СТУПЕНЮ ГОМОЛОГІЇ мРНК ПРИ НОРМАЛЬНОМУ І СТИМУЛЬОВАНОМУ РЕГУЛЯТОРАМИ РОСТУ РОСЛИН**

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

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

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

### **Матеріали та методи**

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

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

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

Досліди проводили при температурі 25<sup>0</sup>С і 18-годинному світловому фотоперіоді в світловому блоці. В дослідях використовували зародкову вісь квасолі, морфогенетичні, фізіологічні і біохімічні характеристики якої раніше детально були вивчені [4], а також дорослі рослини сої на стадії цвітіння.

**Виділення сумарного препарату РНК.** Тканини зародкових осей квасолі руйнували в буферному розчині 1 (0,05М трис-НСl, рН 7,6; 0,01М MgCl<sub>2</sub>; 0,06 М КСl; 1%-ний ДДС-На и 4 М гуанідінтіоціанат). Отриманий лізат двократно обробляли гарячим водонасиченим фенолом з хлороформом; РНК із водної фази осаджували етанолом, обробляли протеїназою К, повторно депротеїнізували сумішшю фенолу з хлороформом и знову осаджували етанолом. Присутні в препаратах РНК домішки полісахаридів екстрагувалися за допомогою метоксиетанола, після чого РНК осаджували цетавлоном, а від цетавлону РНК відмивали багатократним перерозчиненням в 0,01 М розчині оцтовокислого калію і переосадженням етанолом з надміром оцтовокислого калію [5].

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

#### Результати та обговорення

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

Таблиця 1

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

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

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

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

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

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

Таблиця 2

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

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

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

## Висновки

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

### Література

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

### Резюме

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

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

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

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

**KURCHII B.A.**

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

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

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

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

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

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

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