

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

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

<sup>1</sup>СМОЛИКОВА (АЛЕКСЕЙЧУК) Г.Н., <sup>2</sup>СЛИВИНСКАЯ Э., <sup>3</sup>ТЭЙЛОР А.

<sup>1</sup> Институт экспериментальной ботаники им. В.Ф. Купревича НАН Беларуси, Беларусь, 220072, Минск, ул. Академическая, 27, e-mail: [aleks.galina@gmail.com](mailto:aleks.galina@gmail.com)

<sup>2</sup> Университет технологии и наук о жизни, лаборатория генетики и селекции растений, Быдгошч, Польша

<sup>3</sup> Корнельский университет, сельскохозяйственная экспериментальная станция штата Нью-Йорк, США

## АНАЛИЗ РЕПЛИКАЦИИ ДНК ПРИ ПРОРАСТАНИИ СЕМЯН КЛЕЩЕВИНЫ



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

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

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

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

### **Материалы и методы**

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

### **Результаты и обсуждение**

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

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

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

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

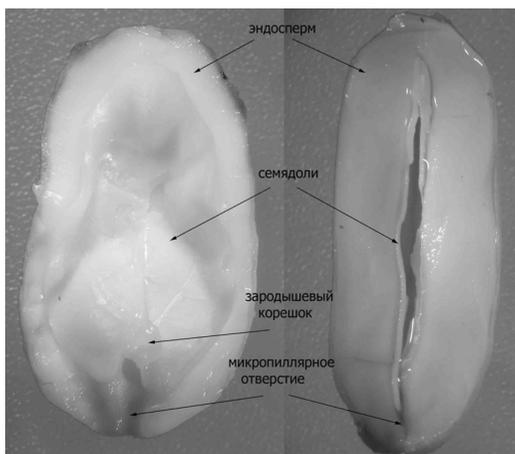
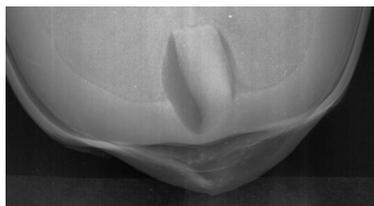


Рис. 1. Морфологическое строение семени клещевины



Партия "А" (семена способны к прорастанию)

Партия "Б" (семена не прорастают)

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

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

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

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

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

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

Таблица

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

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

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

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

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

*Работа поддержана грантом БФФИ Б09МС-004.*

#### **Литература**

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

#### **Резюме**

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

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

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

**ТРУБАЧЕЕВА Н.В., ПЕРШИНА Л.А.**

*Институт цитологии и генетики СО РАН*

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

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

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

**Материалы и методы**

Изучены аллоплазматические линии, сформированные на основе самоопыленных потомков BC<sub>1</sub>–BC<sub>4</sub> поколений ячменно-пшеничных гибридов *H. marinum* subsp. *gussoneanum* Hudson (2n=28) x *T. aestivum* L. (Пиротрикс 28) (2n=42) (Першина и др., 2006). Линии разделялись на эуплоидные (2n=42) и анеуплоидные (2n=40+2t; 2n=40+4t) и различались по проявлению фертильности. В таблице представлены данные о происхождении изученных линий. Использованы следующие методы анализа: геномная *in situ* гибридизация (GISH), ПЦР-анализ со специфическими праймерами к участку, фланкирующему 5'-конец 18S/5S повтора мтДНК злаков, ОТ-ПЦР 18S/5S повтора.

**Результаты и обсуждение**

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