

Работа поддержана грантом РФФИ №08-04-01412 и Программой Президиума РАН «Биоразнообразие и динамика генофондов».

Литература

1. Klungland H., Vage D. Molecular genetics of pigmentation in domestic animals // Current Genomics.- 2000.- Vol. 1. P. 223-242.
2. Беляев Д.К. Проблемы и перспективы исследований по генетике и селекции животных// Генетика.- 1987.- Т. 23. С. 937-946.
3. Трут Л.Н. Некоторые аспекты генетики пегостей серебристо-черных лисиц (*Vulpes vulpes* L.) и взаимоотношения вектора отбора и направления изменчивости.// Проблемы генетики и теории эволюции.- Новосибирск: Наука. -1991. С.- 67-84.
4. Прасолова Л.А., Трут Л.Н. Эффект гена “Star” на скорость миграции меланобластов у эмбрионов серебристо-черных лисиц (*Vulpes vulpes*).//ДАН.-1993.- Т. 329. С. 787-789.
5. Трут Л.Н., Плюснина И.З., Прасолова Л.А., Ким А.А. Hooded аллель и отбор диких серых крыс (*Rattus norvegicus*) по поведению.// Генетика.- 1997.- Т. 33. С. 679-685.
6. Оськина И.Н., Плюснина И.З. Гипофизарно-надпочечниковая система при отборе животных на доместикационное поведение.// Современные концепции эволюционной генетики. Новосибирск: ИЦиГ.- 2000.- С. 327-334.
7. Seckl JR. Glucocorticoids, developmental 'programming' and the risk of affective dysfunction.// Prog. Brain Res.- 2008.- Vol. 167. P. 17-34.
8. Yamamura K. Ogita Z. Markert C. The use of chimeric rats in the analysis of the hooded pigmentation pattern.// In: Genetic approaches to developmental neurobiology. - Berlin: Springer-Verlag.- 1982.- P. 111-120.
9. Потапов М.А., Рогов В.Г., Евсиков В.И. Влияние популяционного стресса на встречаемость водяных полевок (*Arvicola Terrestris* L.) с белыми отметинами.// ДАН.- 1998.- Т. 358.- С. 713-715.
10. Guerrero-Bosagna C., Sabat P., Valladares L. Environmental signaling and evolutionary change: can exposure of pregnant mammals to environmental estrogens lead to epigenetically induced evolutionary changes in embryos?// Evol. Devel.- 2005- Vol. 7. P. 341–350.
11. Rando O., Verstrepen R. Timescales of Genetic and Epigenetic Inheritance.//Cell.- 2007.- Vol. 128. P. 655–668.
12. Ванюшин Б.Ф. Метилирование ДНК и эпигенетика.//Генетика. 2006.- Т. 42. С. 1186-1199.

Резюме

Установлено, что глюкокортикоидные гормоны принимают участие в развитии меланобластов и возникновении депигментации у животных при отборе на доместикационное поведение.

It is shown that the glucocorticoid hormones may be involved in melanoblast development and in the appearance of white spotting in animals selected for domestic behavior.

ПОТОПАЛЬСЬКИЙ А.І., ЮРКЕВИЧ Л.Н., КАЦАН В.А.

Інститут молекулярної біології та генетики НАН України,
Україна, 03143, Київ, проспект академіка Заболотного, 150,
e-mail: potopalsky@imb.org.ua

ГОМЕОБОКСНІ ГЕНИ ЯК МОЖЛИВІ МІШЕНІ ДІЇ ЕКЗОГЕННИХ ДНК ПРИ ОТРИМАННІ НОВИХ ФОРМ ЖИТА

Можливість отримання форм рослин зі зміненими спадковими ознаками, в тому числі й селекційно цінними, за допомогою екзогенних ДНК (е-ДНК) була показана ще в 70-х–80-х роках минулого сторіччя [1-5], проте механізми дії екзогенного генетичного матеріалу на геном рослин і по сьогоднішній день є предметом дискусій. Аналізуючи результати досліджень, отримані іншими дослідниками та в нашій лабораторії, можна прийти до висновку, що екзогенні ДНК перш за все впливають на системи регуляції геному хазяїна, які відповідають за адаптацію до змін у довкіллі [6]. Складність і неодноплановість змін, які індукуються е-ДНК, може бути пояснена тим, що мішенню їхньої дії стають ключові регуляторні гени в сигнальних сітках від факторів довкілля та шляхах реалізації відповіді на дію таких факторів. Заслуговує на увагу, що ключові гени сигнальних шляхів від факторів довкілля, а також такі, з якими пов'язані кількісні ознаки, зокрема врожайність рослин, мають, як правило, гомеобоксну природу, а системи регуляції їхньої активності є важливим фактором забезпечення пластичності геному рослин [7-13]. Дуже зручною моделлю для дослідження впливу екзогенних ДНК на гомеобоксні гени могли б стати зернові, в яких механізми адаптації до низьких температур пов'язані з наявністю генів озимості-яровості, які мають гомеобоксну природу і здатні переходити до іншого алельного стану під впливом абіотичних та біотичних стресорів, що здавна використовується в селекції [7-11]. Оскільки в нашій лабораторії значну увагу приділено отриманню перспективних форм зернових, здатних давати високі врожаї в зміненому внаслідок техногенного впливу довкілля, метою даної роботи є аналіз селекційно цінних змін, отриманих у жита за допомогою е-ДНК, побудова гіпотез у зв'язку з необхідністю більш поглибленого дослідження механізмів впливу е-ДНК на спадковість рослин.

Матеріали і методи

Для отримання форм жита зі зміненими ознаками при дії нативних екзогенних нуклеїнових кислот (е-ДНК) та модифікованих за допомогою трифункціонального алкілувального агента тіофосфаміду – тіоТЕФА (е-ДНК(т)) нами використане диплоїдне озиме жито Житомирське ($2n=2x=14$). Цей сорт отриманий на Поліській дослідній станції сімейним та груповим добором із жита сорту Поліське, він районований у Житомирській області. Насіння вихідного сорту чистої лінії вихідного сорту жита попередньо пророщували протягом 24 годин та переносили на 24 години у водні розчини е-ДНК та е-ДНК(т), після чого ретельно промивали водою. Були використані нативні та модифіковані тіоТЕФА ДНК тваринного походження: із тімусу теляти (препарат Олайнського заводу, $M \approx 10 \div 12 \cdot 10^6$ Д), ДНК людини; ДНК рослинного походження – кукурудзи, пирію, гороху, щиріці, люпину, отримані в нашій лабораторії згідно з методикою, описаною раніше [14] з модифікаціями, наведеними в роботах [15,16]. Згідно з даними електрофорезу в гелі агарози, M використаних нами нативних рослинних ДНК коливалася в межах $10 \div 15 \cdot 10^6$. Вміст основної речовини у використаних препаратах ДНК був не меншим від 95 %, концентрація ДНК у розчинах для інфільтрації насіння в різних варіантах досліду перебувала в межах $100 \div 400$ мкг/мл. У 1-му поколінні, отриманому від рослин, вирощених із обробленого ДНК насіння (T_1), враховували наступні параметри: схожість, виживання паростків, появу безхлорофільних паростків. У поколіннях T_1 - T_3 відбирали форми, які мали зміни за типом розвитку (озимість-яровість), висотою рослин, будовою колосу та стебла, кущенням, термінами дозрівання зерна та ін. Усі рослини вирощували на ізольованих ділянках, на суцвіття до зацвітання вдягали пергаментні ізолятори. Обробку насіння озимого жита розчинами препаратів ДНК поєднували із висівом його у весняний період. Для оцінки відмінностей досліджуваних параметрів використано t -критерій Стьюдента [17].

Результати та обговорення

Препарати геномної ДНК тваринного та рослинного походження при дії їх на проростаюче насіння спричинили появу форм рослин зі зміненим типом розвитку (табл. 1), але найбільшу ефективність при цьому виявили е-ДНК із тімусу теляти та е-ДНК людини. Високий вихід ярових рослин було отримано також при застосуванні е-ДНК пирію в концентрації 200 мкг/мл. Серед досліджених модифікованих ДНК здатними індукувати появу рослин із яровим типом розвитку виявилися тільки е-ДНК(т) із тімусу теляти, е-ДНК(т) людини та одна із рослинних ДНК – е-ДНК(т) топінambuру. Ярові форми рослин, вирощені з обробленого насіння, виколосилися у період із середини липня до середини вересня й дали фертильне насіння.

Насіння 38 сімей рослин із ярим типом розвитку було висіяне в польових умовах. Серед отриманих рослин виявлено форми зі змінами форми та розмірів листя на ранніх етапах розвитку. У поколінні T_1 рослини сімей від варіантів обробок е-ДНК людини (400 мкг/мл) та е-ДНК пирію (200 мкг/мл) мали довші (на 12,4 та 18,5% відповідно; $P=0,001$) й ширші (на 12,5 та 26,3% відповідно; $P=0,001$) листки та збільшену кількість листків на кущ. Рослинам із сімей від варіантів обробки е-ДНК гороху (100 мкг/мл) було притаманно збільшення ширини листків (на 15,9%; $P=0,001$). ДНК із тімусу теляти (100 мкг/мл) спричинювала появу рослин зі зменшеною довжиною (на 11,3%; $P=0,01$) та збільшеною шириною (на 16,6%; $P=0,001$) листків. У варіанті із застосуванням алкілованої ДНК топінambuру (100 мкг/мл) спостерігали рослини зі зменшеною довжиною та шириною листків (на 17,7% та 30,8% відповідно; $P=0,001$). У поколінні T_1 в деяких варіантах досліду спостерігали появу хлорофілових мутацій. Найбільша їх кількість виявлена при дії препаратами е-ДНК із тімусу теляти, 200 мкг/мл ($2,08 \pm 1,84\%$) та е-ДНК людини, 400 мкг/мл ($3,3 \pm 2,3\%$). Меншу їх кількість виявлено при дії препаратів нативних ДНК рослинного походження ($1,56 \pm 1,40\%$). Хлорофілові мутації були притаманні також наступним поколінням рослин від варіантів обробки насіння е-ДНК із тімусу теляти та е-ДНК людини ($0,05 \pm 0,002\%$). При дії аналогічних е-ДНК(т) хлорофіліві мутації не спостерігали. Не виявлено хлорофілові мутації також у контролі.

У поколінні T_0 у варіанті обробки насіння жита е-ДНК гороху (100 мкг/мл) з частотою $1,7 \pm 0,7\%$ виявлено рослини зі зміненою структурою колосу (гіллястість типу *compositum*). У поколінні T_1 , отриманому від цих рослин, виявлено також наступні морфологічні зміни: потовщення стебла, збільшення головного колосу; у 2-х із 25 сімей спостерігали успадковування ознаки гіллястості колосу. Потомство цих сімей в T_2 мало жовту соломину, широку листову пластинку, а окремі екземпляри – підвищене продуктивне кушіння.

Утворення значно більшої кількості продуктивних стебел було притаманне деяким рослинам покоління T_1 після дії е-ДНК пирію в концентрації 200 мкг/мл (до 40 стебел на кущ). При дії е-ДНК гороху в концентрації 100 мкг/мл у рослин покоління T_1 спостерігали зменшення висоти стебла в середньому на 18,1% ($P=0,001$), поруч зі збільшенням кількості продуктивних стебел та довжини колосу (на 44,1 та 43,8% відповідно; $P=0,001$). За допомогою е-ДНК із тімусу теляти були індуковані також рослини з гіллястим колосом та розсіченою на вузькі частини листовою пластинкою. Остання ознака була виявлена незалежно в іншій сім'ї покоління T_2 від цього варіанту обробки.

Отже, за допомогою використаних е-ДНК нами отримано рослини жита зі спадковими змінами типу розвитку та одночасними змінами комплексу морфологічних змін, зокрема висоти, форми і розмірів листків та колосся. Обумовленість таких змін можна пояснити тим, що мішенями дії е-ДНК стали важливі гомеобоксні гени, які регулюють процеси розвитку й морфогенезу в рослин, адаптуючи їх до змін у довкіллі. Зокрема, при отриманні ярових форм жита із озимих можливий алельний перехід гена *vrn*, і такий перехід може індукуватись, перш за все, змінами в системі регуляції

геному, яка сприймає сигнали від стресора і стає тригером для запуску роботи систем, які реалізують певний рівень пластичності геному.

Таблиця 1

Частота появи рослин з яровим типом розвитку в поколінні T₀ після дії нативними та модифікованими екзогенними ДНК на проростаюче насіння озимого жита сорту Житомирське

Варіант досліджу	Ярових рослин, %		Варіант досліджу	Ярових рослин, %	
	M _i ±m	M ₀ ±m		M _i ±m	M ₀ ±m
Контроль (дистильована вода)	2,00±1,16	2,00±1,16	Той же		
ДНК із тімусу теляти, мкг/мл			ДНК(т) із тімусу теляти, мкг/мл		
100	12,96±4,57	14,37±2,25***	100	8,33±3,56	8,26±2,50*
200	11,66±4,12		200	8,13±3,51	
300	17,24±4,95				
400	15,65±4,58				
ДНК людини, мкг/мл			ДНК(т) людини, мкг/мл		
100	13,84±4,28	14,77±2,37***	100	12,50±4,41	12,50±4,41*
200	16,66±4,80		200	12,50±4,41	
300	14,58±5,08				
400	14,00±4,90				
ДНК гороху, мкг/мл			ДНК(т) гороху, мкг/мл		
100	11,29±2,85	10,56±2,77***	100	5,97±2,89	5,87±2,89
200	9,84±4,00				
ДНК пирію, мкг/мл			ДНК(т) пирію, мкг/мл		
100	4,83±2,72	10,80±2,33***	100	6,89±3,32	3,44±1,41
200	17,0±4,93		200	0	
ДНК нетреби колючої, мкг/мл			ДНК(т) нетреби колючої, мкг/мл		
100	9,52±3,69	8,19±2,01**	100	6,00± 3,35	2,00±1,45
200	10,52±4,06		200	0	
300	4,54±2,56		300	0	
ДНК щиріці, мкг/мл			ДНК(т) щиріці, мкг/мл		
100	10,63±4,49	9,62±2,87**	100	4,00±2,32	4,28±1,71
200	8,62±3,68		200	4,47±2,32	
ДНК топінамбуру, мкг/мл			ДНК(т) топінамбуру, мкг/мл		
100	8,33±3,56	7,82±2,08**	100	6,45±3,11	6,34±1,83*
200	8,00±3,83		200	9,00±3,69	
300	7,14±3,44		300	3,57±2,47	

Примітка. Відмінність від контролю достовірна при: * – P=0,05; ** – P=0,01; *** – P=0,001.

Висновки

1. За допомогою препаратів е-ДНК у рослин озимого жита індуковано комплекс спадкових змін, серед яких найважливішими є такі, які є важливими для селекції, зокрема, зміна типу розвитку з озимого на яровий, поява морфологічних змін, які сприяють стійкості до вилягання (зменшення висоти та потовщення стебла) та морфологічних змін, сприятливих для підвищення врожайності жита – збільшення довжини колосся, кількості продуктивних стебел, галуження колоса та ін.
2. Характер змін, отриманих за допомогою е-ДНК у жита, вказує на те, що мішенню дії е-ДНК є, очевидно, гомеобоксні гени, які регулюють тип розвитку та виявлення кількісних ознак, пов'язаних із врожайністю. Такий вплив може реалізуватися як шляхом мутацій таких генів та змін рівня їхньої активності за допомогою систем регуляції геному, відповідальних за адаптацію до змін у довкіллі.

Література

1. Сиволап Ю.М., Хорошевская Л.П. Эффект введения участков генома ржи растениям ячменя // Цитология и генетика. – 1976. – **10**, № 4. – С. 320-325.
2. Сиволап Ю.М., Образцов И.С., Хорошевская Л.П. Генетический эффект введения ДНК в высшие растения // Республиканский межведомственный сборник “Молекулярная биология”. Киев, 1978. – Вып. 19. – С. 20-27.
3. Картель Н.А. Эффекты экзогенной ДНК у высших растений. – Минск: Наука и техника, 1981. – 143 с.
4. Ларченко Е.А., Моргун В.В. Экспериментальная изменчивость кукурузы. – Киев: Наукова думка, 1993. – 173 с.
5. Потопальский А.И., Кацан В.А., Юркевич Л.Н. Итоги и перспективы получения растений семейства пасленовых с помощью нативных и модифицированных ДНК // Овощеводство и бахчеводство. – 2005. – Т.51. – С. 181-197.
6. Кацан В.А., Потопальський А.І. Екзогенні ДНК можуть впливати на регуляторні системи рослин, відповідальні за адаптацію до змін у довкіллі // Біополімери та клітина. – 2006. – **22**, № 4. – С. 307-316.
7. Trevaskis B., Bagnal D.J., Ellis M.H., Peacock W.J., Dennis E.S. MADS-box genes control vernalization-induced flowering in cereals // PNAS. -2003. - **100**, № 22. – P. 13099-13104.
8. Loukoianov A., Yan L., Blechl A., Sanches A., Dubcovsky J. Regulation of *VRN-1* vernalization genes in normal and transgenic polyploid wheate // Plant Physiol. – 2005. – **138**, № 4. – P. 2364-2373.
9. Kane N.A., Danyluk J., Tardif J., Ouellet F., Laliberte J.-F., Limin A.E., Fowler B., Sarhan F. TaVRT-2, a member of the *StMADS-11* clade of flowering repressors is regulated by vernalization and photoperiod in wheat // Plant Physiol. – 2005. – **138**, № 4. – P. 2354-2363.
10. Fowler D., Breton G., Limin A.E., Mahfoozi S., Sarhan F. Photoperiod and temperature interactions regulate low-temperature-induced gene expression in barley // Plant Physiol. – 2001. – **127**, № 4. – P. 1676-1681.
11. Baga M., Chodaparambil S.V., Limin A.E., Pecar M., Fowler D.B., Chibbar R.N. Identification of quantitative trait loci and associated candidate genes for low-temperature tolerance in cold-hardy winter wheat // Funct. Integr. Genomics. – 2007. – **7**, № 1. – P. 53-68.
12. Komatsuda T., Pourkheirandish M., He S., Azhaguel P., Kanamori H., Perovic D., Stein N., Graner A., Wicker T., Tagiri A., Lundquist U., Fugimura T., Matsuoka M., Matsumoto T., Yano M. Six-rowed barley originated from a mutation in a homeodomain-leucine zipper 1-class homeobox gene // PNAS. – 2007. – **104**, № 4. – P. 1424-1429.
13. Mallikarjuna Swamy B.P., Narla N. Yield-enhancing quantitative trait loci (QTLs) from wild species // Biotechnology edvances. – 2008. – **26**. – P. 106-120.
14. Сквирская Э.Б., Чепинога О.П. Практикум по нуклеопотеидам и нуклеиновым кислотам. – Москва: Высшая школа, 1964. – 214 с.
15. Пацковский Ю.В., Соловьян В.Т., Потопальский А.И., Ткачук З.Ю. Степень алкилирования и физико-химические свойства модифицированных тиофосфамидом ДНК // Республ. межвед. сборник “Молекулярная биология”. – Киев, 1984. – Вып. 37. – С. 44-50.
16. Способ получения дезоксирибонуклеиновой кислоты из растительного сырья: А.с. СССР № 1170871 Т, МКИ С 12 N 15/00, С 07 Н 21/00. / З.Ю. Ткачук, А.И. Потопальский (СССР). – № 2995141; Заявлено 03.10.80 г., А.с. видано 01.04.85.
17. Кокунин В.А. Статистическая обработка данных при малом числе опытов // Укр. биохим. журн. – 1975. – **47**, № 6. – С. 776-790.

Резюме

Для получения новых форм ржи использованы препараты экзогенных ДНК животного и растительного происхождения в диапазоне концентраций 100÷400 мкл/мг. Растворами ДНК обрабатывали прорастающие семена озимой ржи сорта Житомирская. Получены новые формы растений с яровым типом развития и комплексом селекционно ценных изменений, связанных с урожайностью. Предлагается возможный механизм изменения наследственных признаков растений при помощи экзогенных ДНК.

Для отримання нових форм жита використано препарати екзогенних ДНК тваринного та рослинного походження в діапазоні концентрацій 100÷400 мкл/мг. Розчинами ДНК обробляли проростаючі насіння озимого жита сорту Житомирське. Отримані нові форми рослин із яровим типом розвитку та комплексом селекційно цінних ознак, пов'язаних із урожайністю. Пропонується можливий механізм зміни спадкових ознак рослин за допомогою екзогенних ДНК.

The preparation of the exogenic DNAs purified from animals and plants have been used in the concentrations ranging from 100 mcl/mg to 400 mcl/mg to obtaining the new forms of the rye. Germinating seeds of the winter habit rye cultivar Jitomirskaya were treated by the solutions of DNAs. The new forms of plants with spring habit have been obtained, that possessing the complex of the usefull features. The possible mechanism of plant heredity exchanging by using the preparations of exogenic DNAs have been proposed.

РАДЧЕНКО О.М.

*Институт фізіології рослин і генетики НАН України
Україна, 03022, Київ, вул. Васильківська, 31/17*

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИЙ ПОЛІМОРФІЗМ СОРТІВ ОЗИМОЇ М'ЯКОЇ ПШЕНИЦІ

Найбільш інформативними маркерами для вивчення геному сортів злаків є молекулярно-генетичні маркери, що базуються на визначенні поліморфних послідовностей ДНК [1,2]. Захист прав селекціонерів потребує необхідності мати чітку систему паспортизації. Традиційно для паспортизації сортів використовуються фенотипові ознаки. На сьогодні паспортизація сортів рослин широко проводиться за допомогою молекулярних маркерів на основі полімеразної ланцюгової реакції. Найбільш зручними молекулярними маркерами для цього є мікросателітні маркери – SSR, які розташовані в різних областях геному і характеризуються високим рівнем поліморфізму та кодомінантним успадкуванням. Нами був використаний SSR-аналіз для паспортизації сортів пшениці селекції Інституту фізіології рослин і генетики НАН України та інших селекційних центрів.

Матеріали і методи

Досліджували 10 сортів озимого м'якої пшениці: Богдана, Крижинка, Подолянка, Володарка, Київська 8, Київська остиста, Українка 0246, Панна, Кавказ, Naphal. ДНК виділяли цетилтриметиламоніум бромідним (СТАБ-методом) [3,4]. У досліді використовували 10 пар праймерів до наступних мікросателітних локусів: Xgwm 3, Xgwm 325, Xgwm 261, Xgwm 18, Xgwm 437, Xgwm 165, Xgwm 357, Xgwm 095, Xgwm 155, Xgwm 186 (табл. 1). Ампліфікацію фрагментів ДНК проводили на ампліфікаторі Терцик (Росія). Електрофорез фрагментів ампліфікації проводили в 2% агарозному гелі при напрузі 500 В протягом однієї або півтори години.