

Кроме того установлена высокая противовоспалительная активность 9-ОДК на моделях формалинового, белкового и лидокаинового воспалений, по сравнению с контролем, а также более высокая антифлогистическая активность на двух последних моделях по сравнению с *ортофеном* – официальным препаратом, широко применяемым в ветеринарии и медицине.

Водные растворы 9-ОДК- и 10-ГДК в дозе 0,3 мг/кг, заменяющие питьевую воду во время отравления пестицидами, увеличивают среднесмертельные дозы Банвела (в 2,8 и 2,04 раза соответственно) и Дивидента (в 2,3 и 1,6 раза соответственно) и обладают значительным антидотным действием.

В заключение можно высказать вполне достоверное предположение, что подкормка пчел феромонными композициями «Аписил» и «Кандисил» (на основе 9-ОДК) и «Биосил» (10-ГДК) будет способствовать оздоровлению пчелиных семей и повышению их устойчивости к отравлениям, что определяется значительной фармакологической и антидотной активностью их составляющих.

#### **Выводы**

Совместными исследованиями ученых – химиков и ветеринаров выявлен целый комплекс ранее неизвестных замечательных фармакологических свойств полного синтетического аналога «маточного вещества» - многофункционального феромона медоносных пчел.

#### **Литература**

1. Кузьмина К. А. Лечение пчелиным медом и ядом // Изд-во Саратовского университета. – 1973. – 90 с.
2. Иимуратов Г. Ю., Иимуратова Н. М., Толстиков Г. А.. Наступит ли феромонный бум в России? // Вестник РАСХН. – 2002. – № 6. – С. 81-82.
3. Лужников Е.А. Клиническая токсикология.- М.: Медицина, 1982.- 327 с.

#### **Резюме**

Joint research of chemists and veterinary scientists revealed a set of formerly unknown remarkable pharmacological properties which are synthetic fully analogous to “queen-cell matter” – multifunctional pheromone of honey bee.

### **КОЛОДЯЖНАЯ Я.С.<sup>1</sup>, КОЧЕТОВ А.В.<sup>1</sup>, КИРСАНОВА С.Н.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, 630090, факс (383)333 12 78, e-mail: jana\_k@bionet.nsc.ru

<sup>2</sup>ГНУ Всероссийский институт картофельного хозяйства РАСХН, Московская область, Россия

### **ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫЕ РАСТЕНИЯ ТАБАКА (*Nicotiana tabacum* L.) И КАРТОФЕЛЯ (*Solanum tuberosum* L.), ХАРАКТЕРИЗУЮЩИЕСЯ ПОВЫШЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ К ЗАСОЛЕНИЮ**

Различные абиотические стрессы, такие как холод, засуха, засоление, затопление, воздействие критических температур, токсические концентрации тяжелых металлов, высокая кислотность или щелочность почв, повышенное содержание озона, дефицит элементов минерального питания, изменение уровня освещенности и т.д. снижают продуктивность сельскохозяйственных растений в два раза и более, а при высокой выраженности и достаточно долгой продолжительности стресса приводят их к гибели.

В стрессовых условиях у растений происходит индукция генов, контролирующих синтез соединений, вызывающих ответную реакцию растений на абиотические стрессы (осмопротекторов и нейтрализаторов свободных радикалов (Bohnert, Sheveleva, 1998); белков поздних стадий эмбриогенеза (Ingram, Bartels, 1996;

Tomashoff, 1999; Bray et al, 2000), усиливается синтез антиоксидантных ферментов, белков теплового шока и шаперонов; соединений, участвующих в поглощении и транспорте воды и ионов, таких как аквапорины и транспортеры ионов (Serrano et al, 1999; Tyerman et al, 1999; Blumbald, 2000; Chapman, 1998; Frank et al, 2000), ферментов синтеза и деградации совместимых осмолитов – низкомолекулярных органических соединений, которые в высоких концентрациях не тормозят протекание клеточного метаболизма. К таким осмолитам относятся аминокислоты (пролин, аланин), четвертичные ионы (бетаин, глицин-бетаин), сахара и сахароспирты (маннитол, сорбитол, трегалоза, инозитол), углеводы. Они понижают водный потенциал клеток, защищают ферменты от инактивации, обеспечивают целостность структурных белков и пр. (Delauney and Verma, 1993; Кузнецов, Старостенко, 1994; Кузнецов, Шевякова, 1999; Willenbrink and Husemann, 1995; Eimer, 2004; Кузнецов, Дмитриева, 2006; Groppe, Benavides, 2008). Известно, что при абиотических стрессах: засолении, засухе, пониженной и повышенной температуре происходит увеличение уровня пролина. Содержание пролина в стрессовых условиях может достигать 10% от сухой массы листьев, однако в большинстве случаев оно составляет 20-30 мг/г сухой массы. Данные по корреляции содержания пролина и устойчивости к абиотическим стрессам довольно противоречивы, что в определенной мере связано с значительными колебаниями содержания этой аминокислоты в разные периоды роста растений и даже в течение суток.

#### **Материалы и методы**

В качестве экспериментального материала были взяты полученные нами ранее генетически модифицированные (ГМ) растения табака и картофеля (сорта Никулинский), экспрессирующие ген пролиндегидрогеназы арабидопсиса, расположенный в антисмысловой ориентации (Кочетов и др., 2004; Колодяжная и др., 2006; Колодяжная и др., 2007). Данные ГМ растения характеризовались повышенным уровнем пролина. В качестве контроля были взяты нетрансгенные растения табака и картофеля.

*Оценка солеустойчивости.* Согласно данным других экспериментаторов, наличие 200 мМ хлорида натрия является токсичной концентрацией для взрослых растений табака, для картофеля эта величина составляет 100 мМ (Delauney and Verma, 1993). Был проведен ряд экспериментов по определению солеустойчивости растений:

1. Растения табака на стадии двух пар настоящих листьев, выращенные на среде MS, пересаживали на среду, содержащую хлорид натрия в концентрации 300, 400 и 500 мМ NaCl.
2. Оценка уровня обводненности растений. В эксперимент брали растения табака, находящие на стадии двух пар настоящих листьев. Их пересаживали на среду MS (контроль) и на MS с добавлением 300 мМ NaCl. Через 4-5 недель культивирования проводили взвешивание надземной части растений. Затем для определения сухой массы проводили высушивание при 70<sup>0</sup>С в течение суток. Содержание воды определяли как:

$$\frac{\text{вес растения (г)} - \text{сухой вес растения (г)}}{\text{вес растения (г)}} \cdot 100 \%$$

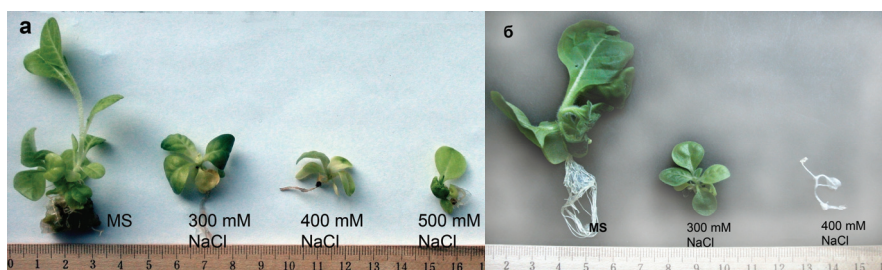
3. Полученные пробирочные трансгенные растения картофеля были высажены на среды с добавлением 150 мМ NaCl.
4. Пробирочные растения картофеля высаживали в летнюю теплицу на стеллажи с питательным грунтом на основе торфа с примесью органического удобрения (биогумуса) и влагоудерживающего гидрогеля в пластмассовые горшки диаметром 18 см. Контрольным растениям полив проводили 2 раза в неделю. А для исследования солеустойчивости опытных растений через 45 дней после посадки прекращали полив водой и поливали раствором NaCl в концентрации 30 г/л. Расход раствора NaCl

составлял 200 мл на 1 растение. Каждый вариант был представлен 10 ГМ и 10 контрольными растениями.

Для статистической оценки экспериментальных наблюдений использовали *t* – критерий Стьюдента для сравнения средних арифметических значений малых выборок.

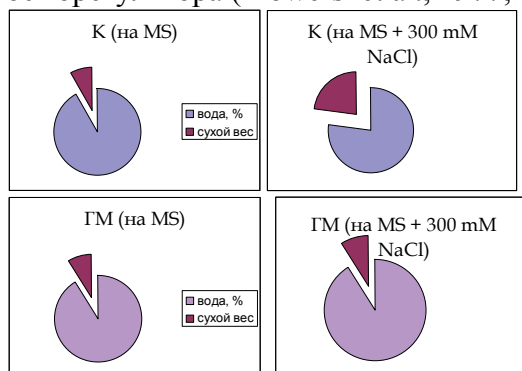
### Результаты и обсуждение

При росте на среде MS с добавлением 300, 400 и 500 мМ NaCl наблюдалось замедление роста как контрольных, так и ГМ растений табака. Однако, у ГМ растений замедление роста не так сильно выражено, о чем можно было судить по весу зеленой массы растений. У растений контрольной линии SR1 на среде с 300 мМ NaCl через 3 отмечено появление хлоротичных проростков, наблюдается замедление темпов роста. Концентрация 400 мМ является для них летальной (рис.1). При этом ГМ растения способны пережить стрессовую концентрацию, равную 500 мМ, в течение 3 недель.



**Рис.1.** Рост ГМ (а) растений и растений табака сорта SR1 (б) на среде с добавлением соли

Также был оценен уровень обводненности тканей. Обнаружено, что на среде MS и на среде с добавлением 200 мМ NaCl уровень обводненности у всех растений одинаков: 91-93%. Но при культивировании на среде с содержанием соли 300 мМ этот показатель у контрольных растений составляет уже 75-80%, в то время как у трансгенных растений в присутствии 300 мМ соли это значение остается неизменным (92-93%) (рис. 2). Результаты этих экспериментов свидетельствуют о том, что у ГМ растений табака при засолении не происходит нарушения водного статуса. По-видимому, большая водоудерживающая способность тканей ГМ растений в условиях интенсивного засоления по сравнению с растениями сорта SR1 обусловлена более интенсивным стресс зависимым накоплением пролина, который выступает в качестве осморегулятора (Flowers et al., 1977; Кузнецов, Шевякова, 1999).



**Рис. 2.** Уровень обводненности листьев ГМ и контрольных (К) растений табака при выращивании в нормальных условиях и при добавлении хлорида натрия.

При выращивании пробирочных растений картофеля на среде с добавлением 150 мМ хлорида натрия было выявлено явное преимущество части генетически модифицированных растений. Как видно на рисунке 3, для контрольных растений эта концентрация является летальной. В то время как трансгенные растения картофеля способны выживать при таком уровне засоления.



**Рис.3** . Рост растений картофеля на среде MS (1, 6) и на среде MS с добавлением 150 мМ хлорида натрия (2, 5 – ГМ растение; 3, 4 – контроль)

Эти трансгенные растения были расклонированы и высажены в грунт. В первый месяц после высадки ГМ линии обгоняли исходный сорт по приросту биомассы. В дальнейшем трансгенные растения по фенотипу практически не отличались от контроля.

В условиях стресса (засоления почвы) трансгенные линии сорта Никулинский превосходили контроль по урожайности в 2-3 раза. При этом клубни были более выровненные. Возможно, опережающий старт развития дает возможность трансгенным растениям завязать большее количество клубней, которые затем успевают сформироваться за счет оттока питательных веществ из ботвы даже в стрессовых условиях.

Таким образом, полученные нами ГМ растения обладают повышенной устойчивостью к засолению. Вероятно, трансгенные растения, синтезируя и накапливая в цитозоле пролин, могут гораздо быстрее понижать осмотический потенциал, удерживая воду, что обеспечивает стрессоустойчивость. Эти растения не отличаются фенотипически от растений исходного сорта, по-видимому, этот подход можно применять для модификации растений с целью получения форм, способных расти в условиях абиотического стресса, а также использовать данный подход для изучения роли пролина в обеспечении устойчивости к другим видам стресса.

#### Литература

1. Кочетов А.В., Титов С.Е., Колодяжная Я.С. и др. Повышение содержания пролина и осмотического давления клеточного сока у трансформантов табака, несущих антисмысловой супрессор гена пролиндегидрогеназы // Генетика. 2004. Т.40. № 2. С.282-285
2. Колодяжная Я.С., Титов С.Е., Кочетов А.В., Комарова М.Л., Романова А.В., Коваль В.С., Шумный В.К. Оценка солеустойчивости растений табака *Nicotiana tabacum*, несущих антисмысловой супрессор гена пролиндегидрогеназы // Генетика. 2006. V.42. № 2. pp.278-281
3. Колодяжная Я.С., Титов С.Е., Кочетов А.В. Перспективы получения ГМ растений картофеля, несущих антисмысловой супрессор гена пролиндегидрогеназы и обладающих повышенной устойчивостью к абиотическим стрессам // Минск. 2007. В сб.: Картофелеводство. Т.12. С. 37-42
4. Кузнецов Вл. В., Старостенко Н. В. Синтез белков теплового шока и их вклад в выживание интактных растений огурца при гипертермии // Физиол. Растений.-1994.- Т.41. №3.- С.374-380.
5. Кузнецов В.В., Шевякова Н.И. Пролин при стрессе: биологическая роль, метаболизм, регуляция // Физиол. растений.-1999.-46.-С.321-336.
6. Кузнецов В.В., Дмитриева Г.А. Физиология растений. М.. 2006. 742с.
7. Delauney A.J., Verma D.P.S. Proline biosynthesis and osmoregulation in plants // Plant J.-1993.- 4.-P. 215-223.

8. *Groppa M.D., Benavides M.P.* Polyamines and abiotic stress: recent advances // *Amino Acids*.-2008.-34.- P. 35-45

#### **Резюме**

Проведен анализ стрессоустойчивости генетически модифицированных растений табака и картофеля, несущих антисмысловой супрессор гена пролиндегидрогеназы и характеризующихся повышенным содержанием пролина. Показано, что полученные растения характеризуются повышенной устойчивостью к засолению.

We studied the stress resistance of genetically modified (GM) tobacco and potato plants bearing an antisense suppressor of the gene for proline dehydrogenase. Such plants are characterized by elevated proline content. The transgenic plants were shown to have elevated salt tolerance.

#### **КОПИЛОВ К.В., КОПИЛОВА К.В., КОВТУН С.І.**

*Институт розведення і генетики тварин УААН*

*Україна, 08321, Київська обл., Бориспільський р-н., с. Чубинське, вул. Погребняка, 1,  
e-mail: kovtun\_si@gala.net*

#### **ВИКОРИСТАННЯ МЕТОДІВ ДНК-АНАЛІЗУ ПРИ ВИЗНАЧЕННІ СТАТІ ТА ГЕНОТИПУВАННІ ДОІМПЛАНТАЦІЙНИХ ЕМБРІОНІВ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ**

Одним із основних завдань розвитку тваринництва України є впровадження у практику племінної справи сучасних методів ДНК-технологій з метою вдосконалення і підвищення ефективності селекційної роботи. Останні наукові розробки при дослідженні геному різних видів сільськогосподарських тварин на рівні ДНК, порівняно із класичними методами досліджень, дозволяють за більш короткий термін і на рівні носія спадкової інформації одержувати дані щодо особливостей генетичної структури, а також виявляти генетичні аномалії без застосування складного і дорогого методу генетичної експертизи за нащадками. Основу сучасних методів ДНК-аналізу складає використання маркерних систем поліморфних нуклеотидних послідовностей ДНК, що дозволяють тестувати генетичний поліморфізм безпосередньо на рівні генів.

Впровадження у практику сучасних методів ДНК-аналізу в Європейських країнах та США дає можливість отримати прибутки за рахунок скорочення часу генераційного інтервалу, раннього введення маточного поголів'я в процес відтворення та застосування різних молекулярно-генетичних маркерів, що дозволяють вести селекцію за допомогою маркерів (Marker Assisted Selection – MAS), тобто проводити підбір та добір батьківських пар певних генотипів та отримувати нащадків з відповідним генетичним потенціалом щодо основних показників продуктивності. У США, Німеччині селекція за В-алелем гена капа-казеїну включена до програм з відтворення великої рогатої худоби [1]. Крім цього, для підвищення ефективності ведення спеціалізованого скотарства вимагає впровадження економічно доцільних, сучасних методів ведення селекційної роботи одним з яких є визначення статі та генотипу доімплантаційних ембріонів [2, 3]. Цей метод дозволяє одержувати та відбирати ембріони, які мають племінну цінність та бажану стать і забезпечує можливість трансплантації декількох ембріонів одному реципієнту.

З метою розробки та впровадження швидкого методу визначення статі ембріонів великої рогатої худоби нами проведена робота з оптимізації умов ідентифікації статі доімплантаційних ембріонів із одночасним застосуванням Y-специфічних та X-специфічних праймерів методом полімеразної ланцюгової реакції