

10. *Kieser T.* Factors affecting the isolation of CCC DNA from *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli* // *Plasmid*.-1984, №12.- P.19-36.
11. *Russell A.D.* Plasmids and bacterial resistance to biocides// *J. Appl. Microbiol.*-1997.- Vol. 83, № 2.- P. 155-165.
12. *Su L.H., Chu C., Cloeckart A., Chiu C.H.* An epidemic of plasmid? Dissemination of extended-spectrum cephalosporinases among *Salmonella* and other *Enterobacteriaceae* // *FEMS Immunol Med Microbiol.*-2008.-Vol.52, № 2.-P.155-166.
13. *Wertz J.E., Riley M.A.* Chimeric nature of two plasmid of *Hafnia alvei* encoding the bacteriocins alveicins A and B // *J. Bacteriol.*-2004.-Vol.186, №6.- P.1598-1605.
14. *Yang F., Yang J., Zhang X. et al.* Genome dynamics and diversity of *Shigella* species, the etiologic agents of bacillary dysentery // *Nucleic Acids Res.*-2005.-Vol.33, № 19.-P. 6445-6458.
15. *Zaleski P., Wolinowska R., Strzezek K., Lakomy A., Plucianniczak A.* The complete sequence and segregation stability analysis of a new cryptic plasmid pIGWZ12 from a clinical strain of *Escherichia coli* // *Plasmid*.-2006.-Vol.56, № 3.-P.228-232.

### Резюме

Исследовано на наличие плазмидной ДНК 3 клинических штамма *Escherichia coli*. Штаммы 345 и 1257 содержат по 1 плазмиде - pEC345 (5,1 тпн) и pEC1257 (5,0 тпн) соответственно. Штамм 951 содержит 3 плазмиды: pEC951-1 (50 тпн), pEC591-2 (7,2 тпн) и pEC591-3 (1,7 тпн). С помощью рестрикционного анализа выявлено различное первичное строение плазмид pEC345 и pEC1257.

Three clinical strains of *Escherichia coli* were investigated on presence of plasmid DNA. Strains 345 and 1257 contained on only one plasmid - pEC345 (5,1 kb) and pEC1257 (5,0 kb) accordingly. Three plasmids were found in strain 951: pEC951-1 (50 kb), pEC591-2 (7,2 kb) and pEC591-3 (1,7 kb). Restrictional analysis has revealed different primary structure plasmids pEC345 and pEC1257.

Наявність плазмідних ДНК досліджувалася у трьох клінічних штамів *Escherichia coli*. Штами 345 та 1257 містили по одній плазміді - pEC345 (5,1 тпн) та pEC1257 (5,0 тпн). Штам 951 містив 3 плазмиди pEC951-1 (50 тпн), pEC591-2 (7,2 тпн) и pEC591-3 (1,7 тпн). За допомогою рестрикційного аналізу виявлено різну первинну будову плазмід pEC345 и pEC1257.

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

*Інститут молекулярної біології та генетики НАН України,*

*Інститут оздоровлення й відродження народів України,*

*Україна, 03143, Київ, вул. Академіка Заболотного, 150, e-mail: [potopalsky@imbg.org.ua](mailto:potopalsky@imbg.org.ua)*

### **ГОМЕОБОКСНІ ГЕНИ, ЯК МОЖЛИВІ МІШЕНІ ДІЇ ЕКЗОГЕННИХ ДНК ПРИ ОТРИМАННІ НОВИХ ФОРМ ЖИТА.**

#### **2.ЗАКОНОМІРНОСТІ ДІЇ ЕКЗОГЕННИХ ДНК ПРИ СЕЛЕКЦІЇ КОРОТКОСТЕБЛОВИХ ФОРМ ДИПЛОЇДНОГО ЖИТА**

В попередній нашій роботі повідомлялося про індукування за допомогою препаратів екзогенних ДНК (е-ДНК) та їх алкілованих тіофосфамідом аналогів (е-ДНК(т)) спадкових форм рослин з ярим типом розвитку в озимого диплоїдного жита сорту Житомирське, водночас зі змінами морфологічних ознак. Сприятливими для підвищення врожайності жита є збільшення кількості продуктивних стебел, довжини колосу, галузження колосу [1]. Дуже важливими є також форми жита з потовщеним та вкороченим

стеблом [1-3]. В умовах інтенсивної культури землеробства пошук нових методів селекції жита з укороченим, стійким проти вилягання стеблом набуває першочергового значення. Їх отримують в основному методами гібридизації, проте короткостебловість у сортів жита, які є носіями цієї ознаки, кодується багатьма рецесивними генами і має широку плейотропну дію [4]. Іншим недоліком сортів-донорів цієї ознаки є їх знижена морозостійкість, слабка коренева система та враження фітопатогенами, тому необхідні складні схрещування [4,5]. Відомі також виділені із гібридних сортів мутанти жита з моногенним кодуванням короткостебловості: EM-1, K-10028, в яких ознака обумовлена домінантним геном-супресором *H1* (*Humilus*) [6]. Для отримання константних короткостеблових форм жита використовують схрещування з насиченням (5-6) та багаторазовий добір гомозиготних нащадків [7]. Мутанти жита з укороченим стеблом можна отримувати також при дії хімічними та фізичними мутагенами [8,9] і, як уже повідомлялося, за допомогою е-ДНК [1-3]. Метою даного дослідження є аналіз закономірностей дії екзогенних ДНК при селекції короткостеблових форм диплоїдного жита.

### Матеріали і методи

Препаратами ДНК діяли на пророщене протягом 24 годин насіння рослин чистої лінії жита сорту Житомирське ( $2n=2x=14$ ), методом інфільтрації його водними розчинами ДНК упродовж 24 годин, після чого ретельно промивали водою. Використані препарати нативних та алкілованих трифункціональним алкілувальним агентом – тіофосфамідом ДНК із тимусу телят (Олайнський завод,  $M \approx 10 \div 12 \cdot 10^6$  Д), ДНК людини, а також отримані в нашій лабораторії [10-12] препарати рослинних ДНК – кукурудзи, щиріці, люпину. Згідно з даними електрофорезу в гелі агарози, М використаних в наших дослідженнях рослинних ДНК коливалася в межах  $10 \div 15 \cdot 10^6$  Д. Вміст основної речовини в препаратах був не меншим 95%, концентрація ДНК у розчинах для інфільтрації насіння перебувала в межах 100÷400 мкг/мл. Відбір форм жита з укороченим стеблом здійснювали, починаючи з покоління рослин, вирощених із обробленого насіння ( $T_0$ ). В наступних поколіннях аналізували ознаки, пов'язані із врожайністю (кількість продуктивних стебел, маса зерна з основного колосу, маса зерна з рослини). Рослини вирощували на ізольованих ділянках, на суцвіття до зацвітання вдягали пергаментні ізолятори. Оцінку достовірності різниці між дослідом та контролем оцінювали за Стьюдентом [13].

### Результати та обговорення

Рослини зі статистично вірогідним зменшенням довжини стебла виявлені в  $T_1$  у варіантах дослід, де були застосовані препарати е-ДНК із тимусу телят, е-ДНК кукурудзи та щиріці (Табл.). Залежність величини зменшення висоти стебла від концентрації проявлялася по-різному – досягнення плато за концентрації 200 мкг/мл у варіанті з тимусною ДНК та зростання ефекту з підвищенням концентрації до 400 мкг/мл – для ДНК кукурудзи. Алкіловані тіофосфамідом ДНК того ж походження також індукували появу короткостеблових форм жита; в алкілованому стані виявила ефект також е-ДНК людини. У варіанті з е-ДНК(т) кукурудзи також спостерігали зростання міри зниження висоти стебла жита при збільшенні концентрації препарату (Табл.). Статистично вірогідних змін параметрів врожайності в поколінні  $T_1$ . не спостерігали.

Таблиця

**Вплив препаратів екзогенних ДНК на довжину головного стебла (% від контролю) жита сорту Житомирське в  $T_1(1)$  та в  $T_2(2)$**

Препарат ДНК		е-ДНК				е-ДНК(т)		
		100 мкг/мл	200 мкг/мл	300 мкг/мл	400 мкг/мл	100 мкг/мл	200 мкг/мл	400 мкг/мл
тимусу	1	90,1±2,5***	81,2±2,8***	83,6±3,0***	82,0±1,7***	78,5±4,6***	90,7±3,8***	-
	2	93,1±3,2	80,4±3,5**	86,2±5,1*	82,2±5,9	83,0±3,7**	81,8±3,9**	-
людини	1	100,1±2,2	100,8±4,0	100,0±2,9	91,4±2,4*	100,8±2,9	91,3±2,4**	-
	2	92,6±4,6	105,4±3,2	89,5±4,7	85,9±2,3*	88,7±6,4	90,5±6,0	-
куку-	1	90,8±2,7**	91,1±2,4***	-	84,8±3,9***	100,2±2,0	91,4±1,9***	56,8±4,9***

рудзи	2	98,3±5,3	99,1±2,4	-	80,4±3,5***	86,5±4,8	82,3±1,7***	61,1±2,9***
щириці	1	91,8±4,5**	92,0±3,3**	-	-	92,4±3,3***	92,3±2,8***	-
	2	84,3±4,9***	74,8±4,3***	-	-	83,8±4,1*	90,1±2,4*	-
люпину	1	100,5±2,2	-	-	-	101,4±1,3	-	-
	2	100,8±2,1	-	-	-	92,2±3,1	-	-
контроль	1	108,98±1,78 см – 100%						
	2	131,5±3,80 см – 100%						

**Примітка:** Відмінність від контролю вірогідна при: \* –  $P \geq 0,1$ ; \*\* –  $P \geq 0,01$ ; \*\*\* –  $P \geq 0,001$ .

В поколінні  $T_2$  для варіанту з е-ДНК із тимусу ознака короткостебловості збереглася тільки для концентрації, рівної 200 мкг/мл; для е-ДНК кукурудзи – 400 мкг/мл, в той час як для е-ДНК шириці виявлено збереження ознаки для обох концентрацій (Табл.). Збереження ознаки короткостебловості в  $T_2$  було притаманне також для варіантів, де були використані е-ДНК(т) із тимусу та кукурудзи, і найбільш суттєве зниження висоти стебла (майже удвічі) теж виявлено за максимальної концентрації е-ДНК(т) кукурудзи. Алкіловані ДНК виявили статистично вірогідний вплив на параметри врожайності. Збільшення кількості продуктивних стебел спостерігали у варіантах з е-ДНК(т) із тимусу телят ( $P \geq 0,001$ ), кукурудзи (100, 200 та 400 мкг/мл,  $P \geq 0,001$ ) та шириці (100 мкг/мл,  $P \geq 0,001$ ); збільшення маси зерна з рослини – е-ДНК(т) із тимусу (100 та 200 мкг/мл,  $P \geq 0,001$ ) та е-ДНК(т) кукурудзи (200 мкг/мл,  $P \geq 0,001$ ).

Найбільш суттєве зниження висоти стебла жита при стабільному виявленні ознаки в поколінні  $T_2$  виявила е-ДНК(т) кукурудзи, 400 мкг/мл (Табл.), тому надалі ми проаналізували успадковування цієї ознаки в сім'ях із цього варіанту досліду до  $T_5$ . У поколінні  $T_2$  короткостебловість зберігалася в сім'ї від 1 рослини із 11 досліджених, тобто з частотою 9,09%. У 16 рослин із 180 досліджених (8,8%) висота була значно нижчою контролю (на  $55,0 \pm 3,81$  см). У поколінні  $T_3$  для 4 сімей із 16 досліджених виявлено 100% успадковування ознаки короткостебловості; із 800 досліджених рослин 87, 5% виявилися короткостебловими; при цьому довжина стебла вірогідно зменшувалась на 51,1–68,6 см порівняно з контролем. У поколінні  $T_4$  виявлялося тільки 3% високорослих рослин (із 3000 досліджених рослин). Зменшення довжини стебла відбувалося за рахунок зменшення довжини всіх меживузоль.

Короткостебловість успадковувалася як домінантний фактор згідно Менделю [3]. В поколіннях короткостеблових рослин виявлено також ознаки, пов'язані із продуктивністю жита – в поколінні  $T_2$  рослин із варіантів застосування е-ДНК із тимусу та е-ДНК людини спостерігали галушення стебла (з частотою 1,42 та 2,10%) та колосу (1,70 та 1,80%) відповідно. Е-ДНК із тимусу спричинила в  $T_2$  з частотою 1,40% принципово нову для жита мутацію – розсічену листову пластинку; е-ДНК(т) людини та кукурудзи – в поколіннях  $T_2$ - $T_3$  появу зерен “пшеничного типу”. Домінантна мутація триквітковості жита виявлена в поколіннях  $T_3$ - $T_4$  для більшості варіантів короткостеблових рослин, отриманих при застосуванні алкілованих ДНК, дає збільшення зерна з колосу на 65%. Домінантну мутацію фіолетового забарвлення зерен індукували е-ДНК кукурудзи ( $T_3$ ) та е-ДНК(т) кукурудзи ( $T_4$ ).

Отже, внаслідок дії екзогенними ДНК в жита індуковано комплекс взаємопов'язаних успадковуваних змін. Відомо, що головними факторами, які регулюють довжину стебла та меживузоль у рослин, є рівень біологічно активних гіберелінів у провідних тканинах та чутливості до них, обумовленої компонентами трансдукції сигналу від гіберелінів [15-19]. Підвищений рівень активних гіберелінів обумовлює явища гетерозису в гібридів [20]. Висота рослин та ознаки, від яких залежить врожайність, у зернових детермінуються комплексом гіберелінів, брасіностероїдів та цитокинінів [21]. Рівень фітогормонів у тканинах рослин контролюється сигналами від програми розвитку та від довкілля, підлягає регуляції гомеобоксними генами [22-25]. Розвиток повноцінної третьої квітки в колосках жита, як і в ячменю [14], може обумовлюватись мута-

цією гомеобоксного гена. Ініціювання та розвиток додаткових органів (стебел, пагонів, галуження квітконосного стебла, осі суцвіття, розділення листкової пластинки на сегменти, тощо), поява антоціанових пігментів, що мають адаптивне значення, також регулюється гомеобоксними генами [23-25]. Вага зерен, зокрема в пшениці, контролюється геном-модулятором, який може мати плейотропну дію на довжину стебла [26]. Отримані в даному дослідженні закономірності дії екзогенних ДНК, поряд із наведеними вище літературними даними про молекулярні механізми явищ, однотипових з індукованими за допомогою е-ДНК, можуть слугувати додатковим підкріпленням нашої гіпотези про те, що одним із найважливіших механізмів дії екзогенних ДНК на спадковість рослин може бути їх вплив на гомеобоксні гени, які належать до різних рівнів системи регуляції геному і є ключовими регуляторами сітки сигналів від доквілля та реалізації відповідей на них; така гіпотеза висловлювалась нами раніше [1,23].

#### **Висновки.**

1. Індукована за допомогою препаратів ДНК ознака короткостебловості в диплоїдного озимого жита сорту Житомирське успадковується як домінуючий моногенний фактор. Міра зниження висоти стебла та стабільність успадкування ознаки залежать як від природи ДНК, так і від концентрації їх у розчинах для інфільтрації насіння, а також від алкілювання їх тіофосфамідом.
2. В лінійях короткостеблових рослин спостерігали спадкові зміни ознак, сприятливих для підвищення продуктивності жита – домінуючу мутацію триквітковості, збільшення кількості продуктивних стебел, врожайності зерна з рослини та з основного колосу, галуження стебла та галуження колосу.
3. За допомогою препаратів ДНК кукурудзи одночасно із короткостебловістю в жита індуковано домінуючу мутацію фіолетового забарвлення зерна.

#### **Література**

1. *Потопальський А.І., Юркевич Л.Н., Кацан В.А.* Гомеобоксні гени, як можливі мішені дії екзогенних ДНК при отриманні нових форм жита // Фактори експериментальної еволюції організмів. – 2008. – Т. 4. – С. 302-308.
2. *Потопальський А.І., Юркевич Л.Н., Маиталер С.Г.* Использование препаратов экзогенных ДНК в селекции озимой ржи на короткостебельность // Селекция и семеноводство. – 1992. – № 4-5. – С. 5-8.
3. *Маиталер С.Г., Юркевич Л.Н., Потопальський А.І.* Эффекты действия экзогенных ДНК у ржи // Частная генетика растений. Тезисы Всесоюзной конференции. Киев, май 1989. – С. 154-155.
4. *Кобылянский В.Д.* Генетический анализ как метод отбора константных форм короткостебельной ржи // Селекция и семеноводство. – 1974. - № 6. – С. 12-15.
5. *Кобылянский В.Д.* Рожь. – М.: Колос, 1982, 262 с.
6. *Кобылянский В.Д.* Новый источник короткостебельности для селекции неполегаемой ржи // Вестник сельскохозяйственной науки. – 1971. - № 9. – С. 58-65.
7. *Кондратенко Ф.Т., Гончаренко А.О.* Пути повышения эффективности озимой ржи // Селекция и семеноводство. – 1973. - № 1. – С. 28-33.
8. *Богданова М.А.* Использование химических мутагенов в селекции короткостебельной озимой ржи // Селекция и семеноводство зерновых и бобовых культур. – 1987. – С. 47-50.
9. *Мушиньски С.* Мутанты у озимой ржи (*Secale cereale L.*) под воздействием быстрых нейтронов и N-нитрозо N-этилмочевины // Симпозиум по селекции ржи, 4-9 июля 1988 г. Тезисы докладов. – Ленинград, 1988. – С. 36.
10. *Сквирская Э.Б., Чепинога О.П.* Практикум по нуклеопротеидам и нуклеиновым кислотам. – М.: Высшая школа, 1964. – 214 с.
11. *Пацковский Ю.В., Соловьян В.Т., Потопальський А.І., Ткачук З.Ю.* Степень алкилирования и физико-химические свойства модифицированных тиофосфамидом ДНК // Респуб. межвед. сборник “Молекулярная биология”. – Киев, 1984. – Вып.37. – С. 44-50.
12. *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. выдано 01.04.85.
13. *Кокунин В.А.* Статистическая обработка данных при малом числе опытов // Укр. биохим. журн. – 1975. – т. 47, № 6. – С. 776-790.
14. *Komatsuda T., Pourkheirandish M., He S., et al.* Six-rowed barley originated from a mutation in a homeodomain-leucine zipper 1-class homeobox gene // PNAS. – 2007. – vol. 104, № 4. – P. 1424-1429.
15. *Zhang Y., Zhu Y., Peng Y., et al.* Gibberellin homeostasis and plant height control by EUI and a role for gibberellin in root gravity responses in rice // Cell Res. – 2008. – vol. 18, № 3. – P. 412-421.

16. Iuchi S., Suzuki H., Kim Y.C., et al. Multiple loss-of-function of Arabidopsis gibberellin receptor AtGID1s completely shuts down a gibberellin signal // *Plant J.* – 2007. – vol. 50, № 6. – P.958-966.
17. Komorisono M., Ueuchi-Tanaka M., Aichi T., et al. Analysis of the rice mutant gladius leaf 1. Aberrant katanin-mediated microtubule organization causes up-regulation of gibberellin biosynthetic genes independently of gibberellin signalling // *Plant Physiol.* – 2005 – vol. 138, № 4. – P. 1982-1993.
18. Milczarsky P., Masojć P. The mapping of QTLs for chlorophyll content and responsiveness to gibberellic (GA3) and abscisic (ABA) acids in rye // *Cell. Mol. Biol. Lett.* – 2002. – vol. 7, № 2A. – P. 449-455.
19. Ikeda A., Ueuchi-Tanaka M., Sonoda Y., et al. Slender rice, a constitutive gibberellin response mutant, is caused by a null mutation of the SLT1 gene, an ortholog of the height-regulating gene GAI/RGA/RHT/D8 // *Plant Cell.* – 2001. – vol. 13, № 5. – P. 999-1010.
20. Zhang Y., Ni Z., Yao Y., Nie X., Sun Q. Gibberellins and heterosis of plant height in wheat (*Triticum aestivum* L.) // *BMC Genet.* – 2007. – vol. 29, № 8. P. 40.
21. Sakamoto T. Phytohormones and rice crop yield: strategies and opportunities for genetic improvement // *Transgenic Res.* – 2006. – vol. 15, № 4. – P. 399-404.
22. Stavang J.A., Lindgard B., Erntsen A., et al. Thermoperiodic stem elongation involves transcriptional regulation of gibberellin deactivation in pea // *Plant Physiol.* – 2005. – vol. 138, № 4. – P. 2344-2353.
23. Кацан В.А., Потопальський А.І. Особливості дії екзогенних ДНК при отриманні нових форм тютюну. – Київ: Колоб'іг, 2007. – 176 с.
24. Shimizu R., Ji J., Kelsey E., et al. Tissue specificity and evolution of meristematic WOX3 function // *Plant Physiol.* – 2009 – vol. 149, № 2. – P. 841-850.
25. Rosin F.M., Hart J.K., Horner H.T., et al. Overexpression of a *knotted*-like homeobox gene of potato alters vegetative development by decreasing gibberellin accumulation // *Plant Physiol.* – 2003. – vol. 132, № 1. – P.106-117.
26. Röder M.S., Huang X.Q., Börner A. Fine mapping of the region on wheat chromosome 7D controlling grain weight // *Funct. Integr. Genomic.* – 2008. – vol. 8, №1. – P. 79-86.

#### **Резюме**

При дії препаратів екзогенних ДНК рослинного та тваринного походження на проростаюче насіння озимого диплоїдного жита сорту Житомирське індуковано домінуючу моногенну мутацію короткостебловості. Водночас із короткостебловістю, в отриманих лініях рослин спостерігали комплекс змін, які сприяють підвищенню врожайності жита.

При действии препаратов экзогенных ДНК растительного и животного происхождения на прорастающие семена озимой диплоидной ржи сорта Житомирская индуцирована доминантная моногенная мутация короткостебельности. Одновременно из короткостебельностью, у полученных линиях растений наблюдали комплекс изменений, связанных с повышением урожайности ржи.

While acting of the preparations of the plant's and animal's exogenous DNAs on the germinating seeds of the cultivar of the winter diploide rye Zhytomyrska, the dominant monogenic mutation of decreasing of plant height was induced. Simultaneously with decreasing of plant height, the complex of alterations, underlying the crop yield improvement in the rye, was observed in the lines of plants to be obtained.

#### **ПІДПАЛА О.В., ЯЦИШИНА А.П., ЛУКАШ Л.Л.**

*Інститут молекулярної біології та генетики НАН України,*

*Україна, 03680, Київ, вул.Заболотного, 150, e-mail:specrada@imb.org.ua*

#### **ПОТЕНЦІЙНІ ЦИС-ЕЛЕМЕНТИ *AluSp*-ПОВТОРУ В ПРОМОТОРІ ГЕНА *MGMT***

Мобільні генетичні елементи (МГЕ) становлять значну частину ДНК еукаріотів, зокрема, майже 45 % геному людини [1]. Численні дані свідчать про різноманітну роль цих елементів у геномі – від чинників пластичності до мутабельності чи нестабільності. Обговорюється їхня роль в еволюції геномів [2,3] та еволюції генної регуляції [4-6]. Інтегруючи в екзони, МГЕ можуть спричиняти мутації [7,8], в інтрони – бути джерелом сайтів альтернативного сплайсингу [9], у промоторні ділянки генів – джерелом цис-регуляторних модулів, які є кластерами сайтів зв'язування транскрипційних факторів [10-13]. Наприклад, у консенсусній послідовності *Alu*-повторів виявлено наявність сайтів зв'язування для 20-ти транскрипційних факторів, функціональну активність