

сортов и 29 линий табака двух сортов. Интеграция чужеродных генов подтверждена с помощью ПЦР. Показано, что расщепление по введенным генам в первом поколении трансформантов при самоопылении составляет 3:1. Различия в накоплении растворимых белков листьями исходных растений рапса, трансформантов T₀ и T₁, культивируемых в асептических условиях, не являются статистически достоверными.

В результаті *Agrobacterium tumefaciens*-опосередкованої трансформації листових дисків з використанням генетичних конструкцій, що несуть гени *bar* і *cyp11A1* цитохрома P450_{SCC} з мітохондрій кори надниркових залоз бика, отримано 46 незалежних фосфінотрицистинстійких ліній ріпаку трьох промислових ярих сортів і ліній тютюну двох сортів. Інтеграцію чужорідних генів підтверджено за допомогою ПЛР. Показано, що розщеплення по введеним генам в першому поколінні трансформантів за умов самозапилення становить 3:1. Відмінності в накопиченні розчинних білків листям вихідних рослин ріпаку, трансформантів T₀ і T₁, які культивуються в асептичних умовах, не є статистично достовірними.

Forty six independent PPT-resistant lines of three Ukrainian commercial rapeseed varieties and twenty nine lines of two *Nicotiana tabacum* varieties were obtained as a result of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of leaf disks with gene constructs carrying *bar* gene and *cyp11A1* cytochrome P450_{SCC} gene from bovine adrenal cortex. Integration of the foreign genes was confirmed by PCR analysis. The self-pollinated first transgenic progeny demonstrated segregation of the introduced genes as 3:1. The difference among parent rapeseed plants, T₀ and T₁ transformants cultivated under aseptic conditions concerning total soluble protein in leaves was not statistically significant.

СЕРГЕЕВА Л.Е.,¹ ПОРЕЦКАЯ Е.И.,¹ ГАМАЛЕЙ В.И.²

¹Институт физиологии растений и генетики НАН Украины,
Украина, 03022, Киев, ул. Васильковская 31/17, e-mail: e.poretskaya@gmail.com

²Институт земледелия УААН,
Украина, 08162, Киевская обл., п.г.т. Чабаны, ул. Машиностроительная, 2Б

ОСМОРЕГУЛЯЦИЯ У СОЛЕУСТОЙЧИВЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ ТАБАКА, ОТОБРАННЫХ НА СЕЛЕКТИВНЫХ СРЕДАХ, СОДЕРЖАЩИХ ИОНЫ БАРИЯ

Растущее с годами число публикаций, посвященных различным аспектам солевого стресса и солеустойчивости, подтверждает постулат о фундаментальности и сложности поставленной проблемы. Выявление физиологических корреляционных взаимосвязей, расшифровка генетических механизмов устойчивости, однако, не увеличили количества полученных растительных форм, которые бы демонстрировали выдающиеся показатели солеустойчивости. Не упростились и сами методы их получения. Очевидна потребность поиска новых гипотез, подходов, методов.

Явление солеустойчивости достоверно связывают с поддержанием баланса катионов калия и натрия. Также было установлено, что ионы тяжелых металлов, воздействуя на мембранные системы переноса ионов калия, препятствуют его выведению из клетки [10,18]. В связи с вышеизложенным была высказана идея и разработан способ получения солеустойчивых клеточных линий растений с использованием селективных сред, содержащих ионы тяжелого металла бария [5]. Отобранные таким образом клеточные клоны табака оказались устойчивыми не только к селектирующему стрессору, но и к 20 г/л солей морской воды либо сульфата натрия.

В основе такого феномена комплексной устойчивости логично было ожидать установление стабильного уровня ионов K^+ .

Основной причиной, вызывающей ингибирование роста растений при солевом стрессе (кроме снижения водного потенциала), является избыток ионов Na^+ , которые не требуются гликофитам для нормального роста [9,14]. На клеточном уровне одним из наиболее опасных последствий солевого стресса является поступление Na^+ и снижение уровня K^+ .

Табак является классическим гликофитом. Поэтому проанализировать соотношение ионов K^+/Na^+ в клетках каллусной культуры табака, устойчивой к стрессорам, воздействующим на гомеостаз K^+ , представлялось не только целесообразным, но и необходимым. Рис.1 отображает баланс ионов K^+ и Na^+ в каллусе при его выращивании на селективных средах, содержащих стрессовые агенты, в концентрациях летальных для клеточных культур дикого типа.

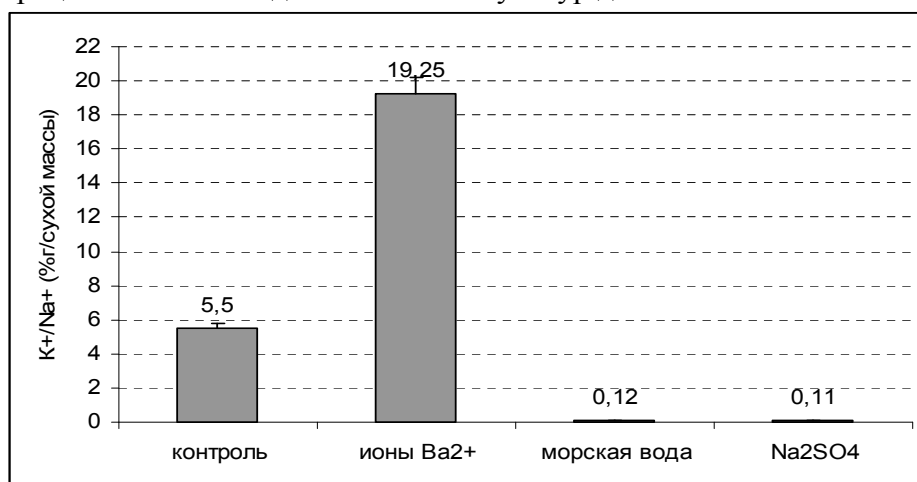


Рис.1. Соотношение K^+/Na^+ у устойчивых клеточных линий табака

Очевидна зависимость содержания ионов от среды культивирования. Соотношение K^+/Na^+ было максимальным в присутствии ионов бария и минимальным при засолении (при этом тип засоления не имел существенного значения).

Транспорт ионов K^+ осуществляется путем активного их переноса по K^+ -каналам. Исследуя работу каналов поступления K^+ протопластов пыльцы *Brassica sinensis* Л.-М. Фан с соав. отмечали, что с увеличением электроотрицательности мембранного потенциала с -58 мВ до величин более отрицательных чем -100 мВ (-180 мВ) поступление K^+ повышалось. Однако добавление 1мМ либо 100мМ Ba^{2+} ингибировало транспорт K^+ даже при максимальной (-180 мВ) электроотрицательности каналов [8]. Этим свойством отличаются и ионы цезия. Ионы Cs^+ ингибировали поглощение ионов калия и их перенос из корней в наземную часть у галофита солончаковой травы [15]. В других публикациях отмечали, что ионы Ba^{2+} ограничивают поступление и других ионов [3,11].

В нашем случае наблюдалось обратное событие. Ионы Ba^{2+} (присутствовавшие в летальных концентрациях) не только не ингибировали процесс поступления ионов K^+ , но даже стимулировали его, поскольку уровень K^+ в каллусе, растущем на данной селективной среде был выше этого показателя в норме.

При культивировании устойчивых клеточных линий табака при засолении было отмечено снижение содержания в клетках ионов K^+ и существенное увеличение Na^+ . На это событие указывали и другие авторы. Так накопление ионов Na^+ во внутриклеточном пространстве у солероса *Atriplex triangularis* при солевом стрессе К. Бу с соав. считали защитной реакцией, способствующей противостоять осмотическому стрессу. Более того, этот процесс, по мнению авторов, играл более существенную роль в солеустойчивости растения чем компартментация соли в солевых полостях [7]. При

сравнении адаптации к NaCl различающихся по солеустойчивости генотипов кукурузы отмечалось, что рост уровня Na^+ и снижение содержания K^+ и Ca^{2+} было более значимым у устойчивого генотипа [12]. Однако, кроме этих и аналогичных публикаций имеются и обратные свидетельства. Они указывают на то, что солеустойчивые растения могут удерживать баланс K^+/Na^+ при засолении [15,1,2].

Ранее при изучении солеустойчивых клеточных линий табака, культивируемых в присутствии солей морской воды или Na_2SO_4 , мы наблюдали увеличение содержания ионов Na^+ , которое, однако, было меньшим чем у клеточной культуры дикого типа [4]. Одновременно с накоплением этих катионов в каллусе существенно возрастал уровень свободного пролина. В результате реализации обоих событий происходило выравнивание осмотического давления вне и внутри клетки, за счет чего и обеспечивалась жизнеспособность солеустойчивых линий табака. Прямую корреляцию между содержанием ионов Na^+ и пролина выявили и другие авторы [15,19]. У отобранных линий табака также измеряли содержание свободного пролина при культивировании в различных стрессовых условиях (Рис.2). Видно, что уровень аминокислоты в каллусах, культивируемых на селективных средах с ионами Ba^{2+} и Na_2SO_4 , сходны и существенно не отличаются от ее содержания в клетках, которые росли в нормальных условиях. Тогда как при переносе культуры на среду с солями морской воды содержание пролина возрастало (более чем в 10 раз относительно этого параметра, измеренного в отсутствие действия стрессового фактора).

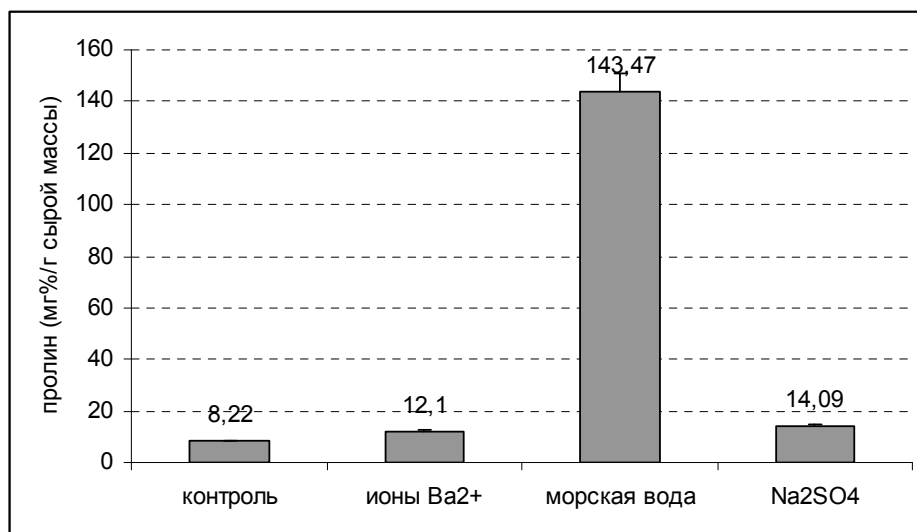


Рис.2. Содержание свободного пролина у устойчивых клеточных линий табака. Среднее значение трех биологических повторностей, измеренное в конце отдельного пассажа (28 день)

Очевидно, что на определенном этапе у Ba -устойчивых клеточных линий при выращивании на солевом фоне реализуются различные анион-зависимые механизмы их детоксикации. Поскольку, как указывалось выше, ионы Ba^{2+} являются блокаторами K^+ каналов, логично предположить, что в результате клеточной селекции отбираются клоны с повышенной энергией транспорта ионов. В пользу этого феномена свидетельствует увеличение содержания K^+ в клетках, растущих в присутствии Ba^{2+} . С другой стороны рост клеток при значительных экзогенных концентрациях ионов Na^+ указывает на их быстрое удаление из цитозоля с помощью транспортеров плазматической и вакуолярной мембран. Далее для выравнивания осмотического баланса накопление ионов должно обязательно компенсироваться увеличением

содержания осмолитов цитоплазмы. При выращивании на среде с солями морской воды таким соединением является пролин. В случае альтернативного сульфатного засоления, когда уровень пролина невысок, накапливаются, скорее всего, другие осмолиты. Ими могут быть глицинбетаин, свободные сахара, глицерин. О том, что их сверхсинтез может компенсировать осмотический разбаланс неоднократно отмечалось ранее. Не исключена также реализация других механизмов устойчивости. По нашему мнению осморегуляция у устойчивых клеточных линий, культивированных на солевом фоне, осуществляется следующим образом. Засоление любого типа является источником избытка гидратированных ионов Na^+ . Вследствие подобия между радиусами гидратированных ионов Na^+ (1,65-2,05 Å) и K^+ (2,35-2,66 Å) между катионами создается конкуренция [6]. Далее ионы Na^+ начинают поступать внутрь клетки. Механизмы этого процесса еще не ясны, однако есть основания считать, что низкая аффинность и проницаемость для Na^+ и K^+ -транспортных систем (например LCT1 и НКТ1) могут способствовать переносу Na^+ [17]. В нашем случае (как указывалось выше) транспорт K^+ усилен, поэтому не исключена вероятность активации поступления и ионов Na^+ . Поступив в клетку, Na^+ индуцирует экспрессию гена мембранной АТФ-азы [13]. За этим следует активное удаление Na^+ из цитозоля. Осмотическое давление в клетке изменяется. Восстановление баланса происходит за счет увеличения уровня осмолитов.

Интегральным показателем устойчивости растительного организма всегда выступает его рост и развитие (увеличение биомассы, других биометрических показателей) в условиях стрессового давления. Если рост биологической системы при действии различных стрессовых факторов обеспечивается за счет «включения» различных механизмов устойчивости, это может свидетельствовать в пользу активности ее генома и может быть основой для установления новых детерминант устойчивости.

Литература

1. *Ершов П.В., Решетова О.С., Трофимова М.С., и др.* Активность ионных транспортеров и солеустойчивость ячменя // Физиология растений. – 2005. – 52, №6. – С.867-875
2. *Леонова Т.Г., Гончарова Э.А., Ходоренко А.В., и др.* Солеустойчивые и солечувствительные сорта ячменя и их характеристика // Физиология растений. – 2005. – 52, №6. – С.876-881
3. *Николаев Б.А., Алексеева В.Я., Гордон Л.Х.* Влияние ионов лития на рост корней пшеницы и роль фосфоинозитидного цикла в регуляции ростовых процессов // Цитология. – 2001. – 43, №10. – С.969-974
4. *Сергеева Л.Е., Мартыненко А.И.* Осморегулирование у клеточных линий табака, устойчивых к солевому стрессу // Физиология и биохимия культ. растений. – 1993. – 25, №6. – С.587-591
5. *Сергеева Л.Е.* Новая селективная среда с ионами бария – альтернативная система для отбора солеустойчивых клеточных линий // Биотехнология. – 2002, №2. – С.47-51
6. *Biggin P.C., Smith G.R., Shrivastava et al.* Potassium and sodium ions in a potassium channel studied by molecular dynamics simulations // Biochim. et Bioph. Acta. – 2001. – 1510. – P.1-9
7. *Bu Q., Bai X., Zhu J., et al.* Накопление и распределение соли в листьях *Atriplex triangularis* при солевом стрессе // Jingyong ju huanjing shengum xuebao = Chin.J. Appl. And Environ. Biol. – 2007. – 13, №2. – С.192-195
8. *Fan L.M., Wu W.H., Yang H.-Y.* Identification and characterization of the inward K^+ channel in the plasma membrane of Brassica pollen protoplasts // Plant and Cell Physiology. – 1999. – 40, №8. – P.859-865
9. *Greenway H., Munns R.* Mechanisms of salt tolerance in non-halophytes // Annual Review of Plant Physiol. – 1980. – 31. – P.149-190

10. *Lefebvre D.D.* Increased potassium absorption confers resistance to group 1A cations in rubidium-selected suspension cells of *Brassica napus*// *Plant Physiol.* – 1989. – 91, №4. – P. 1460-1466
11. *Li L.G., Jin K.D., Yan J.Q., et al.* Salt-adaptive mechanisms of K⁺-channel in plasma membrane of tobacco callus // *Chinese Science Bulletin.* – 1996. – 4. – P.1707-1711
12. *Mansour M. M. F., Salama K.H.A., Ali F.Z.M., et al.* Cell and plant responses to NaCl in *Zea mays* L. cultivars differing in salt tolerance // *Gen and Appl. Plant Physiol.* – 2005. – 31, №1-2. – P.29-41
13. *Niu X., Zhu J.K., Narasimhan M.L. et al.* NaCl regulation of plasma membrane H⁺-ATPase gene expression in a glycophyte and a halophyte // *Plant Physiol.*–1993.– 103.–P.713-718
14. *Niu X., Bressan R.A., Hasegawa P.M., et al.* Ion homeostasis in NaCl stress environments // *Plant Physiology.* – 1995. – 109.– P.735-742
15. *Peng Y.H., Zhu Y.-E., Mao Y.-Q., et al.* Alkali grass resists salt stress through high [K⁺] and endodermis barrier to Na⁺//*Journ. of Exper. Bot.*–2006.–55, №398.–P.939-949
16. *Qiu L.-Z., Huang Y.-J., Huang J.-Q., et al.* Сравнительное изучение вегетационных и физиологических характеристик различных солетолерантных растений при солевом стрессе // *Zhejiang daxue xuebao. Nongye yushengming kexue ban = J. Zhejiang Univ. Agr. And Life Sci.* – 2006. – 32, №4. – C.420-427
17. *Rus A., Yokoi S., Sharkhuu A. et al.* AtHKT1 is a salt tolerance determinant that controls Na⁺ entry into plant roots // *Proc. Nat. Acad. Sciences USA.* – 2001. – 98. – P.14150-14155
18. *Strang J., Macnair M.R.* Evidence for a role for the cell membrane in copper tolerance of *Mimulus guttatus* Fischer ex DC // *New Phytol.* – 1999. – P.383-388
19. *Tani C., Sasakawa H.* Proline accumulates in *Casuarina equisetifolia* seedlings under salt stress // *Soil Sci. and Plant Nutr.* – 2006. – 52, №1. – P.21-25

Резюме

Методом клеточной селекции получены клеточные линии табака, устойчивые к ионам бария. Эти линии росли на средах, содержавших 20 г/л солей морской воды либо Na₂SO₄. При культивировании каллуса на среде с ионами Ba²⁺ устойчивые линии накапливали ионы K⁺. При культивировании на любом солевом фоне у этих линий отмечали снижение содержания ионов K⁺ и накопление ионов Na⁺. В клетках, растущих в присутствии солей морской воды, возрастал уровень свободного пролина, тогда как при выращивании каллуса на средах с ионами Ba²⁺, Na₂SO₄ либо в нормальных условиях этот параметр существенно не различался.

Методом клітинної селекції отримані клітинні лінії тютюну, стійкі до іонів барію. Ці лінії росли на середовищах, що містили 20 г/л солей морської води або Na₂SO₄. При культивуванні калусу на середовищі з іонами Ba²⁺ стійкі лінії нагромаджували іони K⁺. При культивуванні за умов будь-якого типу засолення у цих ліній відмічали зниження вмісту іонів K⁺ та збільшення іонів Na⁺. В клітинах, які росли в присутності солей морської води, зростав рівень вільного проліну; в той же час при вирощуванні калусу на середовищах з іонами Ba²⁺, Na₂SO₄ або за нормальних умов цей параметр істотно не відрізнявся.

Tobacco cell lines, resistant to barium ions, were obtained via cell selection. These lines grew on media with the addition of 20 g/l of sea water salts or Na₂SO₄. During cultivation on the Ba-selective medium the resistant cell lines accumulated K⁺ ions. The decrease of K⁺ and increase of Na⁺ ions in calli there were observed during cultivation under any type of salinity. The free proline level rose during cell growing on the medium with the

addition of sea water salts, whereas there were no considerable differences among these parameters during cell cultivation on Ba^{2+} ; Na_2SO_4 or control media.

СУПРУН С. М., ДОНЧЕНКО Г. В., ПАРХОМЕНКО Ю.Ф., *КУРЧЕНКО И. Н., *ХАРКЕВИЧ Е.С., КУЧМЕРОВСКАЯ Т.М.

Институт биохимии им. А. В. Палладина НАН Украины, Украина, 01601, Киев, ул. Леонтовича, 9, e-mail: kich@biochem.kiev.ua

**Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины, Украина, 03143 ул. Заболотного, 154, e-mail: irinakurchenko@ukr.net*

БИОТЕХНОЛОГИИ НА ОСНОВЕ МИКРОМИЦЕТОВ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ВИТАМИНОВ, ПИЩЕВОЙ И КОРМОВОЙ ДОБАВКИ

Грибы - ценный источник природных форм биологически активных веществ, а именно: незаменимых аминокислот, ненасыщенных жирных кислот, витаминов, витаминоподобных веществ, таких как убихинон Q_{10} и других, обладающих свойствами антиоксидантов и антимутогенов. Тот факт, что грибной белок по своему аминокислотному составу не уступает животному, а также то, что другие важные биологически активные вещества, содержащиеся в грибах является основанием для использования грибов для получения пищевых и кормовых добавок. Биологическая ценность биомассы грибов зависит от состава клеточной стенки, остов которой составляют гликозаминогликаны, а также хитин обладающий свойством природного сорбента. Использование микромицетов позволило разработать новые биотехнологии получения липидов, витаминов, β -каротина из *Blakeslea trispora*, пищевых волокон на основе хитин-глюканового комплекса. Микромицеты являются перспективными для использования в различных отраслях народного хозяйства: сельском хозяйстве, медицине, а также в защите окружающей среды. Более того, использование микромицетов для получения витаминов представляет реальную альтернативу химическому синтезу [1-4].

Цель работы - селекция штаммов микромицетов-продуцентов витаминов, коферментов и разработка биотехнологии получения на их основе витаминно-коферментного препарата.

Материалы и методы

Нами был использован метод поэтапной селекции для отбора штаммов-продуцентов витаминов, коферментов среди различных таксономических групп микромицетов музейных культур коллекции Украины. Для получения витаминно-коферментного препарата путем совместного культивирования подобраны следующие штаммы грибов: *Fusarium sambucinum* F-10011 - продуцент витамина PP (никотиновой кислоты) и его производных, а также штамм *Penicillium sclerotiorum* 10015-продуцент β -каротина, белка. Штаммы депонированы и хранятся в коллекции культур Института микробиологии и вирусологии НАН Украины. Микромицеты выращивали на синтетической питательной среде Чапека с мелассой (1% по р.в.) в качестве источника углерода. Посевной материал выращивали в колбах Эрленмейера на качалках при 240 об/мин в течение 24 часов. Ферментацию проводили при глубинном культивировании в колбах или в производственных условиях на лабораторной стендовой установке Научно-технического центра производственной биотехнологии ОАО "Стиролбиотех". Среду для ферментации стерилизовали в автоклаве при 1–1,5 атм. в течение 30 мин и засеивали 5%-ным инокулятом. Продолжительность культивирования в лабораторных условиях составляла в зависимости от поставленных целей до 62-72 часов, а в производственных для получения препарата, с отработанной технологией процесс культивирования составлял - 42–48 часов. Получено две формы препарата - порошкообразную и жидкую (гранулированную при внесении наполнителя.). Жидкую