

10. Levites E.V., Denisova F.Sh., Kirikovich S.S., Judanova S.S. (Maletskaya S.S.) Ratios of phenotypes at the *Adh1* locus in the apozygotic offspring in sugarbeet ( $C_1$  generation) // Sugar Tech. - 2000. - vol. 2, № 4. - P. 26-30.
11. Cionini P.G., Cavallini A., Corsi R., Fogli M. Comparison of homologous polytene chromosome in *Phaseolus cocineus* embryo suspensor cells: morphological, autoradiographic and -cytophotometric analyses // Chromosoma. - 1982. - vol. 86. - P. 383–396.
12. Levites E.V., Kirikovich S.S. Natural genetic sampling: a new approach to the study of agamospermy in pollen-sterile sugar beet (*Beta vulgaris* L.) plants // Sugar Tech. - 2005. - vol. 7, № 4. - P.145–149.
13. Levites E.V., Kirikovich S.S., Denisova F.Sh. Expression of enzyme genes in agamospermous progenies of reciprocal hybrids of sugar beet // Sugar Tech. - 2001. - vol. 3, № 4. - P. 160–165.
14. Богданова Е.Д. Эпигенетическая изменчивость, индуцированная никотиновой кислотой у *Triticum aestivum* L. // Генетика. - 2003. - т. 39, № 9. - С. 1221–1227.
15. Barow M. Endopolyploidy in seed plants // BioEssays. - 2006. - vol. 28, № 3. - P. 271–281.

### Резюме

На основании собственных и имеющихся в литературе данных обсуждаются соотношения фенотипических классов маркерных ферментов в агамоспермных потомствах сахарной свеклы и гипотеза о многомерности кодирования наследственной информации у растений.

On the base of previously published and literature data it has been discussed marker enzyme phenotype ratios in agamospermous sugar beet progenies and a concept of multidimensional encoding of inherited information in plants.

**ЛУЦИК А.П., КОЖУХОВА Н.Е., СИВОЛАП Ю.М.**

*Південний біотехнологічний центр в рослинництві УААН*

*Україна, 65036, Одеса, Овідіопольська дорога, 3, e-mail: lytsukandrey@ua.fm*

### **ГЕНИ, ЩО КОДУЮТЬ БІЛКИ ТЕПЛООВОГО ШОКУ КУКУРУДЗИ: СТРУКТУРА ТА ПОЛІМОРФІЗМ**

Одна із загальних властивостей клітин всіх типів живих організмів полягає в тому, що у відповідь на збільшення температури вони включають синтез специфічного набору білків, званих білками теплового шоку (БТШ, heat shock protein, hsp), які допомагають клітині вижити в умовах температурного стресу і повернутися після його припинення до нормального життя. Схожість амінокислотної послідовності (гомологія) деяких з них у різних організмів (від бактерій до людини) свідчить про їх високу консервативність в еволюції, яка характерна для життєво важливих білків. Все це зробило вивчення БТШ та генів, що їх кодують, однією з центральних біологічних проблем, відкрило перспективи до з'ясування молекулярних основ стійкості (резистентності) організмів до високотемпературного стресу [1].

БТШ у всіх організмів представлені великим набором поліпептидів, і їх прийнято іменувати відповідно до молекулярної маси, вираженої в кілодальтонах (кД). У рослин БТШ вперше виявлені в 1980 році. Як і у інших організмів, БТШ рослин множини та представлені групою високомолекулярних (110-60 кД) і низькомолекулярних (35-15 кД) білків [2].

Кукурудза (*Zea mays* L.) є економічно важливою сільськогосподарською культурою південного регіону України, для якого в літній період характерна висока температура (+30...+35 °С). Негативний вплив високої температури на кукурудзу максимальний в період цвітіння і є одним з головних факторів, що лімітує врожайність і продуктивність насіння кукурудзи. Тому створення жаростійких генотипів є актуальною задачею селекції кукурудзи. Добір за допомогою маркерів (Marker Assisted Selection, MAS) дозволяє на якісно новому рівні здійснювати селекційний процес та вирішувати конкретні генетико-селекційні проблеми.

Мета даної роботи складалась з дослідження молекулярно-генетичного поліморфізму генів, що кодують БТШ, для розробки системи молекулярних маркерів стійкості кукурудзи до високотемпературного стресу.

#### **Матеріали та методи**

Матеріалом слугували 35 інбредних ліній кукурудзи, що різняться стійкістю до високотемпературного стресу (табл. 1). Насіння люб'язно надано к.б.н. Вареником Б.Ф. (Селекційно-генетичний інститут – Національний центр насіннєзнавства та сортовивчення УААН, Одеса).

ДНК виділяли із 7-денних етильованих паростків за допомогою СТАВ-методики [3]. Полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) та електрофоретичний розподіл продуктів ампліфікації здійснювали згідно умов, оптимізованих у попередніх дослідженнях [4]. Послідовності праймерів добрано з електронної бази даних по геноміці і генетиці кукурудзи «MaizeGDB» [5].

Відеозображення електрофоретичних профілів ампліфікованої ДНК та розрахунок розмірів ампліфікованих фрагментів одержували за допомогою системи документації і аналізу електрофорезних гелів „Image Master VDS” („Amersham Pharmacia Biotech”, ОКВ).

Таблиця 1

Перелік інбредних ліній кукурудзи

№	Жаростійкі лінії	№	Нежаростійкі лінії
1	Т 135	19	Гк 26
2	Т 22	20	Одеська 140
3	Дк 322	21	Р 343
4	Одеська 221	22	ОК 115
5	Одеська 329	23	Дк 437
6	Одеська 17	24	ОК 117
7	Дк 277-10	25	Одеська 430
8	СА 33	26	Дк 421
9	Одеська 384	27	Дк 429
10	F 564	28	ЛБ 106
11	W 401	29	Дк 411-12
12	ДС 103	30	Ма 43
13	ОК 44	31	Рv 250
14	ОК 119	32	Р 37/47
15	ОК 5/28	33	Е 35
16	Р 502	34	ОК 124
17	НМv 404 С	35	ОК 265-1
18	Дк 517		

### Результати та їх обговорення

Обов'язковим попереднім етапом будь-якого молекулярно-генетичного дослідження є перевірка однорідності матеріалу, що досліджується. За ПЛР-аналізом трьох мікросателітних локусів (*phi065*, *umc1172*, *phi022*) оцінили генетичну чистоту 35 ліній. Для всіх ліній відмічено гомозиготний стан досліджуваних локусів та ідентичність усіх спектрів ампліфікації, що дозволило перейти до подальших досліджень.

За даними MaizeGDB в геномі кукурудзи прокартовано 13 генів, що кодують БТШ (*hsp*-гени), в т.ч. шаперони (*cpn*-гени). Ці гени локалізовано на дев'яти з 10 хромосом (крім хромосоми 2) (табл. 2).

Таблиця 2

Характеристика локусів, що кодують БТШ кукурудзи

Ген (локус)	Інша назва	Хромосомна локалізація	Продукт
<i>hsp26</i>	<i>umc195</i>	1.03	БТШ 70 кД
<i>cpn2</i>	<i>hsp60</i>	1.08	шаперон 60-2 мітохондриальний
<i>hsp18f</i>	<i>uaz210</i>	3.02	БТШ 18 кД цитоплазматичний
<i>hsp17.2</i>	<i>hsp18</i>	3.04	БТШ 18 кД
<i>uaz171</i>	-	4.07	БТШ 18 кД пластидний
<i>cpn10</i>	<i>umc1610</i>	4.11	шаперон 10
<i>cpn1</i>	<i>hsp60</i>	5.03	шаперон 60-1 мітохондриальний
<i>hsp101</i>	-	6.06	БТШ 101 кД
<i>hsp3</i>	<i>umc1545</i> , <i>umc1546</i>	7.00	БТШ 70 кД мітохондриальний
<i>hsp1</i>	<i>hsp70</i>	8.01	БТШ 70 кД
<i>hsp18c</i>	-	8.02	БТШ 18 кД цитоплазматичний
<i>hsp18a</i>	-	9.04	БТШ 18 кД цитоплазматичний
<i>hsp90</i>	<i>phi071</i> , <i>hsp82</i>	10.04	БТШ 90 кД

В складі декількох генів встановлено наявність мікросателітних повторів. Так, ген *hsp3* (хромосомна локалізація 7.00) містить два мікросателітних регіони *umc1545* та *umc1546*, локус *hsp90* (хромосомна локалізація 10.04) включає мікросателітний регіон *phi071*, у складі ген *cpn10* (хромосомна локалізація 4.11) є мікросателітна ділянка *umc1610*.

В нашій роботі за допомогою ПЛР-аналізу досліджували молекулярно-генетичний поліморфізм локусів *umc1545*, *umc1546*, *phi071*, *uaz171*. На рис. 1 наведено електрофореграму продуктів ампліфікації локусу *umc1545*.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 М 35

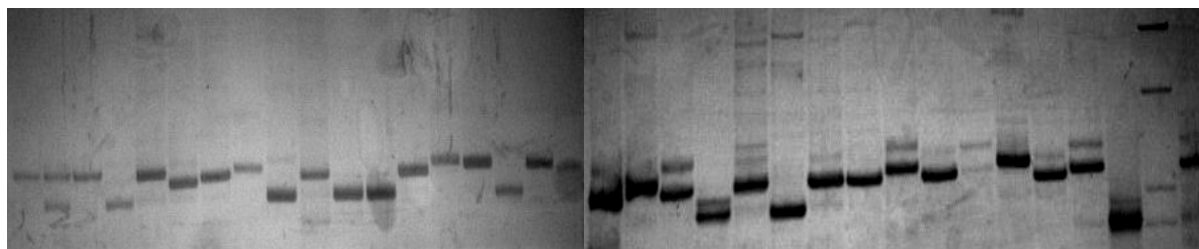


Рис. 1. Електрофореетичне розподілення продуктів ампліфікації локусу *umc1545*. Лінії кукурудзи: 1-18 – жаростійкі, 19-35 - нежаростійкі (нумерація ліній згідно табл. 1). М — маркер молекулярної ваги pGEM (“Promega”, США).

Здійснили розрахунок частот зустрічальності алелів досліджених локусів та провели порівняльний аналіз розподілу алелів між вибірками ліній, що різняться за жаростійкістю (табл. 3).

## Алельний склад локусів, що кодують БТШ

Локус	Довжина алелів, п.н.	Частота зустрічальності алелів в вибірці ліній	
		жаростійких	нежаростійких
umc1545	68	0,28	0,07
	72	0,06	0,13
	76	0,21	<b>0,47</b>
	80	<b>0,39</b>	0,26
	84	0,06	0,07
uaz171	84	<b>0,83</b>	0,36
	98	0,17	<b>0,64</b>
phi071	179	0,11	0,13
	194	<b>0,50</b>	<b>0,33</b>
	108	0,28	0,27
	222	0,11	0,27
umc1546	76	0,41	0,19
	124	0,06	0,06
	129	<b>0,53</b>	<b>0,75</b>

Для локуса umc1545 характерно п'ять алелів розмірами 68, 72, 76, 80 і 84 п.н. Для вибірки нежаростійких генотипів найбільш часто зустрічався алель довжиною 76 п.н. (0,47), а жаростійких - 80 п.н. (0,39).

Локус umc1546 містив три алелі розмірами 76, 124, 129 п.н. У жаростійких та нежаростійких генотипів найчастіше зустрічався алель довжиною 129 п.н. (0,53 і 0,75, відповідно).

За локусом phi071 отримано чотири алелі розмірами 179, 194, 208, 222 п.н. У жаростійких і нежаростійких генотипів частіше зустрічався 194 п.н.-алель (0,50 і 0,33, відповідно).

Локус uaz171 містив два алеля розмірами 84 і 98 п.н. У жаростійких генотипів частіше зустрічався 84 п.н.-алель (0,83), у нежаростійких – 98 п.н.-алель (0,64).

Таким чином, за допомогою ПЛР-аналізу досліджено поліморфізм локусів, що кодують БТШ, та встановлені набори алелів, найбільш характерні для вибірки жаростійких і нежаростійких генотипів кукурудзи.

### Література

1. Кулаева О.Н. Белки теплового шока и устойчивость растений к стрессу // Соросовский Образовательный журнал. Серия «Биология». – 1997. - № 7. – С. 1-10.
2. Войников В.К., Иванова Г.Г., Рудиковский А.В. Белки теплового шока растений // Физиология растений. 1984. Т. 31. С. 970-979.
3. Сиволап Ю.М. и др. Использование ПЦР-анализа в генетико-селекционных исследованиях. – Киев: Аграрна наука. – 1998. – С. 34-37.
4. Сиволап Ю.М., Кожухова Н.Е. Оцінка генотипів кукурудзи (*Zea mays L.*) на стійкість до коренево-стеблевої гнилі (збудник *Fusarium moniliforme Sheldon*). – Одеса. – 2007. – С. 3-6.
5. [www.maizeGDB.org](http://www.maizeGDB.org)

### Резюме

Проанализированы данные о структуре генов кукурузы, кодирующих белки теплового шока. Исследован молекулярно-генетический полиморфизм генов uaz171, hsp3 и hsp90, в состав которых входят микросателлитные повторы. Установлены

наборы аллелей, характерные для выборок жаростойких и нежаростойких инбредных линий кукурузы.

Проанализовані дані про структуру генів кукурудзи, що кодують білки теплового шоку. Досліджений молекулярно-генетичний поліморфізм генів *uaz171*, *hsp3* і *hsp90*, до складу яких входять мікросателітні повтори. Встановлені набори алелів, характерні для вибірок жаростійких і нежаростійких інбредних ліній кукурудза.

Information about the structure of maize genes encoding the heat shock proteins is analysed. Molecular-genetic polymorphism of genes *uaz171*, *hsp3* and *hsp90* containing microsatellite repeats is investigated. The alleles sets characteristic for samplings of the heat-resistant and unheat-resistant inbred lines are defined.

**МЕЛЬНИКОВА М.Н., ПАВЛОВ С.Д., АНТИПОВА Н.В.**

*Московский Государственный Университет, биологический факультет, кафедра ихтиологии,*

*119899 Россия, Москва, Ленинские Горы 1, стр.12. e-mail: melnik-06@mail.ru*

### **ПОЛИМОРФНЫЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ В ПОПУЛЯЦИЯХ КАМЧАТСКОЙ МИКИЖИ (*PARASALMO (O.) MYKISS*)**

Камчатская микижа (*Parasalmo (O.) mykiss*) является объектом красной книги, а ее жилая форма (микижа, радужная форель (rainbow trout)) один из наиболее ценных объектов мирового рыбоводства. В то же время, статус этого вида дискусионен, единого мнения о его родовой принадлежности не существует; разные авторы относят микижу к родам *Salmo*, *Parasalmo* или *Oncorhynchus*. Некоторые ученые по-прежнему полагают, что камчатская семга и жилая микижа не две формы одного и того же вида, а разные виды. Продолжению этой дискуссии способствует чрезвычайная высокая экологическая пластичность микижи. На камчатском полуострове этот вид образует не только проходную и жилую формы но целый ряд промежуточных между ними форм.

Все это, а также то, что только в Азии тихоокеанские лососи представлены единственными сохранившимися в мире дикими популяциями, места обитания которых находятся в труднодоступных районах, делает их уникальным объектом для проблем происхождения группы, микроэволюции, структуры вида и видообразования.

Данное исследование является продолжением работ по оценке внутривидовой изменчивости на уровне генома ДНК у камчатской географической группы *Parasalmo (O.) mykiss*, первые результаты которого описаны в предыдущих работах авторов [1].

Рестриктный анализ и секвенирование фрагментов мт-ДНК (гены *cytb*, ND/3, ND/4, ATF 6, ATF 8, части D-loop) обнаружили низкий уровень изменчивости митохондриальной ДНК камчатских популяций микижи по сравнению с американскими популяциями и оказались неперспективными для дальнейших исследований популяционного уровня. Анализ генетической изменчивости ядерной ДНК, включающий в себя секвенирование спейсеров рибосомальной ДНК и рестриктный анализ мелкощепящими эндонуклеазами гормонов роста I и II обнаружил единичные мутации. Стало очевидно, что представленные в литературе данные по варибельным участкам генома у американских форелей и дающие генетическую детерминацию популяций у других организмов не дают результатов в применении к монофилитичной камчатской группе *Parasalmo (O.) mykiss*.

Более перспективным показалось использование в качестве маркерных систем полиморфных последовательностей ДНК, которые могут находиться как в кодирующей части генома, так и в некодирующей.