

4. Lundén A., Lindersson M. α -Lactalbumin polymorphism in relation to milk lactose // "Proc. Vth World Congr. on Gen. Appl. to Livestock Prod., Armidale, NSW, Australia, 11–16 January".— 1998.— Vol.25.— P. 47–50.

5. Зиновьева Н.А., Гладырь Е.А., Эрнст Л.К., Брем Г. Введение в молекулярную генную диагностику сельскохозяйственных животных.— Дубровицы.— 2002.— 112 с.

6. Kamiński S. Identification of Sdu I polymorphism within 5' flanking region of bovine alpha-lactalbumin gene // Anim. Sci. Pap. Rep.— 1999.— Vol.17.— P. 23–27.

Резюме

Изучен (–1689) полиморфизм гена α -LA, проведен анализ генетической структуры популяция КРС по данному локусу α -LA, определены частоты ценного аллельного варианта А в различных хозяйствах РБ. Показана положительная корреляция А аллеля с общим удоем, а также возможность практического использования метода ПЦР-диагностики КРС по гену α -LA в маркер-зависимой селекции, направленной на увеличение удоа.

Polimorphism (–1689) of α -LA gene was studied, analysis of genetic structure of cattle populations for the given α -LA locus was made and frequencies of the valuable allelic variant A were determined in various farms of the Republic of Belarus. A positive correlation of A allele to the total milk yield as well as the scope for practical application of PCR-diagnostics method in cattle for α -LA gene in marker-dependent breeding, aimed at an increase in milk yield, was shown.

ВОРОНКОВ А.С., АНДРЕЕВ И.М., ТИМОФЕЕВА Г.В., КОВАЛЕВА Л.В.

Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева РАН, Россия, 127276, Москва, Ботаническая ул., 35, e-mail: kovaleva_l@mail.ru

ГОРМОНАЛЬНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ *IN VITRO* ПРОРАСТАЮЩЕГО МУЖСКОГО ГАМЕТОФИТА ПЕТУНИИ: МЕДИАТОРНАЯ РОЛЬ SA^{2+} И АФК В ИУК-ИНДУЦИРОВАННОЙ СТИМУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ H^+ -АТФАЗЫ ПЛАЗМАЛЕММЫ

Прорастание пыльцевых зерен *in vitro* сопровождается заметными изменениями в уровне эндогенных фитогормонов и чувствительно к действию экзогенных фитогормонов [1–2]. В частности, показано, что экзогенные ауксин (ИУК), абсцизовая кислота (АБК) и гиббереллин (ГК₃) способны существенно стимулировать прорастание пыльцы и рост пыльцевых трубок, выявлены существенные различия в гормональном статусе системы пыльца-пестик после самосовместимого и самонесовместимого опылений [3]. Перечисленные факты указывают на активную роль фитогормонов в процессах прорастания мужского гаметофита, однако механизмы их действия остаются неисследованными. Практически ничего не известно, в частности, о возможной роли ион-транспортирующих систем плазмалеммы пыльцевого зерна в гормон-индуцируемой стимуляции прорастания и роста мужского гаметофита.

Результаты, полученные в последние годы, указывают на важную роль транспорта основных физиологически активных ионов, таких как H^+ , Ca^{2+} и K^+ , через плазмалемму пыльцевого зерна в регуляции процесса прорастания мужского гаметофита [4]. Недавно проведенные нами исследования показали, что цитоплазматический рН (pH_c) прорастающих пыльцевых зерен петунии заметно возрастал в течение 5–10 минут после обработки их экзогенными фитогормонами, причем этот эффект полностью блокировался в присутствии ортованадата, известного ингибитора АТФ-зависимого протонного насоса на плазмалемме растительных клеток [5]. Эти наблюдения дали нам основание для предположения о том, что фитогормон-индуцированный сдвиг pH_c обусловлен стимуляцией фитогормоном активности H^+ -АТФазы плазмалеммы мужского гаметофита.

Мы проверили справедливость данного предположения, а именно выяснили, способны ли фитогормоны вызывать гиперполяризацию плазмалеммы мужского гаметофита путем стимуляции ими электрогенной активности H^+ -АТФазы. С этой целью мы исследовали действие экзогенной ИУК на величину мембранного потенциала плазмалеммы, следя за его изменением с помощью катионного потенциал-чувствительного красителя сафранина О, часто применяемого для регистрации изменений соответствующей полярности (“минус” на внутренней поверхности мембраны) как в клеточных оргanelлах и везикулах различной природы, так и в целых клетках.

Материалы и методы

В экспериментах использовали пыльцу, свежесобранную с растений петунии (*Petunia hybrida* L.), выращенных в оранжерее Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН. Жизнеспособность пыльцевых зерен оценивали согласно методике Alexander на световом микроскопе Axio Imedger D1 (Carl Zeiss, Германия), и в проведенных экспериментах она достигала 70–80%. Пыльцевые зерна культивировали при 26 °С в течение 1 часа на среде, содержащей 0,4 М сахарозу и 1,6 мМ H_3BO_3 . Процент прорастания пыльцевых зерен составлял 70–75%, длина пыльцевых трубок достигала 20–25 мкм. Микрофотография прорастающего в течение 1 часа пыльцевого зерна петунии, отражающая его морфологическое состояние, представлена на рис. 1.

Изменения мембранного потенциала пыльцевых зерен регистрировали с помощью катионного потенциал-чувствительного красителя сафранина О, следя за разностью его абсорбционных изменений при 554 и 524 нм ($DA_{554-524} = A_{554} - A_{524}$) на двух-волновом спектрофотометре Hitachi-557 (Япония). Суспензия пыльцевых зерен в среде культивирования, содержащая примерно 0,8 мг пыльцы (или ~40 000 пыльцевых зерен), была добавлена к среде измерения, содержащей 0,3 М сахарозу, 25 мМ MES-Трис (рН 6,9) и 10 мкМ сафранина О, и перед началом измерений была инкубирована в ней в течение примерно 20–30 минут для достижения относительно стационарного уровня абсорбционных изменений сафранина О, связанных с его распределением между средой измерения и пыльцевыми зернами. Все эксперименты были выполнены в трехкратной повторности.

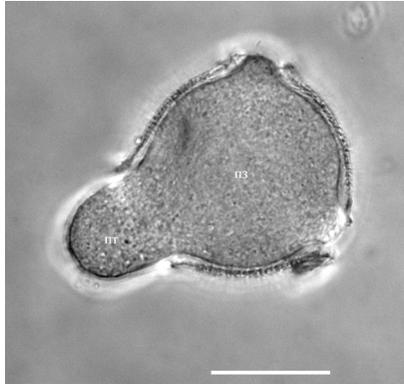


Рис. 1. Мужской гаметофит петунии (культивирование — 1 час):
ПЗ — пыльцевое зерно, ПТ — пыльцевая трубка Бар = 40 мкм

Результаты и обсуждение

Поскольку сафранин О как потенциал-чувствительный индикатор ранее не применялся другими авторами для регистрации поляризации мембран в пыльцевых зернах высших растений, мы предварительно протестировали и убедились в возможности его использования для наблюдений за поляризацией плазмалеммы в прорастающем мужском гаметофите петунии.

ИУК-индуцируемая гиперполяризация мембран в прорастающем мужском гаметофите петунии. Используя липофильный потенциал-чувствительный катионный краситель сафранин О, исследовали действие экзогенного ИУК на величину мембранного потенциала плазмалеммы в клетках прорастающих пыльцевых зерен петунии с целью выяснения вопроса о том, чувствительна ли электрогенная активность H^+ -АТФазы плазмалеммы к действию этого фитогормона. Была прослежена кинетика изменений абсорбционных изменений сафранина О в присутствии экзогенного ауксина, добавленного в концентрации 2,5 мкМ к пыльцевым зернам, предварительно инкубированным в течение 20–30 минут в среде измерения, не содержащей ионов калия, с красителем. Обнаружено, что добавление ИУК к суспензии пыльцевых зерен в среде, не содержащей ионов K^+ , инициировало выраженную гиперполяризацию их плазмалеммы, и этот эффект полностью блокировался ортованадатом, Са-активными соединениями, такими как ЭГТА и верапамил, ДФИ — известным ингибитором НАДФН-оксидазы, функционирующей на плазматической мембране животных и растительных клеток, а также существенно подавлялся сантимоллярными концентрациями ионов K^+ в среде инкубации пыльцевых зерен. Показано, что гиперполяризующее действие ИУК имитировалось перекисью водорода, причем H_2O_2 -индуцированный сдвиг мембранного потенциала подавлялся теми же соединениями, что ингибировали увеличение мембранного потенциала на внешней клеточной мембране пыльцевых зерен, запускаемое ИУК.

Чувствительность ИУК-индуцированной гиперполяризации плазмалеммы к ЭГТА и верапамилу. К настоящему времени установлено, что действие ИУК на растительные клетки может быть опосредовано временным увеличением уровня Ca^{2+} в цитозоле [6]. Поэтому в последующих экспериментах мы решили проверить, зависит ли ИУК-индуцированная гиперполяризация клеточных мембран пыльцевых зерен петунии от поступления ионов Ca^{2+} внутрь клеток из внеклеточной среды. С этой целью было прослежено действие хелатора Ca^{2+} ЭГТА, а также верапамила — известного блокатора Ca^{2+} -каналов клеточных мембран на ИУК-индуцируемый сдвиг мембранного потенциала пыльцевых зерен. В среде измерения, дополненной 0,5 мМ ЭГТА, добавление ИУК к пыльцевым зернам приводило только к очень слабому возрастанию абсорбционного сигнала сафранина О. Полагая, что наблюдаемый эффект ЭГТА связан с сильным снижением уровня Ca^{2+} во внеклеточной среде и тем самым с предотвращением его поступления внутрь клеток через плазмалемму, мы проверили, чувствителен ли эффект ИУК непосредственно к блокаторам трансмембранного транспорта кальция. Было обнаружено, что эффект, подобный ЭГТА, имеет место как в присутствии верапамила, известного блокатора Ca^{2+} -каналов L-типа, так и LaCl_3 , другого известного ингибитора трансмембранного транспорта Ca^{2+} в животных и растительных клетках.

Чувствительность ИУК-индуцированной гиперполяризации мембран к дифенилен иодониуму и имитация действия ИУК перекисью водорода. Принимая во внимание недавно установленные факты, что в трансдукцию гормональных сигналов в растительных клетках способны включаться активные формы кислорода (АФК) [7], мы протестировали возможность участия их в передаче гормонального сигнала, приводящего к гиперполяризации плазмалеммы прорастающего мужского гаметофита петунии. В ходе этих экспериментов было установлено, что, во-первых, гиперполяризующий эффект ИУК чувствителен к дифенилен иодониуму (ДФИ), известному ингибитору НАДФН-оксидазы, функционирующей на плазмалемме растительных клеток и способной к генерации АФК, и полностью подавлялся этим ингибитором. Во-вторых, выяснилось, что наблюдаемый эффект ИУК может быть имитирован просто добавлением к суспензии пыльцевых зерен миллимолярной концентрации перекиси водорода, причем выявленное действие H_2O_2 подавлялось в присутствии ортованадата, а также тех же концентраций ДФИ и Са-активных агентов — ЭГТА и верапамила, что блокировали ИУК-индуцированную гиперполяризацию мембран пыльцевых зерен. Было найдено, кроме того, что подобное ингибирующее действие на запускаемый H_2O_2 сдвиг мембранного потенциала обнаруживал и LaCl_3 .

На основании полученных данных сделано заключение о том, что гиперполяризация плазмалеммы мужского гаметофита петунии под действием ИУК является результатом стимуляции фитогормоном электрогенной активности АТФ-зависимого протонного насоса в этой мембране и что эффект ИУК опосредован транзитным увеличением уровня Ca^{2+} в цитозоле и гене-

рацией в нем АФК. Исследования, проведенные в последние годы, показали, что активность этого фермента вносит существенный вклад в установление внутриклеточного протонного градиента, играющего фундаментальную роль в прорастании и росте мужского гаметофита [8].

Литература

1. Ковалева Л.В., Захарова Е.В., Минкина Ю.В., Тимофеева Г.В., Андреев И.М. Прорастание и рост *in vitro* мужского гаметофита петунии чувствительны к действию экзогенных гормонов и сопровождаются изменением эндогенного уровня фитогормонов // Физиология растений.— 2005.— Т.52.— С. 584–590.
2. Kovaleva L.V., Zakharova E.V., Minkina Y.V., Voronkov A.S. Effects of Flavornols and Phytohormones on Germination and Growth of Petunia Male Gametophyte // Allelopathy Journal.— 2009.— V.23.— P. 51–62.
3. Kovaleva L., Zakharova E. Hormonal Status of the Pollen-Pistil System at the Progamic Phase of Fertilization After Compatible and Incompatible Pollination in *Petunia hybrida* L. // Sex. Plant Reprod.— 2003.— V.16.— P.191–196.
4. Holdaway-Clarke T.L., Hepler P.K. Control of Pollen Tube Growth: Role of Ion Gradients and Fluxes // New Phytol.— 2003.— V.159.— P. 539–563.
5. Андреев И.М., Тимофеева Г.В., Минкина Ю.В., Ковалева Л.В. Изменения внутриклеточного pH пыльцевых зерен *Petunia hybrida* L. под действием экзогенных фитогормонов // Физиология растений.— 2007.— Т.54.— С. 707–714.
6. Mahalakshmi A., Singla B., Khurana J.P., Khurana P. Role of Calcium-Calmodulin in Auxin-Induced Somatic Embryogenesis in Leaf Base Cultures of Wheat (*Triticum aestivum* var. HD 2329) // Plant Cell Organ Cult.— 2007.— V.88.— P. 167–174.
7. Joo J.H., Yoo H.J., Hwang I., Lee J.S., Nam K.H., Bae Y.S. Auxin-Induced Reactive Oxygen Species Production Requires the Activation of Phosphatidylinositol 3-Kinase // FEBS Lett.— 2005.— V.579.— P. 1243–1248.
8. Potocky M., Jones M.A., Bezvoda R., Smirnov N., Zarsky V. Reactive Oxygen Species Produced by NADPH Oxidase are Involved in Pollen Tube Growth // New Phytol.— 2007.— V.174.— P. 742–751.

Резюме

Используя липофильный краситель сафранин О, исследовано действие экзогенной ИУК на мембранный потенциал плазмалеммы *in vitro* прорастающего мужского гаметофита петунии и установлено, что ИУК-индуцированная гиперполяризация плазмалеммы является результатом стимуляции активности АТФ-азы, опосредованной транзиторным увеличением уровня Ca^{2+} в цитозоле и генерацией АФК.

Використовуючи ліпофільний барвник сафранін О, досліджено дію екзогенної ІОК на мембранний потенціал плазмалемми *in vitro*, проростаючого чоловічого гаметофіту петунії й встановлено, що ІОК-індукована гіперполяризація плазмалемми є результатом стимуляції активності АТФ-ази, опосередкованої транзиторним збільшенням рівня Ca^{2+} у цитозолі й генерацією АФК.

Using the dye safranin O, effect of exogenous IAA on membrane potential of plasmic membrane of *in vitro* germinating petunia male gametophyte is investigated and established that the IAA-induced hyperpolarization of plasmic membrane is result of the stimulation of ATPase activity mediated by increase of cytosolic Ca^{2+} and ROS generation.

ДМИТРУК К.В.

*Інститут біології клітини НАН України, 79005, Львів, вул. Драгоманова 14/16,
e-mail: dmytruk@cellbiol.lviv.ua*

МЕТАБОЛІЧНА ІНЖЕНЕРІЯ ДРІЖДЖІВ *HANSENULA POLYMORPHA* ТА *PICHLIA STIPITIS* ДЛЯ КОНСТРУЮВАННЯ ШТАМІВ З ПОКРАЩЕНОЮ АЛКОГОЛЬНОЮ ФЕРМЕНТАЦІЄЮ КСИЛОЗИ

Потреби людства в енергії невпинно зростають і якщо в 20 сторіччі викопні джерела цілком забезпечували енергетичні потреби, то у 21 сторіччі ситуація кардинально змінюється. Стрімке вичерпання викопного палива приводить до нестабільності у цінній політиці на енергоносії, особливо на нафту. Спалювання викопних енергоносіїв призводить до погіршення екологічної ситуації внаслідок вивільнення в атмосферу додаткового вуглекислого газу, посилюючи парниковий ефект. Вирішити посталу проблему можна шляхом обмеження спалювання викопних джерел, застосовуючи енергозощаджуючі технології та/або заміною викопних джерел енергії поновлювальними, наприклад рослинною біомасою (лігноцелюлозою). Одним з найбільш розповсюджених типів біопалива отриманих з рослинної біомаси є етанол. На сьогодні етанол отримують з цукру (Бразилія) або крохмалю (США). Вихідна сировина також використовується в їжу людини і в корм тваринам, що обмежує її широке застосування для отримання біоетанолу. До того ж зменшення кількості парникових газів в результаті використання етанолу з цукру чи крохмалю є недостатнім [1]. Встановлено, що етанол із зернових культур суттєво не знижує викиди парникових газів, тоді як використання біомаси замість традиційної сировини для отримання біопалива має суттєві переваги у зниженні викидів парникових газів, адже потребує менше викопного палива для його отримання [2]. Основною причиною збереження енергії та обмеження посилення парникового ефекту при отриманні біопалива з целюлози є наявність побічного продукту переробки біомаси до етанолу — лігніну, що використовується як джерело енергії замість природного газу, що спалюється на більшості спиртзаводах. Іншою підставою для позитивної оцінки отримання етанолу з лігноцелюлози є той факт, що з біомаси можна отримати більше етанолу з одиниці площі. В середньому з одного гектару зернових культур отримують до 4000 літрів спирту. Для підвищення рентабельності, залишкова солома могла би бути перетворена на додаткові 1400 літрів спирту. Використання зернових, що дають більшу біомасу, наприклад просо, також потребують менші затрати викопного палива, підвищуючи сумарний вихід енергії [3]. Лігноцелюлоза доступна у великих кількостях у складі залишків сільського господарства та деревообробної промисловості (солома, тирса, кукурудзяний качан, стебла кукурудзи, лузга соняшникового насіння, кора дерев тощо). Це комплексна сполука з декількох полімерів, що містить окрім глюкози і інші цукри, серед яких п'ятивуглецевий цукор, ксилоза — другий найбільш поширений цукор.