

Національна академія наук України
Національна академія аграрних наук України
Національна академія медичних наук України
Українське товариство генетиків і селекціонерів
ім. М.І. Вавилова

ФАКТОРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ЕВОЛЮЦІЇ ОРГАНІЗМІВ

ФАКТОРЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ
ЭВОЛЮЦИИ ОРГАНИЗМОВ

TOPICS IN EXPERIMENTAL
EVOLUTION OF ORGANISMS

Збірник наукових праць

ТОМ 11

*Присвячено:
90-річчю від дня народження Р.Г. Бутенко*

Київ
ЛОГОС — 2011

ББК 28.02я43

Ф18

УДК 578.08+631.52

Фактори експериментальної еволюції організмів: зб. наук.
Ф18 пр. / НАН України, НААН України, НАМН України, Укр. т-во генетиків і селекціонерів ім. М.І. Вавилова; редкол.: В.А. Кунах (голов. ред.) [та ін.].— К.: Логос, 2003—2011.

Т. 11: присвяч. 90-річчю від дня народження Р. Г. Бутенко.— 2011.— 584 с.: іл.— укр., рос.— бібліогр. В кінці ст.

ISBN 978-966-171- (Т. 11).

У збірнику представлено наукові праці вітчизняних та зарубіжних спеціалістів, написані спеціально для даного видання, присвяченого 90-річчю від дня народження Р. Г. Бутенко. В оглядових і експериментальних статтях наведено дані з основних напрямів вивчення особливостей еволюції в природі та експерименті, молекулярної структури та організації геномів, генетико-біотехнологічного розширення генетичної мінливості живих організмів, сучасних методів біотехнології і генетичної інженерії при створенні нового покоління сортів і гібридів культурних рослин, ДНК-технологій і молекулярних маркерів у селекції рослин і тварин, генетики людини та медичної генетики.

Для спеціалістів у галузі генетики, селекції, біотехнології, екології, а також викладачів і студентів вищих навчальних закладів III-IV рівнів акредитації.

ББК 28.02я43

РЕДАКЦІЙНА КОЛЕГІЯ

Кунах В.А. – д-р біол. наук, чл.-кор. НАНУ (головний редактор); Дубровна О.В. – д-р біол. наук (заст.головного редактора); Блюм Я.Б. – д-р біол. наук, академік НАНУ; Вагіна І.М. – канд. біол. наук; Сльська Г.В., д-р біол. наук, академік НАНУ; Кучук М.В. – д-р біол. наук, чл.-кор. НАНУ; Лялько І.І. – канд. біол. наук; Лукаш Л.Л. – д-р біол. наук; Малюта С.С. – д-р біол. наук, чл.-кор. НАНУ; Михайлов В.Г. – д-р с.-г. наук, чл.-кор. НААНУ; Моргун В.В. – д-р біол. наук, академік НАНУ; Сиволап Ю.М. – д-р біол. наук, академік НААНУ; Созінов О.О. – д-р біол. наук, академік НАНУ

Затверджено до друку рішенням вченої ради Інституту молекулярної біології і генетики НАН України (протокол №6 від 5 квітня 2011 р.)

ISBN 978-966-171-413-6 (Т.11)

© Українське товариство генетиків і селекціонерів ім. М.І. Вавилова, 2011

В экстремальных биотопах Антарктики проведен скрининг пигментированных микроорганизмов, устойчивых к УФ радиации. Селекционированы продуценты каротинов и меланинов. У дрожжей *Exophiala nigra* оптимизированы условия биосинтеза меланина. Выход меланина составлял от 6 до 10 % сухой биомассы. Меланин *Exophiala nigra* может использоваться для создания лекарственных средств, относящихся к группе стресс-адаптогенов, обладающих цитопротективными свойствами, в т.ч. и по отношению к язвенно-эрозивным поражениям желудка.

Screening of resistant to UV radiation pigmented microorganisms was carried out in extreme biotopes of Antarctic Region. Producers carotins and melanins have been selected and conditions of biosynthesis of melanin for yeast *Exophiala nigra* have been optimised. The melanin yield – from 6 to 10 % of a dry biomass. Melanin of *Exophiala nigra* can be used for creation of stress-adaptogen drugs, possessing cytoprotective properties.

ФОМЕНКО Т.И., МАЛЮШ М.К.

ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси»,

Беларусь, 220012, Минск, ул. Сурганова, 2В, e-mail: fomenko_ti@mail.ru

МОРФОГЕННАЯ АКТИВНОСТЬ И РЕГЕНЕРАЦИЯ РАСТЕНИЙ В КУЛЬТУРЕ ТКАНИ РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ ЛЮПИНА

Бобовые культуры имеют важное хозяйственное и экологическое значение. В мировом земледелии выращиваются несколько видов люпина: *L. albus* L., *L. pilosus* Murr., *L. atlanticus* Gladst., *L. mutabilis* Sweet, *L. luteus* L., *L. angustifolius* L. В Беларуси ведутся работы по селекции этой культуры, направленные на создание сортов с высоким содержанием белка и масла, а также устойчивых к биотическим и абиотическим факторам внешней среды [1]. Наряду с широко применяемыми методами традиционной селекции все шире используются биотехнологии получения трансгенного люпина, позволяющие за счет расширения источника генов за пределы пула, предоставляемого в случае половой гибридизации, получать растения с целенаправленно измененным геномом и новыми хозяйственно-ценными признаками. Достижения в области модификации генома растений стали возможны благодаря исследованиям по культивированию клеток растений *in vitro* для получения целого растения [2]. Наличие видовых и сортовых особенностей морфогенных процессов у бобовых в культуре *in vitro* и необходимость отбора сортов, обладающих высоким морфогенным потенциалом, объясняет актуальность разработки метода регенерации растений применительно к конкретному виду и сорту люпина. Исследования по расширению диапазона генотипов внутри видов, используемых для получения регенерантов *in vitro*, являются актуальными, так как способны внести значительный вклад в улучшение трансформационных систем, что важно для селекционного процесса с использованием современных биотехнологий.

Материалы и методы

Люпин – многолистный (*Lupinus polyphyllus*), многолетний (*L. perennis*), желтый (*L. luteus*), узколистный (*L. angustifolius*) сортов Липень, Прывабны, Верас, Митан, Миртан, Першацвет. Семена сортов люпина узколистного получены из РУП «НПЦ НАНБ по земледелию». Введение люпина в культуру *in vitro* проводили, используя ткань проростков или незрелые зародыши. Для получения проростков семена стерилизовали 70% этанолом, 0,1% диацидом и промывали стерильной водой. Использовали 3-4 дневные проростки люпина. Из проростков стерильно вычленили экспланты гипокотилей и семядольных узлов и помещали на среды культивирования с различным содержанием регуляторов роста. Экспланты незрелых зародышей извлекали из незрелых бобов и стерилизовали 5 мин в 0,1% растворе диацида с последующей промывкой стерильной водой и помещали на питательные среды МС с различным содержанием регуляторов роста. Культивирование эксплантов проводили при температуре 25°C, освещенности 3 тыс. лк и 16-часовом световом периоде.

Результаты и обсуждение

Изучение бобовых *in vitro* направлено на выявление видов с высоким уровнем органогенеза в культуре ткани. Анализ работ по культуре тканей и клеток бобовых показывает видовое и сортовое разнообразие материала, широкую вариабельность состава питательных сред и эксплантов [3]. Однако накопленный не столь обширный фактический материал по культуре видов люпина *in vitro*, и в том числе люпина узколистного, не позволяет дать однозначного ответа об оптимальном составе питательных сред для получения каллусо – и морфогенеза конкретных генотипов.

Нами изучены особенности развития различных тканей люпина в культуре *in vitro* с исследованием возможности регенерации растений методами прямого и непрямого морфогенеза. Каллусогенез и регенерацию растений исследовали у четырех видов люпина: многолистный (*Lupinus polyphyllus*), многолетний (*L. perennis*), узколистный (*L. angustifolius*) и желтый (*L. luteus*). На эксплантах листа, эпикотилия, гипокотилия и семядолей исследовали влияние ИУК, 2,4-Д, БАП, α -НУК и кинетина на инициацию каллуса и скорость его пролиферации в интервале концентраций гормонов 0,5-5 мг/л. По способности к каллусообразованию на эксплантах листа и гипокотилия при использовании среды, содержащей α -НУК, 2,4-Д, БАП (по 1мг/л каждого гормона), виды люпина можно расположить в следующий убывающий ряд: многолистный, узколистный, желтый, многолетний. Инициация каллуса быстрее проявлялась на тканях эпикотилия и гипокотилия по сравнению с тканями листа и семядолей. Побегообразование было получено на каллусной ткани гипокотилия люпина многолистного. Растения люпина многолистного, полученные в культуре *in vitro*, нормально развивались при переносе в почву [4].

Непрямой органогенез, который считается трудно достижимым для большинства видов семейства бобовых, получен нами только для люпина многолистного. Люпин узколистный, как показали наши исследования, характеризуется менее выраженным морфогенным потенциалом, что подтверждает трудность получения для этого вида непрямого органогенеза. Однако люпин узколистный представляет интерес для селекции и возможности применения современных технологий, требующих исследований особенности проявления морфогенного потенциала у сортов этого вида, что явилось целью наших исследований.

Анализ развития эксплантов гипокотилей, семядолей и семядольных узлов люпина узколистного сорта Митан на средах МС показывает тканевую зависимость развития эксплантов. Активный стеблевой морфогенез с частотой 100% наблюдали у семядольных узлов всех исследованных сортов на среде МС в диапазоне концентраций 1-6 мг/л БАП при оптимуме 2-4 мг/л и в пассированной культуре 1-2 мг/л БАП. При культивировании гипокотилей получен прямой органогенез с невысокой частотой от 10 до 20% с усилением морфогенной реакции при увеличении концентрации цитокинина в среде культивирования и небольшим количеством побегов (1-2 побега на эксплант). Отмечена тенденция развития укороченных побегов при увеличении концентрации БАП до 6 мг/л. Ткань семядольного узла проявляет более активный прямой стеблевой органогенез по сравнению с тканью гипокотилей. Оценка морфогенного потенциала более широкого спектра сортов люпина узколистного (Верас, Прывабны, Митан, Липень, Першацвет) с использованием в качестве эксплантов гипокотилей и семядольных узлов 3-4-х дневных проростков на средах культивирования, содержащих БАП от 1 до 6 мг/л, также показала оптимальный уровень развития побегов на средах, содержащих 2 – 4 мг/л БАП. Развитие стеблевого морфогенеза на семядольных узлах сортов Верас, Прывабны, Митан, Липень Першацвет к четвертой неделе культивирования для исследованных сортов составило 100%. Частота стеблевого морфогенеза для гипокотилей исследованных сортов к четвертой неделе культивирования находилась в диапазоне 11-23% (с максимумом у сорта Митан). Результаты исследований показали, что сорта Митан и Першацвет обладают наиболее высоким морфогенным потенциалом [4].

Регенеранты люпина узколистного сортов Верас, Прывабны, Митан, Липень, полученные на средах инициации, содержащих 2 мг/л БАП, 0,2 мг/л α -НУК или 2 мг/л БАП, 0,1 мг/л α -НУК после культивирования в течение двух недель на среде элонгации МС, содержащей 0,1 мг/л БАП, пассировали на среду укоренения, содержащую 1 мг/л ИМК. Регенеранты исследованных сортов Верас, Прывабны, Липень, полученные из семядольных узлов и гипокотилей, не проявили корнеобразования. Наблюдали образование корней только у сорта Митан. Частота ризогенеза для регенерантов сорта Митан была невысокой и составила ~5%.

Исследована возможность получения органогенеза и соматического эмбриогенеза из ткани незрелых зародышей люпина узколистного. Получение растений путем соматического эмбриогенеза позволяет решить вопрос укоренения для тех видов, у которых этот процесс идет с большими затруднениями, как например у люпина.

Культура ткани незрелых зародышей люпина узколистного сортов Миртан, Першацвет и Липень показала перспективность получения прямого стеблевого органогенеза из меристематических тканей с использованием среды МС, содержащей 4 мг/л БАП, 0,1 мг/л α -НУК. При использовании каллусогенных сред с преобладанием ауксинов наблюдали развитие каллуса, однако возможность использования полученной каллусной ткани для развития непрямого морфогенеза ограничена из-за сложности вторичного органогенеза в культуре ткани люпина. Исследована зависимость активности морфогенной реакции незрелых зародышей сортов Першацвет, Миртан, Прывабны, Митан и Верас от концентраций БАП в среде культивирования. Отмечена концентрационная зависимость по числу развития побегов у всех исследованных сортов, так, при концентрации 1 мг/л БАП и 0,2 мг/л α -НУК на экспланте развивалось 3-5 побегов, а при концентрации 4 и 6 мг/л БАП число побегов достигало 15. Проведенная оценка развития незрелых зародышей сортов люпина узколистного на морфогенных средах с различным уровнем цитикинина позволила сделать вывод о большей перспективности использования сортов Митан и Першацвет для получения морфогенных ответов в культуре *in vitro*.

Соматические эмбриоиды на эксплантах семядолей незрелых зародышей люпина узколистного сорта Митан были получены на среде МС, содержащей 5 мг/л 2,4-Д, 0,25 мг/л кинетин. Получение эмбриоидов является начальным этапом эмбриогенеза, за которым следует процесс созревания и превращения их в регенеранты. Эти стадии развития представляют собой сложные процессы и требуют дальнейших исследований. Хотя частота процесса для сорта Митан невелика, однако интересен сам факт возможности достижения соматического эмбриогенеза у люпина узколистного. Важен отбор из исследованных нами генотипов более отзывчивого в наших экспериментальных условиях сорта к индукции соматического эмбриогенеза, что для данного вида является несомненным успехом.

Укоренение регенерантов люпина узколистного является сложной проблемой, что отмечалось исследователями уже в ранних работах по культуре люпина *in vitro*. Нами показано, что из видов люпина многолистный (*Lupinus polyphyllus*), многолетний (*L. perennis*), узколистный (*L. angustifolius*), желтый (*L. luteus*) укоренение получено только у люпина многолистного [5]. Для люпина узколистного, развитие корней у которого в культуре *in vitro* крайне затруднено, особенно с увеличением количества пассажей, исследователи предприняли успешные попытки укоренения трансгенных регенерантов путем прививки на проростки соответствующего сорта. Сниже-

ние концентрации солей в среде культивирования до ½ МС и уменьшение содержания БАП до 0,1 мг/л позволило нам повысить процент укоренения регенерантов до 80-100% в первом пассаже с наилучшими результатами для сорта Митан.

Физиологические и анатомические характеристики растений, полученных в культуре *in vitro*, определяют необходимость постепенной акклиматизации к условиям *ex vitro*. Процесс адаптации растений к условиям почвы или заменяющего ее субстрата, является важным этапом в технологиях культивирования *in vitro*, и эта стадия продолжает оставаться узким местом при работе с растениями многих видов. Для адаптации культуральных растений к измененным условиям влажности *ex vitro* культуральные сосуды приоткрывали для уменьшения относительной влажности, а затем регенеранты переносили из культуральных сосудов в искусственную почву Биона (являющуюся торговой маркой ионообменного субстрата, разработанного в Институте физико-органической химии НАН Беларуси). Подросшие регенеранты переносили в почву, высаживая в горшки, и культивировали в условиях теплицы, где растения развивались, вступали в фазу цветения и завязывали семена.

Выводы

Значимость работы состоит в оценке морфогенетического потенциала сортов люпина узколистного в культуре *in vitro* и разработке метода получения регенерантов для генетической трансформации, разработке метода укоренения регенерантов, а также достижения эмбриогенеза в культуре *in vitro*.

Литература

1. *Купцов, Н.С.* Будущее люпина – маслично-белковые сорта / Н.С. Купцов // Проблемы и пути повышения эффективности растениеводства в Беларуси: материалы Междунар. науч.-практ. конф., посвящ. 80-летию образования Института земледелия, Минск, 2007.- С.186-187.
2. *Chandra, A.* Regeneration and genetic transformation of grain legumes: An overview / A.Chandra, D. Pental // Current Science. – 2003. –Vol. – 84, № 3 – P. –381-387.
3. *Pniewski, T.* *In vitro* micropropagation of four lupin species / T. Pniewski, J. Kapusta, A.B. Legocki // Acta Physiologiae Plantarum. – 2002. – Vol. 24, N. 4.- P.417-424.
4. *Фоменко, Т.И.* Сортовые особенности морфогенеза в культуре *in vitro* люпина узколистного (*Lupinus angustifolius* L.) / Т.И. Фоменко, М.К. Малюш // Сб. науч. трудов: Земледелие и селекция в Беларуси.- Жодино. – 2007.- № 43. – С. 382-393.
5. *Решетников, В.Н.* Каллусогенез люпина (*Lupinus*). Биохимическая характеристика каллусной ткани / В.Н. Решетников, Т.И. Фоменко, М.К. Малюш // Вестн НАНБ. –1999. – № 4. – С.5-11.

Резюме

Исследован морфогенетический потенциал видов и сортов люпина узколистного в культуре *in vitro* и разработан метод получения и укоренения регенерантов и адаптации растений к условиям *ex vitro*.

The *Lupinus* species and *Lupinus angustifolius* cultivars morphogenetic potential *in vitro* culture was investigated. The method of regenerants obtaining and rooting was developed and plant adaptation method to *ex vitro* conditions was proposed.

**ШЕЛУДЬКО Ю.В.¹, ГЕРАСИМЕНКО И.М.¹, КАЗАНЦЕВ А.А.¹,
СИНДАРОВСКАЯ Я.Р.¹, МАЗУР М.Г.¹, ВЯЧЕСЛАВОВА А. О.²,
ГОЛДЕНКОВА-ПАВЛОВА И.В.², КУЧУК Н.В.¹**

¹Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины, ул. Заболотного 148, г. Киев, 03680, Украина; e-mail: ysheludko@ukr.net

²Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, ул. Губкина 3, г. Москва, 119991, Россия

СОЗДАНИЕ ГИБРИДНЫХ ГЕНОВ НА ОСНОВЕ ТЕРМОСТАБИЛЬНОЙ ЛИХЕНАЗЫ *CLOSTRIDIUM THERMOCELLUM* ДЛЯ ЭКСПРЕССИИ В РАСТЕНИЯХ

Гетерологическая экспрессия генов фармацевтических белков в растениях позволяет получать рекомбинантные белки с необходимыми посттрансляционными модификациями и корректной четвертичной структурой, не загрязненные бактериальными токсинами и опасными для человека патогенами вирусной и прионной природы. Главным препятствием при использовании генетически модифицированных растений для биотехнологического производства белков обычно является низкий уровень накопления целевого продукта. Это может быть обусловлено позицией интеграции трансгена, влиянием на экспрессию на различных стадиях внутриклеточных систем регуляции, а также действием протеиназ на конечный продукт [1,2].

Использование эффективных промоторов и сигналов внутриклеточной локализации позволяет во многих случаях значительно повысить уровень транскрипции и стабильность рекомбинантного белка [1]. Кроме того, было показано, что трансляционное слияние целевого гена с последовательностью некоторых белков-носителей позволяет значительно увеличить стабильность конечного продукта [3-5]. С другой стороны, слияние генов целевого и репортерного белка в одной рамке считывания является удобным подходом для детекции рекомбинантных белков и селекции высокопродуктивных линий. Выбранный нами репортерный белок термостабильная лихеназа *Clostridium thermocellum* [6], кодируемый геном *licB*, имеет ряд важных преимуществ, в частности возможность определения его активности после температурной денатурации собственных ферментов растения [7] и отсутствие влияния на физиологическую активность целевого белка [8-10]. Мы проводили успешную экспрессию генов ацил-липидных десатураз цианобактерий, слитых с геном термостабильной лихеназы, и получили данные о наличии физиологической активности обоих белков