

2. Errabii T., Bernard C., Gandonou C., Essalmani H., Abrini J., Idaomar M., Skali-Senhaji N. Effects of NaCl and mannitol induced stress on sugarcane (*Saccharum sp.*) callus cultures // *Acta Physiologiae Plantarum*. – 2007. – Vol. 29. – P. 95-102.
3. Gawande N.D., Mahurkar D.G., Rathod T.H., Jahagidar S.W., Shinde S.M. *In vitro* screening of wheat genotypes for drought tolerance // *Annals Plant Physiol*. – 2005. – Vol. 19. – P. 162-168.
4. Hassanein A. M. A. Establishment of efficient *in vitro* method for drought tolerance evaluation in *Pelargonium* // *A. Journal of horticultural science and ornamental plants*. – 2010. – Vol. 2, №1. – P. 8-15
5. Хапилина О.Н., Новаковская А.П., Райзер О.Б., Созинова Л.Ф. Генетическая дифференциация линий регенерантов мягкой пшеницы с помощью молекулярно-генетических маркеров // *Вестник науки Казахского агротехнического университета им. С. Сейфуллина. Серия сельскохозяйственных, ветеринарных и биологических наук*. – 2011. – №1. – С. 37-45.
6. Созинова Л.Ф., Цветков И.Л., Сейтбатталова А.И. и др. Генетическая дифференциация растений-регенерантов мягкой пшеницы с помощью IRAP-маркеров // *Сельскохозяйственная биология*. – 2008. – №5. – С. 18-21.
7. Бавол А.В., Дубровна О.В., Лялько І.І. Регенерація рослин із експлантів верхівки пагона проростків пшениці // *Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів*. – 2007. – Т. 5, №1-2. – С. 3-10.
8. Зінченко М.О., Дубровна О. В., Бавол А. В. Селекція *in vitro* м'якої пшениці на комплексну стійкість до метаболітів збудник офіобольозу та водного дефіциту // *Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів* – 2012. – Т. 10, №1. – С. 28-36.
9. Паушева З. П. Практикум по цитологии растений. –М.: Колос, 1988. – С. 168 – 170
10. Kleinhofs A., Kilian A., Maroof M.A.S. et al. A molecular, isozyme and morphological map of the barley (*Hordeum vulgare*) genome // *Theor. and Appl. Genet*. – 1993. – Vol. 86. – P. 705-712.
11. Kalendar, R., J. Tanskanen, W. Chang, K. et al. Cassandra retrotransposons carry independently transcribed 5S RNA // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2008. – Vol. 105. – P. 5833-5838.

ZINCENKO M. O. BAVOL A. V., DUBROVNA O. V.

Institute of Plant Physiology and Genetics, NAS of Ukraine

Ukraine, 03022, Kyiv, Vasylkivska str 31/17, e-mail: dubrovny@ukr.net

VARIABILITY OF GENOME OF WHEAT CELLULAR LINES RESISTANT TO METABOLITES OF OPHIOBOLUS ROOT ROT UNDER OSMOTIC STRESS

Aims. Determination of cytogenetic and molecular – genetic polymorphism of resistant/nonresistant to the pathogen metabolites of *G. graminis var. tritici* cellular lines of bread wheat under osmotic stress and plant-regenerants from them. **Methods** cytogenetic analysis and IRAP – method. **Results.** It was found that the effect of mannitol appears with high concentrations and result in increased frequency of aneuploidy and spindle failures. While callus and regenerated plants were cultured *in vitro*, in the spectra of the DNA amplification products noted the appearance of amplicon approximately 638 bp. length, which is absent in original form. **Conclusions.** We found that, depending on the scheme used cell selection (direct or step) can identify the different changes in the genome.

Key words: *Triticum aestivum* L., cellular lines, cytogenetic effect, IRAP-method.

КАСЯНЧУК Р.М., ВОЛКОВ А.Р., ПАНЧУК І.І.

Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича

Україна, 58012, м. Чернівці, вул. Коцюбинського 2, e-mail: irina.panchuk@gmail.com

ВПЛИВ САХАРОЗИ НА РІВЕНЬ мРНК АРХ ЗА ДІЇ ПІДВИЩЕНИХ КОНЦЕНТРАЦІЙ ІОНІВ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ

Рослини постійно піддаються впливам стресових факторів абіотичної природи. Різні форми абіотичного стресу – світловий стрес, надмірна інсоляція, сольовий та високотемпературний стреси – призводять до зростання продукції активних форм кисню (АФК) в рослинних

клітинах [9, 11]. Шкідливі наслідки має також і підвищення концентрації іонів важких металів (ВМ), які негативно впливають на перебіг багатьох метаболічних процесів 6, 7, зокрема порушується окисно-відновна рівновага у клітині та втрачається активність багатьох ензимів [7, 8,

15]. Особливо небезпечними є іони таких металів, як мідь та залізо, які здатні змінювати валентність у клітині, каталізуючи перетворення пероксиду водню у гідроксил радикали згідно до реакції Фентона [8, 10, 11, 15]. Це, в свою чергу, викликає оксидативний стрес, який полягає в пошкодженні ДНК і білків [1] та в активації процесів перекисного окислення ліпідів у мембранах. За високих концентрацій іонів цих ВМ спостерігаються сповільнення росту рослин та хлороз, порушуються процеси фотосинтезу і дихання [7, 8, 15].

Зменшення продукції гідроксил радикалів у клітині може бути досягнуто шляхом зниження концентрації пероксиду водню завдяки збільшенню активності ензимів, які здатні його розщеплювати [12]. До таких ензимів належать, зокрема, пероксидази та каталази, які у рослин кодуються мультигенними родинками [2, 12]. Зокрема у *A. thaliana* виявлено 8 генів, які кодують три цитозольні (*Apx1*, *Apx2*, *Apx6*), три мікросо-

Матеріали іа методи

Для дослідження використовували рослини *A. thaliana* екотипу Columbia 0 віком 4,5-5 тижнів, що росли у ґрунті. Рослини вирощували в культивативній кімнаті за температури 20°C в умовах 16-годинного світлового дня. Інтенсивність освітлення становила 2000 люкс. Для проведення стресової обробки надземну частину рослин відокремлювали від кореневої системи і місце зрізу занурювали в рідке поживне середовище Мурасіге-Скуга (0,5x MS), що додатково містило 0,5 мМ хлорид міді або 0,1 мМ Fe-EDTA. Для того, щоб врахувати можливий вплив EDTA на експресію, паралельно проводили обробку рослин 0,1 мМ Na-EDTA. Крім того, в якості контролю використовували рослини, які інкубували на середовищі 0,5x MS без солей міді та заліза. Як додатковий контроль використо-

Результати та обговорення

У попередніх дослідженнях із застосуванням інкубаційного буферу, який містив 1% (30 мМ) сахарозу, нами було визначено, як підвищені концентрації іонами ВМ впливають на рівень експресії генів *Apx* у листках арабідопсису [5, 6]. Для того, щоб зрозуміти, наскільки індукція генів *Apx* залежить від присутності сахарози, у подальших експериментах було визначено рівень мРНК восьми генів *Apx* у листках арабідопсису, які протягом 12 годин оброблялись солями заліза та міді з використанням інкубаційного буферу без сахарози (рисунок). Для порівняння було також ви-

мальні (*Apx3*, *Apx4*, *Apx5*) та дві хлоропластні (*sApx*, *tApx*) ізоформи аскорбат пероксидази (APX) [12].

Активація антиоксидантних ензимів може потребувати збільшення експресії відповідних генів. Так раніше нами було встановлено, що експресія генів *Apx* у модельної рослини *Arabidopsis thaliana* залежить від концентрації пероксиду водню у клітині та диференційно індукується в умовах теплового стресу та за дії підвищених концентрацій ВМ [5, 6, 12].

Забезпечення синтезу нових молекул захисних білків в умовах стресу може вимагати додаткових енергетичних затрат, а отже – залежати від енергетичних можливостей клітини. Для перевірки цього припущення, ми визначили як експресія восьми генів *Apx* у листках *A. thaliana* за дії підвищених концентрацій іонів заліза та міді залежить від присутності у інкубаційному буфері такого джерела енергії, як сахароза.

ували інтактні рослини, які заморожували безпосередньо після зрізання. Враховуючи, що за дії токсиканта може змінюватись кількість H_2O_2 , що генерується під час транспорту електронів у хлоропластах та при фотодиханні, стресову обробку проводили у темряві за температури 20°C протягом 12 годин.

Виділення поліА⁺-мРНК, її конвертування у кДНК за допомогою зворотної транскриптази та умови проведення кількісної ПЛР у реальному часі (real time RT-PCR) на ампліфікаторі iCycler (Bio-Rad, США) з використанням генспецифічних праймерів були описані раніше [12]. Результати піддавали статистичній обробці із застосуванням двовибіркового t-критерію для незалежних вибірок.

значено рівень мРНК актину *Act2*, рівень експресії якого у тканинах листа вважається відносно стабільним [13]. Було встановлено, що у багатьох випадках рівень мРНК *Apx* за відсутності сахарози виявився нижчим, а у решта випадків – несуттєво відрізнявся від рівнів, зафіксованих нами раніше у присутності сахарози [5, 6]. В жодному випадку за відсутності сахарози не було зафіксовано достовірно вищий рівень мРНК *Apx*. При цьому рівень мРНК *Act2* за відсутності сахарози або не змінювався, або навіть зростав (контрольні рослини).

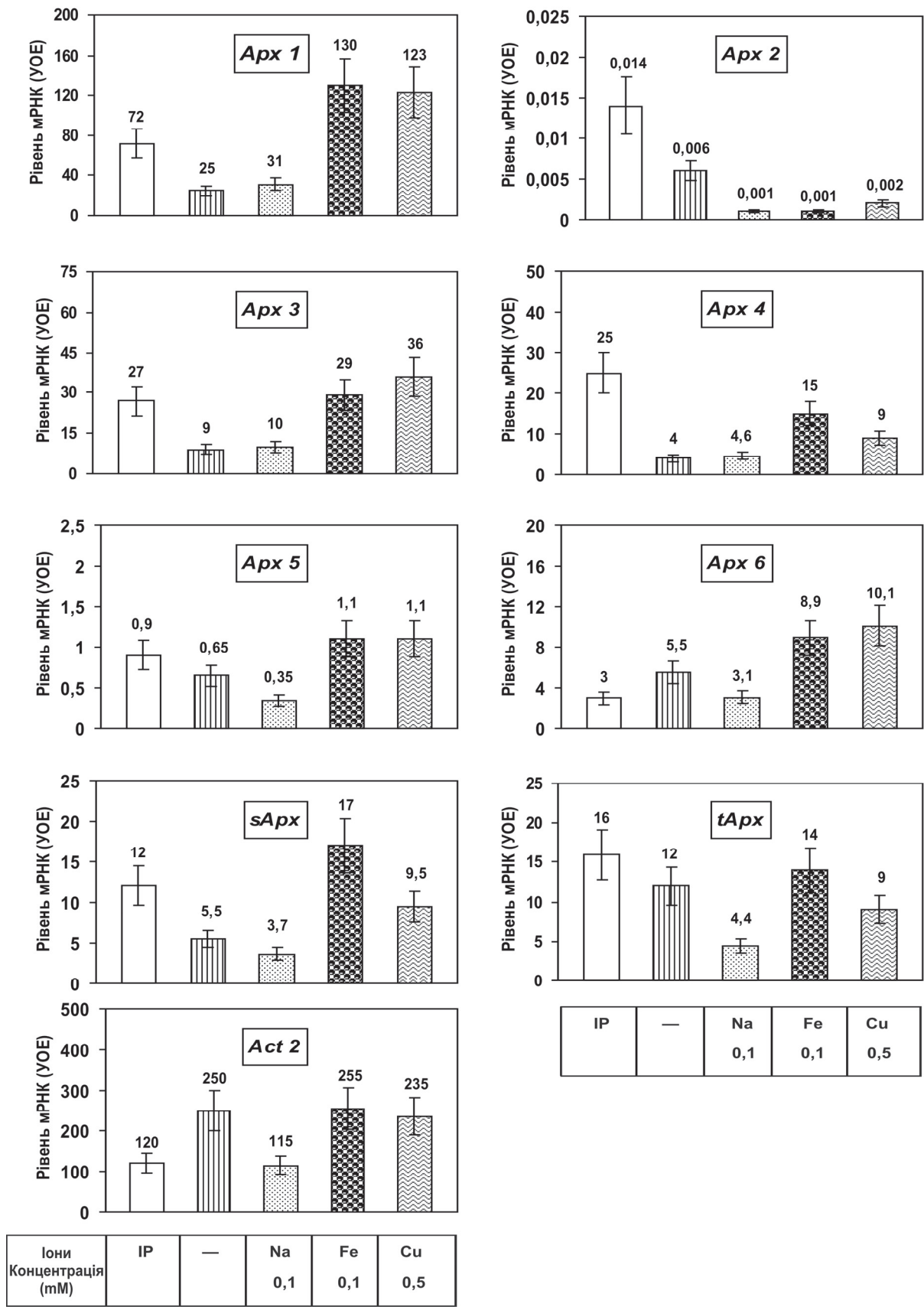


Рис. Рівні мРНК генів, що кодують різні ізоформи АРХ у листках *Arabidopsis thaliana* після обробки Fe-EDTA, Na-EDTA та CuCl₂ протягом 12 годин за відсутності сахарози в інкубаційному буфері. Рівні експресії представлено у порівнянні з рівнем мРНК для актину-2 у необробленому листі, який прийнято за 100 умовних одиниць експресії (УОЕ). IP – інтактні рослини

Якщо ж порівняти характер індукції генів *Arx* за дії іонів ВМ, то картина виявляється неоднозначною. Так, за дії 0,1 мМ Fe-EDTA зростання рівню мРНК *Arx1* та *sArx* по відношенню до контрольних зразків за відсутності сахарози становило 5,1 та 3,1 рази, що є менше, ніж у присутності сахарози [6]. В той же час, за відсутності сахарози спостерігається індукція мРНК *Arx1* та *Arx3* за дії 0,5 мМ хлориду міді – у 4,9 та 3,7 рази, відповідно, хоча у присутності сахарози індукція цих генів була практично відсутня. Проте, виявлена за відсутності сахарози індукція обох генів пов'язана не із зростанням рівня мРНК в присутності ВМ, а із падінням цього рівня у контрольних зразках. Отже, в цілому отримані результати показують, що присутність сахарози в інкубаційному буфері позитивно впливає на експресію більшості генів *Arx*.

Можна припустити, що цей ефект пов'язаний із тим, що у проведених дослідах (інкубація у темряві) сахароза виступала важливим зовнішнім джерелом енергії для клітин листка. За відсутності сахарози клітини були обмежені у своїх енергетичних можливостях і під-

тримували транскрипцію генів та синтез лише тих білків, які були найбільш необхідні для виживання. Із такою точкою зору узгоджується відносна стабільність рівня мРНК *Act2* (важливого білка «домашнього господарства») незалежно від присутності сахарози в інкубаційному буфері. З іншого боку, на користь запропонованої інтерпретації говорить також те, що найбільше зниження рівня мРНК *Arx* відносно *Act2* за відсутності сахарози спостерігалось (за виключенням *Arx5* та, можливо, *sArx*) у контрольних зразках (тобто за відсутності оксидативного стресу), а найменше (за виключенням *sArx*) – за дії 0,5 мМ хлориду міді. Як показують наші дослідження, за такої стресової обробки має місце суттєвий оксидативний стрес, який проявляє себе у різкому підвищенні рівня перекисного окислення ліпідів [4] та інактивації ферментів [3]. Тобто, за використаної нами жорсткої стресової обробки забезпечення синтезу антиоксидантних білків має набувати найвищого пріоритету, про що і свідчать отримані нами результати.

Висновки

Надмірне підвищення концентрації іонів міді та заліза у клітинах листка арабідопсису викликає зростання рівня мРНК генів, що кодують різні ізоформи АРХ, що імовірно пов'язано із посиленням транскрипції цих генів. Проте різні ізоформи АРХ мають грати різну роль у захисті клітини, оскільки рівень транскриптів різ-

них *Arx* зростає по-різному. Транскрипція генів *Arx* за дії підвищених концентрації іонів міді та заліза є важливою для клітини і відбувається навіть за обмежених енергетичних ресурсів. Присутність сахарози в інкубаційному буфері позитивно впливає на експресію більшості генів *Arx*.

Література

1. Бреслоу Е. Комплексы металлов с белками // Неорганическая биохимия. – М.: Мир, 1978. – Т. 1. – С. 274-299.
2. Газарян И.Г., Хушпульян Д.М., Тишков В.И. Особенности структуры и механизма действия пероксидаз растений // Успехи биологической химии. – 2006. – Т. 46. – С. 303-322.
3. Доліба І.М., Волков Р.А., Панчук І.І. Вплив іонів міді на активність каталази та аскорбатпероксидази в *Arabidopsis thaliana* // Физиол. биохим. культурных растений. – 2012. – Т. 44, №2. – С. 153-161.
4. Доліба І.М., Волков Р.А., Панчук І.І. Вплив іонів міді на перекисне окислення ліпідів у *Cat2* нокаутного мутанта *Arabidopsis thaliana* // Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів. – 2012. – Т. 10, №1. – С. 13-19
5. Панчук І.І., Касіянчук Р.М., Волков Р.А. Диференційна транскрипція генів *Arx* арабідопсису за дії іонів кадмію та міді // Фактори експериментальної еволюції організмів. – 2011. – Т. 11. – С. 150-154.
6. Панчук І.І., Касіянчук Р.М., Волков Р.А. Вплив іонів заліза на транскрипцію генів *Arx* арабідопсису // Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології: збірник наукових праць. – Т. 4 – К.: Логос, 2012 – С. 311-3146.
7. Топчій Н.М. Вплив важких металів на фотосинтез // Физиол. биохим. культурных растений. – 2010. – Т. 42, №2. – С. 95-103.
8. Connolly M.L., Guerinet M.L. Iron stress in plants // Genome Biol. – 2002. – Vol. 3, №8. – P. 1024.1-1024.4.
9. Foyer C., Noctor G. Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses // Plant Cell. – 2005. – Vol. 17. – P. 1866–1875.
10. Hall J.L., Williams L.E. Transition metal transporter in plants // J. Exp. Bot. – 2003. – Vol. 54, №393. – P. 2601-2613.

11. Mittler R., Vanderauwera S., Gollery M., Breusegem F. Reactive oxygen gene network of plants // Trends Plant Sci. – 2004. – Vol. 9, №10. – P. 490–498.
12. Panchuk I.I., Volkov R.A., Schöffl F. Heat stress- and HSF-dependent expression and activity of ascorbate peroxidase in *Arabidopsis* // Plant Physiol. – 2002. – Vol. 129. – P. 838-853.
13. Volkov R.A., Panchuk I.I., Mullineaux F.M., Schöffl F. Heat stress-induced H₂O₂ is required for effective expression of heat shock genes in *Arabidopsis* // Plant. Mol. Biol. – 2006. – Vol. 61, №4–5. – P. 733–74610.
14. Volkov R.A., Panchuk I.I., Schöffl F. Heat-stress-dependency and developmental modulation of gene expression: the potential of house-keeping genes as internal standards in mRNA expression profiling using real-time RT-PCR // J Exp Bot. – 2003. – Vol. 54, №391. – P. 2343-9.
15. Yruela I. Copper in plant // Braz. J. Plant Physiol. – 2005. – Vol. 17. – P. 145-156.

KASIJANCHUK R.M., VOLKOV A.R., PANCHUK I.I.

Yuri Fedkovych National University of Chernivtsi

Ukraine, 58012, Chernivtsi, Kotsubynski str. 2, e-mail: irina.panchuk@gmail.com

EFFECT OF SUCROSE ON APX mRNA LEVELS UPON HEAVY METAL STRESS

Aim. In order to clarify molecular mechanisms of heavy metal stress response in plants expression of eight genes coding for ascorbate peroxidase (APX) isoenzymes induced by iron and copper ions in leaf tissues of *Arabidopsis thaliana* was evaluated. **Methods.** Changes of mRNA levels were estimated using quantitative real-time RT-PCR. **Results.** It was found that mRNA levels of several genes (especially that of *Apx1* and *sApx*) were increased after 12 hours of treatment. Comparison of our novel and recently obtained results showed that after incubation of leaves in the buffer, which contains sucrose, the mRNA levels were the same or higher than after application of buffer without sucrose. **Conclusions.** The data indicate that the presence of sucrose in incubation buffer enhances *Apx* mRNA levels. We speculate that sucrose may serve as a source of energy required for effective transcription of *Apx* genes upon stressful conditions.

Key words: *Arabidopsis thaliana*, copper, iron, sucrose, abiotic stress, *Apx*, gene expression.

КИРПА Т.Н.¹, РУДАС В.А.¹, ОВЧАРЕНКО О.А.¹, КЛЕБАНОВИЧ А.А.¹, ГЕРАСИМЕНКО И.М.¹, ИВАННИКОВ Р.В.², ОСТАПЧУК А.Н.³, ГОЛДЕНКОВА-ПАВЛОВА И.В.⁴, ШЕЛУДЬКО Ю.В.¹

¹*Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины*

Украина, 03680, г. Киев, ул. Заболотного 148, e-mail: ysheludko@ukr.net

²*Национальный ботанический сад им. Н. Н. Гришко НАН Украины*

Украина, 01014, г. Киев, ул. Тимирязевская 1

³*Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины*

Украина, 03680, г. Киев, ул. Заболотного 152

⁴*Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН*

РФ, 127276, Москва, ул. Ботаническая 35

ГЕТРОЛОГИЧЕСКАЯ ЭКСПРЕССИЯ Δ9-АЦИЛ-ЛИПИДНОЙ ДЕСАТУРАЗЫ ЦИАНОБАКТЕРИИ В ОРХИДЕЕ *DENDROBIUM LINGUELLA* RCHB. F

Создание растений, устойчивых к неблагоприятным факторам окружающей среды, является одной из наиболее актуальных задач, стоящих перед современной биотехнологией. Это обусловлено растущими рисками климатических изменений, загрязнением окружающей среды и эрозией пахотных земель. Важным фактором, определяющим толерантность растительной клетки к температурному и осмотическому стрессам, является жирнокислотный состав клеточной мембраны. Это обусловлено тем, что при переходе липидного бислоя из жидкокристаллического состояния в фазу геля наруша-

ется функционирование мембранных ферментных комплексов. Увеличение степени ненасыщенности остатков жирных кислот в липидах клеточных мембран у растений увеличивает их текучесть и приводит к понижению температуры фазового перехода, что коррелирует с холодостойкостью растений [1].

Ферментами, отвечающими за введение двойных связей в углеводородные цепочки жирных кислот, являются десатуразы. Гетерологическая экспрессия генов десатураз позволяет изменить спектр жирных кислот мембранных липидов [2]. У высших растений синтез нена-