

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

ФАКТОРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ЕВОЛЮЦІЇ ОРГАНІЗМІВ

Збірник наукових праць

За редакцією академіка УААН
М.В. РОЇКА

Присвячено:

*120-річчю від дня народження
видатного генетика-селекціонера, організатора науки,
академіка АН УРСР А. О. Сапегіна*

*100-річчю — видатного селекціонера,
академіка ВАС Г НІЛ Д. О. Долгушина*

*100-річчю — видатного селекціонера, члена-
кореспондента ВАСГНІЛ О.С. Мусійка*

Київ
АГРАРНА НАУКА
2003

УДК 578.OS.631.52

Фактори експериментальної еволюції організмів: 36. наук. пр. /
За ред. М.В. Роїка. — К.; Аграрна наука, 2003. — 464 с.

У збірнику представлено наукові праці вітчизняних і зарубіжних спеціалістів, написані спеціально для даного видання, проблемно-оглядові статті та такі, що присвячені оригінальним конкретним експериментальним дослідженням за основними напрямками генетико-біотехнологічного розширення генетичної мінливості живих організмів, генетики господарськи цінних ознак рослин і тварин, 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, теорії і практиці інформаційних технологій при проведенні досліджень.

Розрахована на генетиків, селекціонерів, біотехнологів, а також викладачів, аспірантів, студентів вищих навчальних закладів III—IV рівнів акредитації.

*Рекомендовано до друку
рішенням Президії Українського товариства
генетиків і селекціонерів ім. М.І. Вавилова
20 червня 2003 р. (протокол №1)*

РЕДАКЦІЙНА КОЛЕГІЯ:

М.В. Роїк — д-р с.-г. наук, акад. УААН (шефредактор),
В.А. Кунах — д-р біол. наук, чл.-кор. НАНУ (головний редактор),
А.А. Корчинський — канд. біол. наук (заст. головного редактора),
Л.Л. Лукаш — д-р біол. наук (заст. головного редактора)

Члени редакційної колегії:

І.Р. Бариляк — д-р мед. наук; Я.Б. Блюм — д-р біол. наук, чл.-кор. НАНУ; В.В. Волкодав — канд. с.-г. наук, чл.-кор. УААН; В.І. Глазко — д-р с.-г. наук; М.В. Кучук — д-р біол. наук; С.С. Малюта — д-р біол. наук, чл.-кор. НАНУ; В.Г. Михайлов — д-р с.-г. наук, чл.-кор. УААН; Т.В. Новак — канд. с.-г. наук

*За редакцією доктора
сільськогосподарських наук, академіка УААН
М.В. РОІКА*

Адреса:

*Українське товариство генетиків і селекціонерів ім. М.І. Вавилова
вул. Клінічна, 25, Київ, 03141, Україна*

Ф 3702010000-30
2003 Без оголошення

**і селекціонерів ім. М.І. Вавилова,
2003**

ISBN 966-540-138-6

© Українське товариство генетиків

СУЧАСНІ МЕТОДИ БІОТЕХНОЛОГІЇ У СТВОРЕННІ НОВОГО ПОКОЛІННЯ СОРТІВ І ГІБРИДІВ КУЛЬТУРНИХ РОСЛИН

В.І. АДОНІН, І.Ю. ПАРНІКОЗА, Н.Ю. МІРЮТА,

О.О. ПОРОННІК, В.А. КУНАХ

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України

вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03143, Україна факс (38044) 2660759; e-mail: kunakh@imbg.org.ua

ЗВ'ЯЗОК МІЖ ПРОЦЕСАМИ ДИФЕРЕНЦІАЦІЇ ТА ПРОЛІФЕРАЦІЇ В КУЛЬТУРІ ТКАНИН *ARNEBIA EUCHROMA (ROYLE.) JONST*

У зв'язку з широким застосуванням культивованих тканин рослин у сучасній біотехнології важливим є вивчення закономірностей перебігу процесів диференціації та дедиференціації в культурі *in vitro*. Метою даної роботи було встановлення можливих кореляційних зв'язків між процесами диференціації та проліферації в культурі тканин високопродуктивного гормонезалежного штаму АЕ-3 *Arnebia euchroma* — джерела цінного нафтохінонового барвника шиконіну [1].

Матеріали і методи. Протягом пасажу штаму АЕ-3 (20 днів росту) кожної доби провадили виміри сухої біомаси та аналізували вміст вторинного метаболіту шиконіну. Водночас підраховували кількість мітозів, амітозів, трахеїдних елементів та випадків екструзії ядерного матеріалу, а також вимірювали площу ядер клітин. Тканину фіксували в оцтовокислому спирті (1:3) і через добу переносили у 70%-й етанол. Матеріал аналізували на давлених препаратах, забарвлених ацетоорсеїном за методикою [2]. Для отримання значень відносного вмісту ДНК в ядрі застосовували денситометрію забарвлених за Фьольгеном препаратів [3]. Для цитофотометрії та денситометрії використовували систему, що складалася з мікроскопа NU-2E (Carl Zeiss), цифрової камери CCD SAC-410 PA, комп'ютера PC AT Pentium-II з монітором, відеодрайвера ASUS V 3000. Одержані показники порівнювалися методом парної лінійної регресії [4].

Результати та їхнє обговорення. В гормонезалежному штамі АЕ-3 проліферація зумовлена двома процесами — мітозом та амітозом, які протікали синхронно (коефіцієнт кореляції $R = +0,35$, рис. 1).

Порівнюючи динаміку одного з показників проліферації, мітозів, з динамікою кількості трахеїдних елементів, що характеризують інтенсивність перебігу процесів диференціації, ми виявили, що вони позитивно корелюють впродовж усього пасажу, але із зсувом за фазою на одну добу ($R=+0,6$, рис. 2). Аналіз кількісного

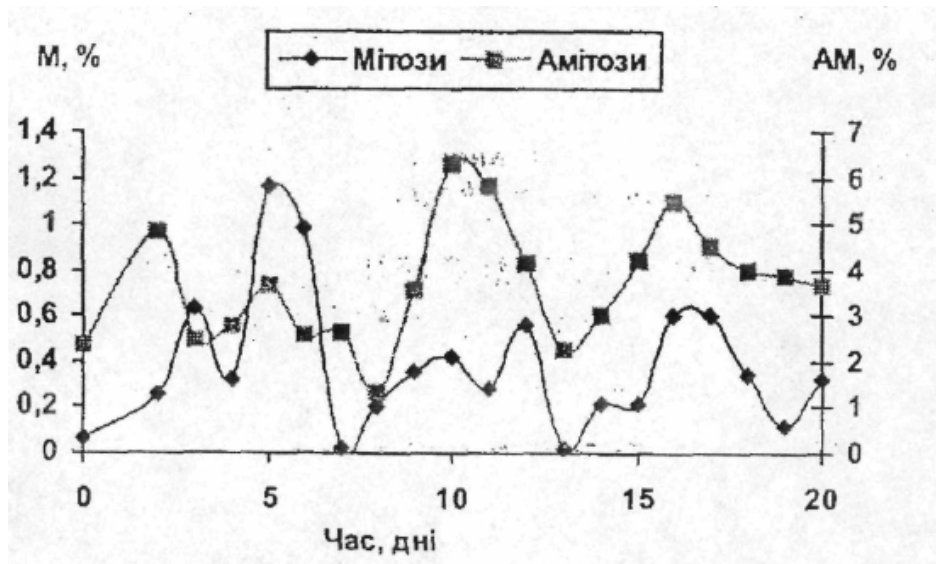


Рис. 1. Динаміка кількості мітозів (M) та амітози» (AM) упродовж пасажу в культурі тканин *A. eichroma*, штам АЕ-3. Коефіцієнт кореляції $R = +0,35$

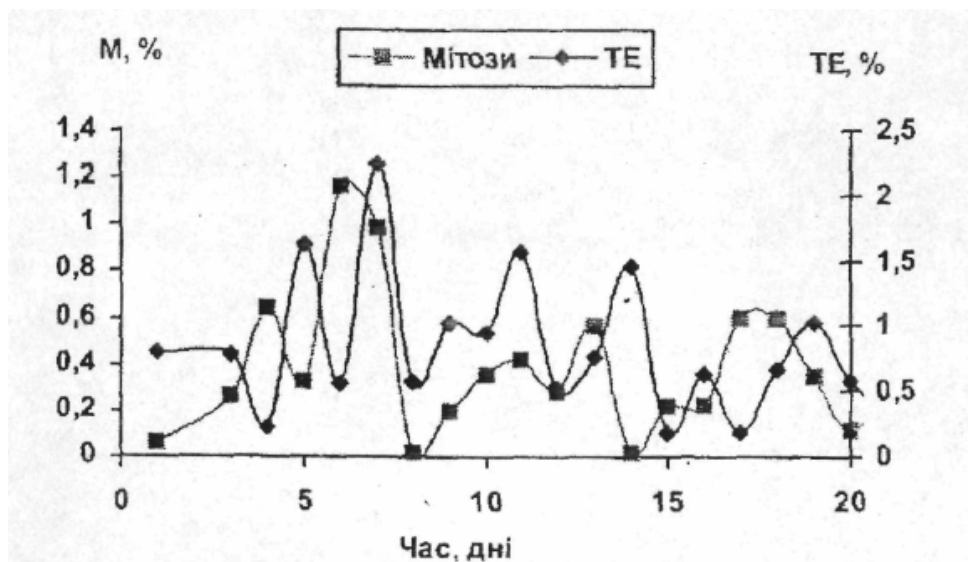


Рис. 2. Динаміка кількості трахеїдних елементів (ТЕ) та мітозів (M) у штамі АЕ-3 при зміщенні кривої мітозів на одну добу вперед. Коефіцієнт кореляції $R = +0,6$

показника ступеня диференціювання — ендоредуплікації, про яку ми судили за зміною градієнта середнього зваженого відносного вмісту ДНК (ввДНК, вимірний у відносних одиницях (в.о.)) в ядрі, показав його значні коливання протягом пасажу. Припускаючи, що причиною зниження ввДНК на ядро можуть бути як екструзії, так і амітози, ми порівняли динаміку ввДНК на ядро з динамікою екструзій ядерного матеріалу й амітозів (рис. 3, 4).

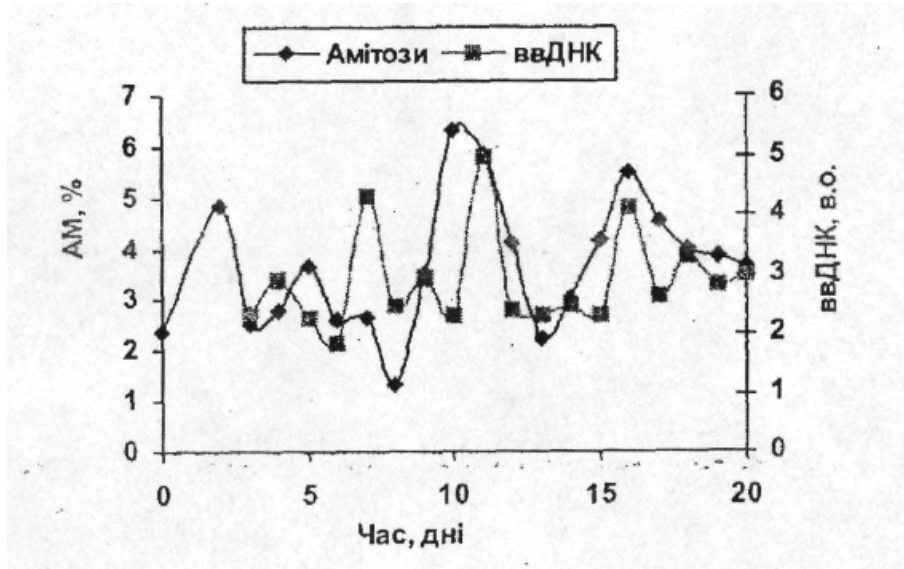


Рис. 3. Динаміка кількості амітозів (АМ) та середнього зваженого відносного вмісту ДНК (ввДНК) при зсуві останньої динаміки на одну добу вперед. $R = +0,67$ на проміжку 10-20 день

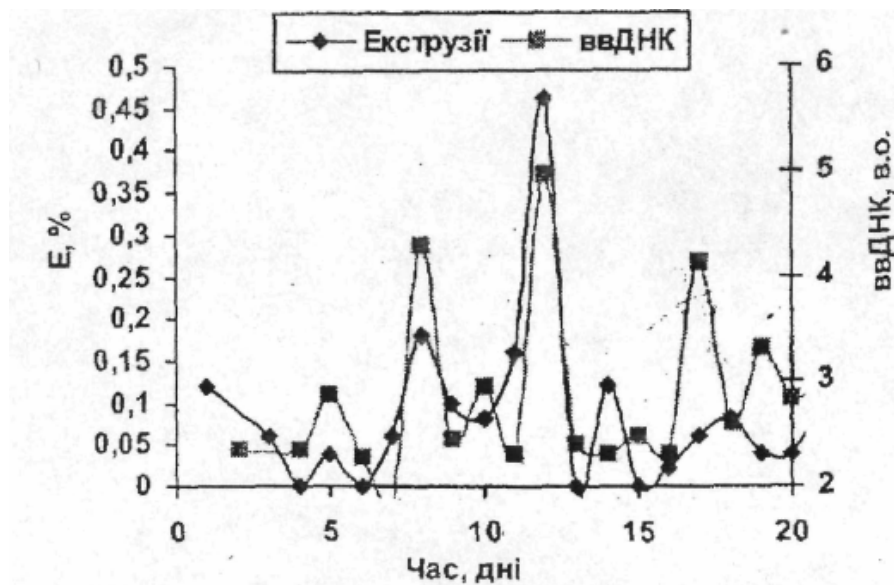


Рис. 4 Динаміка кількості екструзій (E) та середнього зваженого відносного вмісту ДНК (ввДНК). $R = +0,48$ протягом усього пасажу штаму АЕ-3 при зсуві другої динаміки на одну добу вперед

Знайдено позитивну кореляцію динаміки обох параметрів з динамікою ввДНК із зсувом за фазою на одну добу ($R = +0,48$ для екструзій протягом всього пасажу та $R = +0,67$ для амітозів на проміжку 10—20 день).

Виявлено також позитивну кореляцію між динамікою обох проліфераційних процесів та швидкістю накопичення шиконіну (для мітози в показник кореляції з першою складовою $R = +0,55$ (0—7 день), з другою $+0,77$ (7-13 день), з третьою $+0,81$ (13-19 день)), для амітозів $R = +0,69$ з 8-ї по 20-ту добу, що відповідає 2-та 3-й складовим, рис. 5, 6).

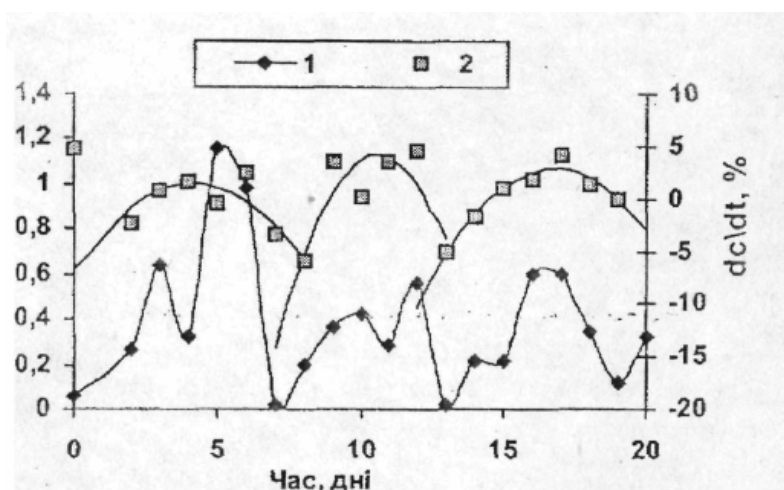


Рис. 5. Динаміка кількості мітозів (M) — 1 та швидкості накопичення шиконіну (dc/dt) — 2 у штамі АЕ-3 протягом пасажу

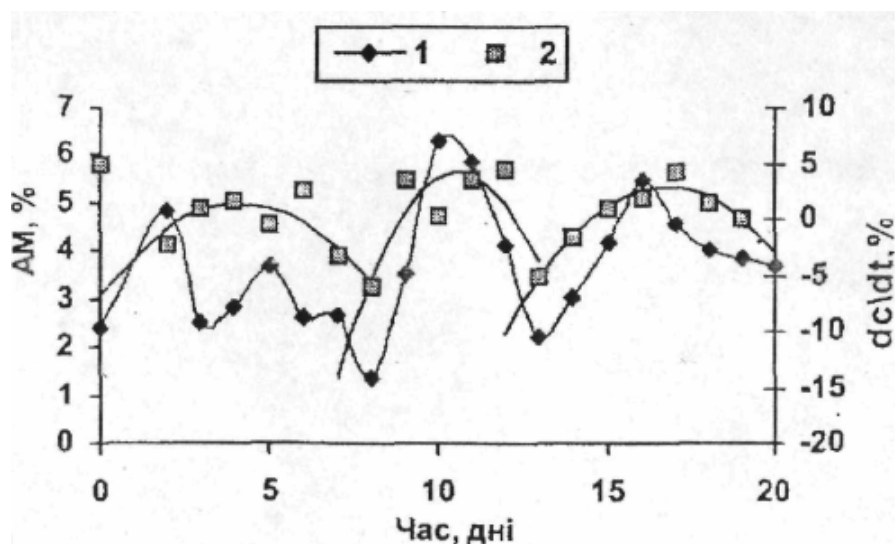


Рис. 6. Динаміка кількості амітозів (AM) - 1 та швидкості накопичення шиконіну (dc/dt) — 2 у штамі АЕ-3 протягом пасажу

Таким чином, можна припустити, що в гормонезалежному штамі АЕ-3 *A. euchroma* процеси проліферації та деякі процеси диференціації синхронізовані із швидкістю продукції шиконіну. Порівняння зв'язку між динамікою швидкості накопичення шиконіну та кількістю різних за площею ядер, а також між динамікою швидкості накопичення сухої біомаси з цими ж показниками дає уявлення про специфіку перебігу різних процесів та про чергування їхньої активності впродовж пасажу. Цікаво, що кореляції (як позитивні, так і негативні) між динамікою кількості ядер різних за площею та швидкістю накопичення шиконіну спостерігаються лише з 8- по 20-й день за повної відсутності з 0 по 7 день росту (табл. 1).

Таблиця 1. Коефіцієнта кореляції R динаміки складових швидкості накопичення шиконіну з динамікою кількості клітинних ядер різних класів площ протягом пасажу штаму АЕ-3

Номер класу	Значення площ ядер у межах класу, мкм ¹	R з першою складовою: 0-8-й день	R з другою складовою: 8—13-й день	R з третьою складовою: 13-20-й день
1	<100	0	0	-0,65
2	100-149,9	0	0	-0,76
3	150-199,9	0	-0,66	0
4	200-249,9	0	0	-0,58
5	250-299,9	0	0	0
6	300-349,9	0	+0,86	+0,62
7	350-399,9	0	-0,55	0
8	400-449,9	0	0	0
9	450-499,9	0	0	+0,71
10	500-549,9	0	-0,78	0
11	>550	0	0	+0,61

Водночас протилежно спостерігається при аналізі зв'язку між динамікою швидкості накопичення сухої біомаси і кількістю різних за площею ядер. У цьому випадку кореляції спостерігались лише з 0 по 10-й день і були повністю відсутні на проміжку 10—20-й день (табл. 2). Цікавим фактом є наявність негативної кореляції динаміки швидкості накопичення біомаси з кількістю амі-

тозів в інтервалі 0—10-й день ($R = -0,51$) за одночасної позитивної кореляції динаміки накопичення шиконіну з ними на проміжку

Таблиця 2. Коефіцієнти кореляції R динаміки складових швидкості накопичення сухої біомаси з динамікою кількості клітинних ядер різних за площею протягом пасажу штаму АЕ-3

Номер класу	Класи площ ядер, мкм ²	R з другою складовою: 0-10-й день	K з першою складовою: 10-20-й день
1	<100	-0,38	0
2	100-149,9	0	0
3	150-199,9	0	0
4	200-249,9	-0,44	0
5	250-299,9	0	0
6	300-349,9	+0,43	0
7	350-399,9	0	0
8	400-449,9	0	0
9	450-499,9	+0,40	0
10	500-549,9	0	0
М	>550	0	0

7—20-й день ($R = +0,69$ з 2-ю та $R = +0,84$ з 3-ю складовими). Виходячи з цього, динаміку загальної продуктивності штаму АЕ-3 протягом пасажу можна поділити на два етапи. На першому етапі (перші 10 днів росту) продукція біомаси пов'язана із процесами зміни розмірів ядер, розмірів клітин та відносного вмісту ДНК в ядрах, продукція шиконіну — із процесами проліферації клітин та екструзії ядер. На другому етапі (10—20 дні росту) продукція біомаси пов'язана із процесами проліферації клітин та екструзії ядер, продукція шиконіну — із змінами розмірів ядер та відносного вмісту ДНК в ядрах, а також із процесами проліферації клітин. Таким чином, упродовж пасажу виявлено синхронність різних проліфераційних процесів, що мають місце в штамі АЕ-3 культури тканин *A. euchroma*. Параметри, які репрезентують проліферацію та диференціацію клітин, змінюються синхронно,

але зсунуті за фазою на одну добу. Виявлено ряд корелятивних зв'язків проаналізованих показників з динамікою швидкості накопичення цінного вторинного метаболіту шиконіну.

1. Кунах В.А., Пороннік О.О. Штам культивованих клітин арнебії барвлячої *Arnebia euchroma* (Royle) Jonst. — продуцент шиконіну // Деклараційний патент України № 42151А від 15.10.2001. Бюл. №9.
2. Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. — М: Колос, 1970. - 254 с.
3. Histological & Histochemical Methods // Theory and Practice. Second edition by J.A. Kiernon — Pergamon Press. — 1990. — P. 136—364.
4. Поллард Дж. Справочник по вычислительным методам статистики. — М.: Финансы и статистика, 1982. — 344 с.

Обнаружена синхронность пролиферационных процессов, которые имеют место в гормоннезависимом штамме АЕ-3 Arnebia euchroma на протяжении пассажа. Параметры, которые представляют пролиферацию и дифференциацию клеток, изменяются синхронно, но сдвинуты по фазе на одни сутки. Выявлен ряд корелятивных связей проанализированных показателей с динамикой скорости накопления шиконина.

The synchrony in different proliferation events was found to occur in Arnebia euchroma tissue culture in she hormone-free medium during subculture. The parameters that represent cell proliferation and differentiation varied synchronously, but were shifted relative each other by the phase for 1 d, A number of indices estimated were correlated with the shikonin accumulation rate