ISSN 0233-7657. Біополімери і клітина. 2006. Т. 22. № 4

Екзогенні ДНК можуть впливати на регуляторні системи рослин, відповідальні за адаптацію до змін у довкіллі

В. А. Кацан, А. І. Потопальський

Інститут молекулярної біології та генетики НАН України
Вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03143, Україна

potopalsky@imbg.org.ua

Розроблено оригінальну технологію отримання рослин тютюну з комплексом селекційно цінних ознак (прискорений розвиток, висока продуктивність та стійкість до комплексного засолення ґрунтів) за допомогою препаратів екзогенної ДНК (е-ДНК), вивчено фізіолого-біохімічні особливості таких рослин та їхнє спадкування. Для індукування бажаних змін у жовтолистого сорту тютюну Крупнолистный 20 (КР20) використано ДНК солестійкої форми пасльону чорного Solanum nigrum L. і плазмід pCAMVNEO та pTi8628. Важлива її перевага — забезпечення ширшого спектра змін і більшого виходу змінених життєздатних рослин. На основі аналізу модифікацій, виявлених у тютюну та рослин модельної системи, використаних при розробці технології, запропоновано гіпотетичний механізм впливу е-ДНК на спадковість рослин.

Ключові слова: пасльонові, екзогенні ДНК, алкілована тіофосфамідом ДНК, хлорофіли, каротин, ксантофіли, віолаксантин, лютеїн, солестійкість.

Вступ. У наш час як ніколи постає проблема створення сортів рослин, здатних не лише виживати в зміненому довкіллі, але й мати належний рівень продуктивності. Особливо важливою є проблема засолення ґрунтів: у світовому масштабі площі засолених ґрунтів досягають 900 млн га і неухильно зростають через застосування інтенсивних аграрних технологій, зокрема, штучного зрошування, а також включення у користування земель, які вже є засоленими в силу природних умов [1, 2]. Засолення сільськогосподарських угідь є проблемою більш ніж 100 країн світу, у тому числі держав, що входили до складу Радянського Союзу, де, за даними кінця минулого століття, воно сягало в середньому до 10 %, а в державах Середньої Азії — до 50—80 % [3].

© В. А. КАЦАН, А. І. ПОТОПАЛЬСЬКИЙ, 2006

Важливу проблему також складають зміни клімату та забруднення довкілля ксенобіотиками, які, крім токсичного, чинять ще й мутагенний вплив на рослини.

Для отримання нових форм рослин з комплексом селекційно цінних ознак все більшого значення набувають пошуки шляхів розширення мінливості та передавання таких ознак від дикорослих родичів.

Стійкість до несприятливих умов існування, а також кількісні ознаки, які визначають врожайність та структуру врожаю у рослин, є полігенними. Гени, що обумовлюють згадані ознаки, входять до складу різних груп зчеплення, тому виникають труднощі в передаванні їх методами генної інженерії. Мутагенну дію екзогенних ДНК вперше було показано 67 років тому дослідженнями Тарнавського [4, 5] і Гершензона [6]. Гер-

шензоном та ін. встановлено основні закономірності дії природних і синтетичних полінуклеотидів на живі організми [7, 8], а в 70—80-х роках минулого століття виявлено можливість отримання селекційно цінних ознак у рослин за допомогою препаратів ДНК [9—12]. Механізми впливу екзогенних ДНК (е-ДНК) на спадковість і по сьогодні є предметом дискусій, тому дослідження в цьому напрямку не досить інтенсивні.

В результаті експериментів, які проводили впродовж більш ніж трьох десятиліть у нашій лабораторії розроблено методологію зміни спадкової інформації рослин за допомогою препаратів е-ДНК, важливими рисами якої є вибір ДНК як донора бажаних ознак чи мутагену (залежно від таксономічної спорідненості донора та реципієнта), отримання препаратів ДНК донора та алкілування їх за допомогою трифункціонального алкілуючого агента тіофосфаміду (е-ДНТ) та дії згаданими препаратами на проростаюче насіння реципієнта. Застосування таких підходів дало можливість отримати понад 40 нових форм і сортів рослин з бажаними ознаками, серед яких є такі, що пройшли Державне сортовипробування, зареєстровані в Україні і рекомендовані для застосування в практиці [9]. Концентрація ДНК, стадія проростання насіння та умови проведення його інфільтрації розчинами ДНК для кожного виду рослин обиралися індивідуально експериментальним шляхом.

Мета цієї роботи — розробити технологію отримання нових форм рослин тютюну з комплексом селекційно цінних ознак, серед них: солестійкість, скоростиглість, висока продуктивність, які могли б стати основою для створення сучасних сортів, та аналіз змін, індукованих у рослин е-ДНК.

Матеріали і методи. *Сорт тютюну, обраний як донор.* Дослідження проводили на чистій лінії тютюну сорту Крупнолистный 20 (КР20) (автор О. П. Гребьонкін, НПО «Табак», Росія), насіння якої люб'язно надане нам Б. О. Левенком (Національний ботанічний сад ім. М. М. Гришка НАН України). Сорт КР20 відзначається раннім апоптозом листя промислових ярусів. Характерного фенотипу із світло-жовтим забарвленням листя середніх ярусів та зеленим — лише на верхівках рослини набувають уже на початкових стадіях вигону квітконосної стрілки. Такий фенотип обумовлений домінатною мутацією *White*, отриманою Космодем'янським у 1965 р. методом хімічного мутагенезу [13]. Подібні за фенотипом мутанти виникають також спонтанно, вони відомі практично для всіх агроекологічних груп тютюну і можуть бути обумовленими як домінантними, так і рецесивними генами [14]. Увагу селекціонерів жовтолисті мутанти привернули у зв'язку з тим, що одним із важливих показників якості сировини для тютюнового виробництва є колір листя після його зламування, витомлювання та висушування — високоякісним є листя, яке набуває рівномірного золотаво-коричневого забарвлення, і якраз жовтолисті тютюни дають найвищий вихід високоякісної сировини за ознакою кольору [15]. Але всі відомі на даний час мутації, які обумовлюють ранній апоптоз листя промислових ярусів тютюну, є, безумовно, шкідливими, оскільки знижують життєздатність рослин і вміст господарсько корисних речовин у листі, що викликає загальне погіршення якості сировини.

Основи вчення щодо взаємозв'язку біохімічних показників з якістю сировини для тютюнового виробництва закладено О. О. Шмуком: крім відсутності хлорофілів, сировина високої якості характеризується, в першу чергу, високим вмістом вуглеводів та оптимальним співвідношенням між вуглеводами та білками (число Шмука) [16]. Кореляцію вмісту хлорофілів з біохімічними показниками якості сировини у тютюнів сортотипу Крупнолистный досліджували раніше [17].

Рослини, використані в модельній системі. При розробці технології зміни спадкових ознак тютюну застосовано нові підходи, тому дію екзогенних ДНК досліджували на модельній системі з використанням, крім тютюну сорту КР20, і дикоростучих рослин з родини пасльонових — дурману, *Datura stramonium L.*, а також культурних рослин з інших родин — сорго сорту Горизонт, проса Червона Ватра, кукурудзи сорту Делікатесна, маку снодійного сорту Новинка. Чисті лінії цих рослин отримано в нашій лабораторії на основі сортового матеріалу.

Рослина — донор селекційно цінних ознак. Як донор використано солестійку форму пасльону чорного — *Solanum nigrum L.* Солестійка форма пасльону — це лінія від рослини, взятої з природної популяції, адаптованої до росту в умовах комплексного засолення грунту (с. Рибаківка Очаківського району Миколаївської області).

Отримання препаратів ДНК. Виділення ДНК пасльону та алкілування одержаних препаратів ДНК тіофосфамідом здійснювали згідно з метода-

ми, розробленими в нашій лабораторії [18, 19]. Очищену ДНК *pCAMVNEO*, яка містить ген стійкості до канаміцину з бактеріального транспозону *Tn5*, люб'язно надано нам О. П. Смирновим (Інститут загальної генетики ім. М. І. Вавилова РАН, Москва). ДНК *pTi8628* виділяли з культур рослин, інфікованих штамом *Agrobacterium tumefaciens* [20].

Методи статистичної математики. Для обробки отриманих результатів досліджень використано методи оцінки вірогідності величин середніх арифметичних та вірогідності відмінностей між варіантами досліду та контролем за критерієм Ст'юдента, розділення вибірок з великим розмахом варіації на класи, а також однофакторну схему дисперсійного аналізу [21, 22].

Результати і обговорення. Оптимальну концентрацію препаратів ДНК у розчинах для інфільтрації насіння тютюну обирали експериментально з урахуванням даних, отриманих раніше в нашій лабораторії на томатах та інших рослинах, вона дорівнювала 500 мкг/мл. ДНК вводили в проростаюче насіння методом інфільтрації. Нові підходи, застосовані нами для розробки технології, полягають у наступному:

— для розширення розмаху мінливості за досліджуваними ознаками ДНК рослини-донора використано в комплексі з ДНК плазмід, які є джерелом відомих мобільних генетичних елементів (*pCAMVNEO*, *pTi8628*);

— змінено тривалість дії препаратів ДНК;

— змінено умови проведення інфільтрації проростаючого насіння розчинами ДНК.

У результаті досліджень показано виражену генотипну специфічність впливу використаних нами ДНК на обрані рослини, особливо щодо генотоксичної дії, виходу життєздатних фертильних рослин та таких, які мали бажані ознаки вже в першому поколінні (таблиця). Найбільшу токсичність на рослинах модельної системи виявили ДНК плазмід. ДНК пасльону в обраній концентрації була генотоксичною для тютюну, тому в комплексному препараті її концентрацію, а також концентрації ДНК плазмід зменшено втричі. Відмінності в дії алкілованої та нативної ДНК пасльону теж залежали від генотипу реципієнта. Алкілування ДНК пасльону тіофосфамідом дало можливість не лише усунути її генотоксичну дію на просо та тютюн при використанні у високій концентрації (500 мкг/мл), але й отримати життєздатні фертильні рослини, у той час як для маку генотоксичною виявилася якраз алкілована ДНК пасльону. ДНК *pTi8628* була генотоксичною для тютюну і сорго; алкілування ДНК *pTi8628* дало можливість отримати фертильні рослини тютюну, але схожість насіння дурману при цьому знижувалася. Алкілування тіофосфамідом ДНК *pCAMVNEO* не дало можливості усунути її генотоксичну дію на досліджені види рослин, крім тютюну: за допомогою е-ДНТ *pCAMVNEO* вдалося отримати одну рослину тютюну (№ 73), яка виявилася фертильною. Загалом при застосуванні розроблюваних нами підходів фертильні рослини отримано для всіх досліджених видів, крім кукурудзи. Бажані зміни при наявності життєздатних рослин у більшості варіантів досліду спостерігали якраз на тютюні сорту КР20.

Розроблена нами технологія дала змогу отримати рослини тютюну зі зміненим фенотипом щодо забарвлення листя, а також із збереженням хлорофілів у листі з промислових ярусів до завершення розвитку, які, до того, ж відзначалися швидшим розвитком і ранніми термінами зацвітання порівняно з контролем та мали велике листя, і ці ознаки спадкувалися [23—26].

Для рослин із варіантів, де було застосовано ДНК чи ДНТ солестійкої форми пасльону, показано успадкування солестійкості (6,3±0,14—7,7±0,11 і 9,8±0,10—10,4±0,12 % життєздатних паростків відповідно, отриманих на середовищі з 20 г/л морської солі з насіння рослин першого покоління). Як і в разі томатів [3, 9], селекційно цінні зміни виникали вже в першому поколінні.

Отримання солестійких форм тютюну [25, 26] може бути свідченням генетичної трансформації тютюну за допомогою ДНК солестійкого пасльону. Відомо, що при сольовому стресі у рослин настають глобальні зміни в метаболізмі, що обумовлено змінами експресії біля 1500 генів [27]. Природа солестійкості у рослин має полігенний характер і може бути обумовлена явищами, які забезпечуються механізмами контролю транспорту та антипорту іонів через плазматичну мембрану в цитоплазму, транспорту надлишку іонів із цитоплазми у вакуолі та біосинтезом речовин, що мають захисне значення при абіотичних стресах (пролін, бетаїни, трегалоза, міоінозитол, поліаміни та ін.), а також активізацією систем, знешкоджуючих реактивні форми кисню за участі глутатіону та підвищенням експресії генів процесингу нуклеїнових кислот, зо-

Вплив препаратів е-ДНК та е-ДНТ на схожість насіння та появу найхарактерніших фенотипових змін у рослин T_1

Препарат ДНК	Концентрація ДНК, мкг/мл	Тютюн Крупнолистный 20		Дурман звичайний		Просо
		Схожість, %	Зміни фенотипу, %	Схожість, %	Зміни фенотипу, %	Схожість, %
ДНК пасльону	500	0	—	11,7*	А, 46,7*	0
ДНТ пасльону	500	46,7**	З, 100,0; РЦ, 94,9*	10,3**	А, 50,0**	0,7**
ДНК *pTi8628*	500	0	—	15,0*	А, 48,9*	6,0*
ДНТ *pTi8628*	500	4,0*	З, 100,0; РЦ, 75,0*	2,7**	А, 49,9*	0
ДНК *pCAMVNEO*	500	2,7*	З, 100,0; РЦ, 75,0*	0	—	0
ДНТ *pCAMVNEO*	500	0,3 (одна рослина)	З, РЦ	0	—	0
Комплекс ДНК[1]	500 (в сумі)	31,7*	З, 100,0; РЦ, 89,1*	0	—	1,0*
Комплекс ДНТ[2]	500 (кожної ДНТ)	0	—	4,3*	А, 56,0*	0
Контроль	H_2O	97,3**	—	98,5**	—	97,8**

Примітка. [1]Комплекс ДНК пасльону та плазмід *pCAMVNEO* і *pTi8628*, концентрація кожної ДНК — третина від 500 мкг/мл; досліджуваних параметрів: *$p > 0,95$; **$p > 0,99$ при $n = 5$. Розшифрування фенотипів: А — антоціанове забарвлення квітів і рослин (салатовий) колір листя; ДЛ — дрібне листя; К — карликові рослини; Н — низькорослі рослини; З — «зелений» тип розвитку (збеантоціанова пігментація листя та стебла (кукурудза); КВ — «колосовидна волоть» (кукурудза); С — стерильність (пов'язана з гетеро-

крема, ДНК-гелікази, біосинтезом PR-білків [28—36]. Солестійкість у рослин фактично є кількісною ознакою, оскільки її можна підвищити завдяки посиленню однієї зі згаданих вище ланок метаболізму при введенні генетичних конструкцій, які містять один—два гени [28—35]. До набуття рослинами солестійкості в природних популяціях можуть бути залучені кілька механізмів, тому за допомогою е-ДНК отримувати солестійкі рослини значно надійніше й простіше, що показано нашими дослідженнями на тютюні та отриманням солестійкого сорту томатів [3, 9].

Характерною ознакою впливу е-ДНК, застосованих згідно з розробленою технологією, є індукування великої кількості змін у рослин першого покоління. Зміненими виявилися практично всі отримані рослини тютюну — за висотою, термінами розвитку, формою та забарвленням листя. Найхарактерніша ознака — повернення рослин до дикого зеленого фенотипу. У лініях рослин, відібраних з різних варіантів, показано спадкування цієї ознаки [23—26]. Виявлено також здатність е-ДНК індукувати кількісні та якісні спадкові зміни в накопиченні пігментів фотосинтезу, детально проаналізовані нами в роботах [23, 24].

Серед модифікацій, отриманих у рослин за допомогою е-ДНК, є такі, що можуть бути свідченням впливу е-ДНК на генетичні системи, які відповідають за адаптацію до змін у довкіллі. Це, перш за все, успадкування солестійкості та деякі спадкові зміни в накопиченні пігментів фотосинтезу, зокрема, зміни у співвідношенні хлорофілів *a* та *b*, отримані у тютюну за допомогою ДНК пасльону [24—26]. Відомо, що реакція перетворення хлорофілу *a* в *b* каталізується хлорофілід-*a*-оксигеназою, регулює розмір головного світлозбирального комплексу (СЗК II) і лежить в основі адаптації рослин до змін умов освітлення [37]. Зростання вмісту пігментів віолаксантинового циклу [24—26] теж може мати адаптивне значення, оскільки сполуки, які генеруються віолаксантиновим циклом, регулюють безпечне розсіювання надлишку поглинутої світлової енергії [38].

Крім того, віолаксантин є субстратом для біосинтезу абсцизової кислоти, дуже важливої для реалізації стресових відповідей у рослин [39]. Загальне зростання вмісту ксантофілів і каротину [24] також може бути важливим для процесів адаптації з огляду на значну біологічну роль цих пігментів у знешкодженні вільних радикалів, що

Червона ватра	Сорго Горизонт		Кукурудза Делікатесна		Мак снодійний Новинка	
Зміни фенотипу, %	Схожість, %	Зміни фенотипу, %	Схожість, %	Зміни фенотипу, %	Схожість, %	Зміни фенотипу, %
—	2,7*	Н, 100,0	0	—	30,0*	Л (КФ), 85,3*; Хл, 25,0*; ДЛ, 50,0*
К, 50,0**	2,0	Н, 100,0	0	—	0	—
К, 100,0	0	—	46,7*	АЛС, 46,2*; КВ, 30,8*; С, 100,0	45,0	Л (КФ), 76,3*; Хл, 15,4*; ДЛ, 21,9*
—	0	—	0	—	0	—
—	0	—	0	—	0	—
—	0	—	0	—	0	—
К, 100,0	1,7*	Н, 100,0	6,7*	Л, 100,0	0	—
—	0	—	0	—	0	—
—	96,9**	—	96,7**	—	98,3**	—

[2]комплекс ДНТ того ж походження, концентрація кожної ДНТ — 500 мкг/мл. Ступені вірогідності наведених максимальних значень (дурман); Л — летальність на ранніх стадіях розвитку; КФ — карликові рослини з антоціановою пігментацією (мак); Хл — світлий реження хлорофілів у листі промислових ярусів до завершення розвитку, тютюн); РЦ —ранньоквітучий фенотип (тютюн); АЛС — хронічним розвитком пильників і початків у кукурудзи).

утворюються з кисню та хлорофілів і можуть стати причиною пошкодження фотосинтетичних мембран. Збільшена частка хлорофілу *a*, який входить до складу реакційних центрів, та лютеїну [24, 26], що є складовою пігментних комплексів, оточуючих реакційний центр, може вказувати на зростання кількості фотосистем. Підвищений вміст хлорофілів у тютюнів є свідченням стійкості до хвороб: ВТМ, пероноспорозу, фітофторозу [40]. Якісні та кількісні зміни у фотосинтетичному апараті, очевидно, спрямовані на генерування сполук і енергії, необхідних для адаптації рослин до змінених умов існування, оскільки фотосинтез — це найчутливіша функція рослин, яка в першу чергу реагує на стресові чинники, тому склад і кількісні співвідношення продуктів фотосинтезу значно змінюються залежно від стану організму [41].

Захисне значення може мати і поява антоціанових пігментів у надземній частині рослин та зміни забарвлення квітів зі звичайного білого до фіолетового кольору, що виявлено в дослідженнях на дурмані (*D. stramonium*), і ця ознака теж спадкувалася. Зміна забарвлення віночка в дурману також нагадує явища, зумовлені переміщенням транспозонів [42].

Інша група ознак, викликана е-ДНК у рослин T_1 тютюну, — це неспецифічні реакції стійкості до канаміцину та спонтанного інфікування вірусами, присутніми в довкіллі [43]. Вона може бути свідченням індукції змін у метаболізмі, пов'язаних з адаптацією до деяких біотичних стресових чинників.

Підтвердженням впливу е-ДНК на регуляторні системи, відповідальні за адаптацію до змін у довкіллі, можуть слугувати морфологічні зміни, отримані у рослин T_1 під дією е-ДНК: редуковані стебла у проса Червона ватра (як у рослин високогір'я), дрібніше листя та звужена листкова пластинка у тютюну та маку (ксероморфна ознака), зниження висоти та поява карликових форм серед рослин усіх досліджених видів (таблиця).

Спадкові зміни в накопиченні хлорофілів, виявлені в тютюну, а також спадкові зміни габітусу рослин (зниження висоти, пригнічення апікального домінування з утворенням значної кількості бічних пагонів) нагадують комплекс спадкових змін, отриманих у мутантів тютюну з підвищеною експресією гена фітохрому А, що модулює рівень гіберелінів у тканинах провідних систем рослин [44]. Мутантам тютюну зі зниженою експресією гена фітохрому В

притаманний комплекс інших змін — апікальне домінування та вміст хлорофілів, як у мутантів *chlorina* [45]. Функціонуючі хлоропласти необхідні для становлення системної набутої стійкості у рослин. При цьому відбувається взаємодія сигнальних шляхів, індукованих світлом, із сигнальними шляхами, ініційованим фітопатогенами та опосередкованими саліциловою кислотою [46, 47], а стійкість до патогенів можна викликати, змінюючи експресію генів фітохромів [46].

Аналіз результатів наших досліджень, а також літературних даних щодо молекулярної природи явищ і процесів, на які впливають е-ДНК, може стати підгрунтям для гіпотези стосовно одного з важливих шляхів впливу е-ДНК на рослини — він реалізується шляхом зміни експресії та мутацій генів, відповідальних за розпізнавання сигналів про стан довкілля та спрямованість відповідей на ці зміни. Ключові гени сигнальних систем, очевидно, є найвідкритішими і найдоступнішими, тому й змінюються в першу чергу; вони також є точками перетину взаємодіючих сигнальних шляхів, які ініціюються фітохромами, поживними речовинами та чинниками абіотичних і біотичних стресів [48—50], що й обумовлює плейотропний ефект таких мутацій.

Нестабільність кількісної ознаки вмісту хлорофілів у тютюну (виникнення в T_1 фенотипів рослин, які за вмістом хлорофілів відрізнялися між собою в 1,4—3,7 разу, та розщеплення в поколінні T_2 відібраних рослин на форми, що різнилися за вмістом хлорофілів удвічі й більше [23, 24], а також поява в T_1 квітів з білим і мозаїчним забарвленням (рисунок)) може бути свідченням впливу е-ДНК на системи, які регулюють переміщення транспозонів. Явище активізації формотворчого процесу в рослин, який здійснюється за участі мобільних генетичних елементів, під впливом змін у довкіллі відкрито Мак-Клінток [51]. Універсальність активізації переміщень транспозонів у дрозофіли за дії різних стресових чинників (теплового шоку, хімічних мутагенів та е-ДНК вірусного походження) показано Георгієвим [52].

Значний внесок у дослідження функціонування систем регуляції геному за допомогою мобільних генетичних елементів зроблено Ратнером (вчення про блочно-модульний принцип організації геному та мобільні системи регуляції генетичної інформації) [53—55]. Важливому значенню мобільних генетичних елементів у виникненні адаптивних змін присвячено дослідження московських вчених [56, 57]. Про схожість змін генів, спричинених е-ДНК у дрозофіли, з ефектами, викликаними «дією контролюючих елементів» (виняткова локусоспецифічність, пролонгована дія та нестабільність у поколіннях), відмічалося Гершензоном, який припустив, що фрагменти е-ДНК можуть діяти як транспозони, дестабілізуючи гени реципієнта [58, 59], а згодом Александровим та Гершензоном запропоновано гіпотезу щодо механізму впливу е-ДНК за рахунок активізації переміщення транспозонів у реципієнта [60]. Участь транспозонів у виникненні спадкових змін у дрозофіли при дії е-ДНК знайшла також експериментальне підтвердження [8].

На нашу думку, заслуговує на увагу спектр змін, індукованих у дрозофіли е-ДНК: це переважно мутації, пов'язані зі зміною розмірів, форми та жилкування крил [59], які можуть мати адаптивне значення для літаючих комах. Адаптивні зміни на рослинах виявлено у наших дослідженнях, а також багатьма іншими вченими [9—12]. Отже, одним із механізмів дії екзогенних ДНК на спадкові ознаки реципієнта, дуже важливим для селекціонерів, може бути активізація під їхнім впливом систем регуляції, відповідальних за адаптацію до змін у довкіллі, яка може знаходити вираження не лише у змінах експресії найважливіших для цього генів, а також у їхніх спадкових модифікаціях.

При дії е-ДНК на рослини, використані в наших експериментах, спостерігалася поява ознак, притаманних рослинам споріднених таксонів, що може бути проявом паралельної мінливості за Вавиловим [61]. До таких змін можна віднести появу фіолетових квітів у дурману звичайного (спадкова ознака, аналогічна такій у дурману індійського), колосовидної форми чоловічих суцвіть у кукурудзи, утворення значної кількості бічних пагонів у тютюну, зменшення тривалості циклу його розвитку та зміна кольору квітів з рожевого на білий (ознаки пасльону). На нашу думку, якраз закон Вавилова є одним із найважливіших виявів формотворчого процесу в рослин, обумовленого фундаментальними властивостями систем збереження та регуляції генетичної інформації, на які вказував Ратнер [53—55].

Висновки. 1. Розроблено оригінальну технологію отримання рослин тютюну з бажаними спадковими ознаками — стійкістю до комплексного засолення грунту, скоростиглістю, підвищеною про-

Рослини зі зміненим забарвленням квітів у поколінні T_1: *а* — білі квіти рослини № 60 першого покоління з варіанту досліду 1, де застосовували комплекс ДНК пасльону та плазмід *pTi8628* і *pCAMVNEO*; *б* — мозаїчне забарвлення пелюсток рослини № 73 з варіанту досліду 3 (ДНТ *pCAMVNEO*)

дуктивністю — за допомогою е-ДНК. В результаті її застосування одержано лінії тютюну, які можуть стати основою для створення сучасних високопродуктивних сортів, стійких до комплексного засолення грунтів.

2. На основі аналізу змін, отриманих у тютюну за допомогою е-ДНК, а також змін, які спостерігали при дії е-ДНК на рослини та дрозофілу інші дослідники, запропоновано гіпотетичний механізмів впливу е-ДНК на спадковість, що реалізується шляхом впливу на регуляторні системи, які відповідають за адаптацію до змін у довкіллі і активізують переміщення транспозонів.

V. A. Katsan, A. I. Potopalsky

Exogenic DNAs may influence plant adaptation reactions to changed environment

Summary

The original technology of obtaining the tobacco plants possessing the complex of selectively useful features (accelerated development, high productivity, and resistance to complex salinization) has been elaborated, and inheritance of the physiological and biochemical peculiarities of such plants have been investigated. To get the important and selective changes of yellow-leaved tobacco Krupnolistny 20 (KR 20, Large-leaved 20) cultivar, the native and alkylated by thiophosphamide DNA of salt-tolerant nightshade (Solanum nigrum L.) and DNA of pCAMVNEO and pTi8628 plasmids have been used. The valuable advantage of such technology is the provision of a wider range of changes and larger output of changed viable plants. The changes obtained by DNA action on tobacco and other plants exploited in technology elaboration have been analysed, and possible mechanism of exogenic DNAs influence on plant heredity has been proposed.

Keywords: solanaceous plants, exogenous DNA, alkilated by thiophosphamide DNA, chlorophylls, carotene, xanthophylls, violaxanthine, luteine, salt tolerance.

В. А. Кацан, А. И. Потопальский

Экзогенные ДНК могут влиять на регуляторные системы растений, отвечающие за адаптацию к изменениям в окружающей среде

Резюме

Разработана оригинальная технология получения растений табака, обладающих комплексом селекционно ценных признаков (ускоренное развитие, повышенная продуктивность, устойчивость к комплексному засолению почвы) при помощи препаратов экзогенных ДНК (э-ДНК), изучены физиолого-биохимические особенности таких растений и их наследование. Для индуцирования желаемых изменений у желтолистного сорта табака Крупнолистный 20 использована ДНК солеустойчивой формы паслена черного Solanum nigrum L., а также ДНК плазмид pCAMVNEO и pTi8628. Важное преимущество разработанной технологии — обеспечение более широкого спектра изменений и более значительный выход измененных жизнеспособных растений. На основе анализа модификаций, обнаруженных у табака и растений модельной системы, использованных при разработке технологии, предложен гипотетический механизм влияния э-ДНК на наследственные признаки растений.

Ключевые слова: пасленовые, экзогенные ДНК, алкилированная тиофосфамидом ДНК, хлорофиллы, каротины, ксантофиллы, виолаксантин, лютеин, солеустойчивость.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Flowers T. G.* Improving crop salt tolerance // J. Exp. Bot.—2004.—55.—P. 307—319.
2. *Schoups G., Hoptmans J. W., Young C. A., Vrugt J. A., Wallender W. W., Tanji K. K.* Sustainability of irridated agriculture in the San Joaquin Valley, California // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—2005.—102.—P. 15352—15356.
3. *Потопальский А. И., Кацан В. А., Юркевич Л. Н., Ковалев В. А.* Томаты сорта Украинский солеустойчивый и перспективные линии, полученные на их основе // Овощеводство и бахчеводство.—2005.—51.—С. 168—180.
4. *Тарнавский Н. Д.* К вопросу о роли нуклеиновой кислоты при конъюгации хромосом // Докл. АН СССР.—1938.—20, № 9.—С. 721—724.
5. *Тарнавський М. Д.* До питання про роль нуклеїнової кислоти при викликанні направлених мутацій // Доп. АН УРСР.—1939.—№ 1.—С. 47—49.
6. *Гершензон С. М.* Вызывание направленных мутаций у *Drosophila melanogaster* // Докл. АН СССР.—1939.—25, № 3.—С. 224—227.
7. *Гершензон С. М., Александров Ю. М., Малюта С. С.* Мутагенное действие ДНК и вирусов у дрозофилы.—Киев: Наук. думка, 1975.—159 с.
8. *Гершензон С. М.* Избирательность мутагенного действия ДНК и других полинуклеотидов // Журн. общ. биологии.—1996.—57, № 6.—Р. 661—682.
9. *Кацан В. А., Потопальський А. І., Юркевич Л. Н.* Отримання рослин з господарсько цінними ознаками за допомогою екзогенних ДНК // Матеріали міжнар. форуму «Основи молекулярно-генетичного оздоровлення людини і довкілля» (Київ, 31 травня—1 червня 2005 р.).—Київ, 2005.—С. 84—87.
10. *Сиволап Ю. М., Образцов С. И.* Возможность генетической трансформации у высших растений // Республ. межвед. сб. «Молекулярная биология» (Киев).—1980.—Вып. 26.—С. 3—8.
11. *Картель Н. А.* Эффекты экзогенной ДНК у высших растений.—Минск: Наука и техника, 1981.—143 с.
12. *Ларченко Е. А., Моргун В. В.* Экспериментальная изменчивость кукурузы.—Киев: Наук. думка, 1993.—173 с.
13. *Космодемьянский В. Н., Рубан Э. В., Иванова Т. З.* Доминантная мутация *White*, индуцированная N-нитрозомочевиной у табака // Практика химического мутагенеза.—М.: Наука, 1971.—С. 179—183.
14. *Бучинский А. Ф.* Особенности желтолистных форм *Nicotiana tabacum* L. // Сб. работ по селекции, генетике и семеноведению табака и махорки (ВНИИТиМ).—Краснодар, 1936.—Вып. 132.—С. 37—54.
15. *Иванова Т. З.* Популятивность сортов табака по цвету и качеству // Табак.—1967.—№ 4.—С. 53—54.
16. *Шмук А. А.* Химия и технология табака.—М.: Пищепромиздат, 1953.—Т. 3.—776 с.
17. *Баранова Е. Г.* Генетические особенности наследования признаков химического состава сортов табака и использование их в селекции: Автореф. дис. ... канд. биол. наук

/ НИИ земледелия АН Армении.—Эчмиадзин, 1990.—25 с.
18. *А. с.* СССР № 1170871 Т, МКИ С 12 N 15/00, С 07 Н 21/00. Способ получения дезоксирибонуклеиновой кислоты из растительного сырья / З. Ю. Ткачук, А. И. Потопальский // Выдано 01.04.85.
19. *Волощук Т. П., Пацковский Ю. В., Потопальский А. И.* Алкилирование компонентов нуклеиновых кислот этиленимином и его производными. 4. Алкилирование гомонуклеотидов и ДНК // Биоорг. химия.—1999.—**25**, № 6.—С. 464—473.
20. *Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж.* Молекулярное клонирование.—М.: Мир, 1984.—479 с.
21. *Кокунин В. А.* Статистическая обработка данных при малом числе опытов // Укр. биохим. журн.—1975.—**47**, № 6.—С. 776—790.
22. *Плохинский Н. А.* Биометрия.—М.: Изд-во МГУ, 1970.—367 с.
23. *Потопальский А. И., Кацан В. А., Леськив М. Е.* Влияние экзогенных нативных и модифицированных нуклеиновых кислот на биосинтез фотосинтетических пигментов у *Nicotiana tabacum* L. 1. Содержание хлорофиллов и каротиноидов у растений первого поколения // Биополимеры и клетка.—1995.—**11**, № 2.—С. 88—99.
24. *Кацан В. А., Потопальский А. И.* Влияние экзогенных нативных и модифицированных нуклеиновых кислот на биосинтез фотосинтетических пигментов у *Nicotiana tabacum* L. 2. Динамика содержания хлорофиллов и каротиноидов у растений второго и третьего поколений // Биополимеры и клетка.—2000.—**16**, № 1.—С. 22—34.
25. *Кацан В. А., Потопальский А. И., Юркевич Л. Н.* Використання екзогенних ДНК для корекції програми розвитку жовтолистого мутанту *Nicotiana tabacum* L. // Фактори експериментальної еволюції організмів.—Київ: Аграрна наука, 2003.—С. 339—345.
26. *Потопальский А. И., Кацан В. А., Юркевич Л. Н.* Итоги и перспективы получения растений семейства пасленовых с помощью нативных и модифицированных ДНК // Овощеводство и бахчеводство.—2005.—**51**.—С. 181—197.
27. *Ma S., Gong Q., Bohnert H. J.* Dissecting salt stress pathways // J. Exp. Bot.—2006.—**57**.—P. 1097—1107.
28. *Wu C. A., Yang G. D., Meng Q. W., Zheng C. C.* The cotton *GhNHX1* gene encoding a novel putative tonoplast Na^+/H^+ antiporter plays an important role in salt stress // Plant Cell Physiol.—2004.—**45**.—P. 600—607.
29. *Kishor K., Hong Z., Miao G.-H., Hu C.-A. A., Verma D. P. S.* Overexpression of pyrroline-5-carboxylate synthetese increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants // Plant Physiol.—1995.—**108**.—P. 1387—1394.
30. *Holmstrom K.-O., Somersalo S., Mandal A., Palva T. E., Welin B.* Improved tolerance to salinity and low temperature in transgenic tobacco producing glycine betaine // J. Exp. Bot.—2000.—**51**.—P. 177—185.
31. *Jang I. C., Oh S. J., Seo J. S., Choi W. B., Song S. I., Kim C. H., Kim Y. S., Seo H. S., Choi Y. D., Nahm B. H., Kim J. K.* Expression of a bifunctional fusion of a *Escherichia coli* genes for tregalose-6-phosphate synthase and tregalose-6-phosphate phosphatase in transgenic rice plants increases tregalose accumulation and abiotic stress tolerance without stunting growth // Plant Physiol.—2003.—**131**.—P. 516—524.
32. *Das-Chatterjee A., Goswami L., Maitra S., Dastidar K. G., Ray S., Majumder A. L.* Introgression as a novel salt-tolerant L-myo-inositol 1-phosphate synthase from *Posterresia coarctata* (Roxb.) Tateoka (PcINO1) confers salt tolerance to evolutionary diverse organisms // FEBS Lett.—2006.—580.—P. 3980—3988.
33. *Wi S. G., Kim W. T., Park K. Y.* Overexpression of carnation S-adenosinmethionine decarboxylase gene generates a broad-spectrum tolerance to abiotic stresses in transgenic tobacco plants // Plant Cell Rep.—2006.—Epub. ahead of print.
34. *Singla-Pareek S. L., Reddy M. K., Sopory S. K.* Genetic engineering of the glyoxalase pathway in tobacco leads to enhanced salinity tolerance // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—2003.—**100**.—P. 14672—14677.
35. *Sanan-Mishra N., Pham X. H., Sopory S. K., Tuteja N.* Pea DNA helicase 45 overexpression in tobacco confers high salinity tolerance without affecting yield // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—2005.—**102**.—P. 509—514.
36. *Yen H. E., Edwards G. E., Grimes H. D.* Characterization of a salt-responsive 24-kilodalton glycoprotein in *Mesembryanthemum crystallinum* // Plant Physiol.—1994.—**105**.—P. 1179—1187.
37. *Yamasato A., Nagata N., Tanaka R., Tanaka A.* The N-terminal domain of chlorophyllide a oxygenase confers protein instability in response to chlorophyll *b* accumulation in *Arabidopsis* // Plant Cell.—2005.—**17**.—P. 1585—1597.
38. *Pogson B., McDonald K., Tround M., Britton G., DellaPenna D. Arabidopsis* carotenoid mutants demonstrate that lutein is not essential for photosynthesis in higher plants // Plant Cell.—1996.—**8**.—P. 1627—1639.
39. *Gonzalez-Guzman M., Abia D., Salinas J., Serrano L., Rodriguez P. L.* Two alleles of the abscisic oxygenase 3 gene reveals its role in abscisic acid biosynthesis in seeds // Plant Physiol.—2004.—**135**.—P. 325—333.
40. *Espino E., Xiomara R., Garsia V., Garsia Y. H., Habana P. R.* Nueva variaded de tabaco negro (*Nicotiana tabacum*) con resistancia multiple y buenas caracteristicas comerciales // Agrotech. Cuba.—1989.—**2**.—P. 9—13.
41. *Энергетические* аспекты устойчивости растений / Под ред. И. А. Тарчевского.—Казань: Изд-во Казан. ун-та, 1986.—140 с.
42. *Хесин Р. Б.* Непостоянство генома.—М.: Наука, 1984.—472 с.
43. *Кацан В. А., Потопальский А. И., Леськив М. Е.* Устойчивость к канамицину растений табака при воздействии препаратов ДНК на семена // Биополимеры и клетка.—1996.—**12**, № 2.—С. 47—55.
44. *Jordan E. T., Hatfield P. M., Hondrid D., Talon M., Zeevart A. D., Viestra R. D.* Phytochrome A overexpression in transgenic tobacco // Plant Physiol.—1995.—**107**.—P. 797—805.
45. *Peng J., Harberd N. P.* Gibberellin deficiency and response mutations suppress the stem elongation phenotype and phytochrome-deficient mutants of *Arabidopsis* // Plant Physiol.—1997.—**113**.—P. 1051—1058.
46. *Genoud T., Buchala A. J., Chua N. H., Metaux J. P.* Phytochrome signalling modulates the SA-perceptive pathway in *Arabidopsis* // Plant J.—2002.—**31**.—P. 87—95.
47. *Zeiter J., Pink B., Mueller B. J., Berger S.* Light conditions influence specific defence responses in incopatible plant-pathogen interactions: uncoupling systemic resistance from salicylic acid and PR-1 accumulation // Planta.—2004.—**219**.—P. 673—683.
48. *Buchanan-Wollaston V., Page T., Harrison E., Breeze E., Lim P. O., Nam H. G., Lin J.-F., Wu S.-H., Swidzinski J., Ishizaki K., Leaver C.* Comparative transcriptome analysis reveals significant differences in gene expression and signalling

pathways between developmental and dark/starvation induced senescence in *Arabidopsis* // Plant J.—2005.—42.—P. 567—585.

49. *Gibson S. I.* Sugar and phytochrome response pathways: navigating a signalling network // J. Exp. Bot.—2004.—55.—P. 253—264.
50. *Monte E., Alonso J. M., Ecker J. R., Zhang Y., Li X., Young J., Austin-Philips S., Quail P. H.* Isolation and characterization of *phyC* mutants in *Arabidopsis* reveals complex crosstalk between phytochrome signalling pathways // Plant Cell.—2003.—15.—P. 1962—1980.
51. *McClintock B.* The significance of responses of the genome to challenge // Science.—1984.—226.—P. 792—801.
52. *Георгиев П. Г.* Роль мобильных генетических элементов в мутагенезе, индуцированном химическими и физическими агентами: Автореф. дис. ... канд. биол. наук / Институт молекулярной биологии им. Н. Г. Энгельгардта.—Москва, 1991.—23 с.
53. *Ратнер В. А.* Блочно-модульный принцип организации и эволюции молекулярно-генетических систем управления (МГСУ) // Генетика.—1992.—28, № 2.—С. 5—24.
54. *Ратнер В. А., Васильева Л. А.* Роль мобильных генетических элементов в микроэволюции // Генетика.—1992.—28, № 12.—С. 5—17.
55. *Ратнер В. А., Васильева Л. А.* Критические ограничения геномной системы мобильных генетических элементов (МГЭ) // Генетика.—1994.—30, № 5.—С. 593—599.
56. *Гвоздев В. А., Кайданов Л. З.* Системные изменения локализации мобильных элементов в геноме *Drosophila melanogaster*, сопровождающие процессы селекции // Молекулярные механизмы генетических процессов.—М.: Наука, 1990.—С. 26—36.
57. *Беляева Е. С., Пасюкова Е. Г., Гвоздев В. А.* «Адаптивные транспозиции» ретротранспозонов в геноме *Drosophila melanogaster*, сопровождающиеся увеличением приспособленности особей // Генетика.—1994.—30, № 6.—С. 725—730.
58. *Гершензон С. М.* Мутагенное действие ДНК и проблема направленных мутаций // Генетика.—1966.—№ 5.—С. 3—15.
59. *Гершензон С. М.* Мутагенное действие ДНК, инсерции, транспозиции и нестабильные гены // Генетика и благосостояние человечества: Тр. XV Междунар. генет. конгр.—М.: Наука, 1981.—С. 304—318.
60. *Гершензон С. М., Александров Ю. М.* Мутагенное действие природных и синтетических полинуклеотидов и проблемы направленных мутаций // Журн. общ. биологии.—1982.—43, № 6.—С. 747—763.
61. *Вавилов Н. И.* Закон гомологических рядов в наследственной изменчивости.—Ленинград: Наука, 1987.—260 с.

УДК 575.224:577.113
Надійшла до редакції 19.06.06