

Д. М. Майданюк, І. О. Андрєєв, К. В. Спірідонова,
член-кореспондент НАН України В. А. Кунах

Низька геномна мінливість в культурі *in vitro* лінії кукурудзи Black Mexican Sweet Corn C456

An analysis of callus tissues of maize Black Mexican Sweet Corn C456 line was performed through RAPD-PCR. 275 amplicons were scored, and only 2 of them were polymorphic. The polymorphic fragments revealed a variability among the plants as well as between the plants and their calluses, that may allow one to assume the existence of "hot spots" with higher variability in maize genome. Blot-hybridization of one polymorphic RAPD-amplicon demonstrated the presence of its sequence in genomes of all objects under study, so the revealed changes are most likely related to considerable differences in the amounts of PCR products. The obtained results suggest the low level of genome variability in maize tissue culture.

Вирощування тканин рослин *in vitro* може індукувати мінливість клітинних ліній та рослин-регенерантів за морфологічними, біохімічними та генетичними ознаками, яка отримала назву соматональної варіабельності [1]. Раніше нами було проведено дослідження геномної мінливості в калюсних культурах, отриманих з незрілих зародків кукурудзи лінії Black Mexican Sweet Corn C456 (далі C456) [2]. Однак інтерпретація результатів роботи була ускладнена можливою генетичною гетерогенністю матеріалу, використаного в ролі експлантатів для отримання культури тканин. Зокрема, було незрозумілим, якою мірою виявлений поліморфізм обумовлений генетичними змінами в культурі *in vitro*, а якою — внутрішньолінійною гетерогенністю дослідженої лінії за використаними RAPD-маркерами. Тому метою даного дослідження було вивчення геномної мінливості в культивованих тканинах, отриманих від індивідуальних рослин кукурудзи лінії C456, та залежності рівня мінливості від тривалості вирощування тканин *in vitro*.

Досліджено калюсні тканини, експлантатами для отримання яких були тканини однододобових проростків двох індивідуальних рослин (насіння отримане з Maize Genetics Cooperative Stock Center, США, Урбана). Склад живильного середовища, метод виділення ДНК, умови проведення ПЛР та електрофоретичного розділення продуктів ПЛР були такими ж, як і в роботі [2]. Блотинг за Саузерном проводили методом капілярного перенесення за [3]. Поліморфні амплікони виділяли з гелів шляхом адсорбції на силікагелі за допомогою набору "DNA extraction kit" ("Fermentas", Литва). Зонди для блот-гібридизації мітили [α - 32 P]-dCTP ("GE Healthcare", Великобританія) методом розсіяної затравки, гібридизацію проводили в стандартних умовах [3].

Аналіз ДНК інтактних рослин і отриманих від них калюсних тканин різного терміну культивування (4, 7, 12 міс.) проводили методом RAPD-ПЛР. Використано 40 десяти-нуклеотидних праймерів (табл. 1), які раніше успішно застосовували для аналізу геномної мінливості у кукурудзи [2, 4]. ПЛР з усіма праймерами давала чіткі амплікони, кількість яких варіювала від 3 до 14. Загалом було враховано 275 RAPD-ампліконів, з яких поліморфними виявилися лише 2 (0,73%). Поліморфізм спектрів продуктів ПЛР в калюсних тканинах виявлено лише для одного праймера — А-01 (рис. 1, верхня панель). Зокрема, у спектрі рослини № 2 спостерігали амплікон завдовжки ~ 370 п. н., відсутній у спектрах

калюсних тканин цієї рослини. У спектрі рослини № 1 даний фрагмент не виявлено, але він був присутній у 4-місячній калюсній тканині і зникав при подальшому культивуванні. Інший поліморфний амплікон мав розмір ~ 1300 п. н. У калюсних тканинах рослини № 1 віком 12 міс. його кількість помітно знижувалася, а у випадку калюсів рослини № 2, у спектрі продуктів ПЛР якої він не спостерігався, — навпаки, значно зростала, починаючи вже з 4 міс. культивування.

Фрагмент завдовжки ~ 370 п. н., ампліфікований з ДНК інтактної рослини № 2, використовували як зонд для блот-гібридизації із спектрами RAPD-продуктів інтактних рослин та їх калюсних тканин, отриманих з праймером А-01 (див. рис. 1). За результатами гібридизації встановлено, що послідовності, гомологічні даному фрагменту, наявні в усіх спектрах, навіть там, де вони не виявлялися після забарвлення бромистим етидієм (див. рис. 1, нижня панель). Це свідчить про присутність амплікованої послідовності в геномі всіх об'єктів, а також про те, що відмінності, виявлені RAPD-ПЛР, можуть бути обумовлені змінами її кількісного вмісту в геномі або різною ефективністю її ампліфікації.

У цілому отримані результати свідчать про низьку геномну мінливість лінії кукурудзи С456. Проведена блот-гібридизація показала, що виявлений поліморфізм спричинений не появою або зникненням ампліконів у спектрах ПЛР-продуктів, а зміною кількості певних фрагментів. Слід зазначити, що поліморфні фрагменти виявляли варіабельність як між рослинами, так і між рослинами та їхніми калюсами. При цьому їх зміни мали різну спрямованість у спектрах калюсних тканин різних рослин. Пояснити такі зміни можна наявністю в геномі “гарячих точок”, які характеризуються підвищеною мінливістю. Існування локусів з підвищеною частотою мутацій у культурі *in vitro* показано також іншими дослідниками

Таблиця 1. Праймери, використані для RAPD-аналізу рослин і культивованих тканин кукурудзи лінії С456, та кількість їх ПЛР-продуктів

№ п/п	Назва праймера	Послідовність нуклеотидів (5'-3')	Кількість ампліконів	№ п/п	Назва праймера	Послідовність нуклеотидів (5'-3')	Кількість ампліконів
1	A-01	CAG-GCC-CTT-C	8	22	B-01	GTT-TCG-CTC-C	7
2	A-02	TGC-CGA-GCT-G	6	23	B-02	TGA-TCC-CTG-G	3
3	A-03	AGT-CAG-CCA-C	5	24	B-04	GGA-CTG-GAG-T	10
4	A-04	AAT-CGG-GCT-G	7	25	B-05	TGC-GCC-CTT-C	6
5	A-05	AGG-GGT-CTT-G	8	26	B-06	TGC-TCT-GCC-C	10
6	A-07	GAA-ACG-GGT-G	4	27	B-07	GGT-GAC-GCA-G	8
7	A-08	GTG-ACG-TAG-G	7	28	B-08	GTC-CAC-ACG-G	8
8	A-09	GGG-TAA-CGC-C	6	29	B-10	CTG-CTG-GGA-C	4
9	A-10	GTG-ATC-GCA-G	5	30	B-18	CCA-CAG-CAG-T	4
10	A-11	CAA-TCG-CCG-T	7	31	G-01	CCT-GTT-AGC-C	3
11	A-12	ATC-GCA-CAC-T	8	32	M-06	CTG-GGC-AAC-T	5
12	A-13	CAG-CAC-CCA-C	4	33	M-07	CCG-TGA-CTC-A	11
13	A-14	TCT-GTG-CTG-G	6	34	M-14	AGG-GTC-GTT-C	10
14	A-16	AGC-CAG-CGA-A	9	35	OPA-02	TGC-CGA-GCT-G	12
15	A-17	GAC-CGC-TTG-T	3	36	QR-01	CGG-TCA-CTG-T	10
16	A-18	AGG-TGA-CCG-T	5	37	QR-05	CGG-CCC-CGG-C	7
17	A-19	CAA-ACG-TCG-G	14	38	340	GAG-AGG-CAC-C	7
18	A-20	GTT-GCG-ATC-C	7	39	450	CGG-AGA-GCC-C	9
19	Ag-01	AGG-TCA-CTG-A	5	40	474	AGG-CGG-GAA-C	6
20	АН-29	TGG-TGA-CTG-A	6				
21	АН-30	TGG-TCA-CTG-T	5			Загалом	275

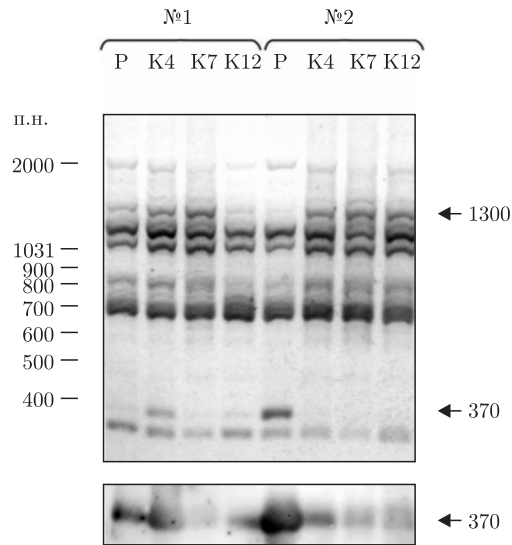


Рис. 1. Зміни поліморфних ампліконів у культурі тканин лінії кукурудзи Black Mexican Sweet Corn C456. Верхня панель — результати електрофоретичного розділення продуктів ампліфікації ДНК рослин (P) № 1 і № 2 та їх культивованих тканин віком 4, 7, 12 міс. (K4, K7, K12 відповідно), отриманих з праймером А-01. Нижня панель — блот-гібридизація за Саузерном з поліморфним ампліконом завдовжки ~ 370 п. н. Поліморфні фрагменти позначені стрілками із зазначенням довжини (п. н.)

для жита і рису [5, 6]. На нашу думку, не випадкові зміни геномних послідовностей можуть бути обумовлені активацією мобільних генетичних елементів. Відомо, що культивування рослинних тканин *in vitro* є стресовим фактором, який стимулює підвищення активності мобільних генетичних елементів [7–9]. При цьому деякі з них, а саме ретротранспозони, можуть збільшувати свою кількість і переміщатися в нові локуси шляхом РНК-опосередкованої транспозиції [10].

Таким чином, проведений RAPD-аналіз продемонстрував низьку геномну мінливість кукурудзи лінії Black Mexican Sweet Corn C456 в культурі тканин *in vitro* при вирощуванні протягом 12 міс.

Автори висловлюють щирю вдячність *д-ру Martin M. Sachs, директору Maize Genetics Cooperative Stock Center (США, Урбана)* за люб'язно надане насіння кукурудзи лінії Black Mexican Sweet Corn C456.

1. Larkin P. J., Scowcroft W. R. Somaclonal variation – a novel source of variability from cell cultures for plant improvement // *Theor. and Appl. Genet.* – 1981. – **60**. – P. 167–214.
2. Майданюк Д. Н., Андреев И. О., Спиридонова Е. В., Чеченева Т. Н., Кунах В. А. Геномная изменчивость линии кукурузы Black Mexican Sweet Corn C456 в культуре *in vitro*: результаты RAPD-анализа // *Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів.* – 2006. – **4**, № 1. – С. 58–67.
3. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. – Москва: Мир, 1984. – 480 с.
4. Осипова Е. С., Ковеза О. В., Трошцкий А. В. и др. Выявление специфических фрагментов у соматоклонов кукурузы и создание на их основе SCAR-маркеров // *Генетика.* – 2003. – **39**, № 12. – С. 1664–1672.
5. Linacero R., Freitas Alves E., Vázquez A. M. Hot spots of DNA instability revealed through the study of somaclonal variation in rye // *Theor. and Appl. Genet.* – 2000. – **100**. – P. 506–511.
6. Xie Q. J., Oard J. H., Rush M. C. Genetic analysis of a purple-red hull rice mutation derived from tissue culture // *J. Hered.* – 1995. – **86**. – P. 154–156.
7. Hirochika H., Sugimoto K., Otsuki Y. et al. Retrotransposons of rice involved in mutations induced by tissue culture // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* – 1996. – **93**. – P. 7783–7788.

8. Kikuchi K., Terauchi K., Wada M., Hirano H. The plant MITE mPing is mobilized in another culture // Nature. – 2003. – **421**. – P. 167–170.
9. Alves E., Ballesteros I., Linacero R., Vázquez A. M. RYS1, a foldback transposon, is activated by tissue culture and shows preferential insertion points into the rye genome // Theor. and Appl. Genet. – 2005. – **111**. – P. 431–436.
10. Sabot F., Schulman A. H. Parasitism and the retrotransposon life cycle in plants: a hitchhiker's guide to the genome // Heredity. – 2006. – **97**. – P. 381–388.

Інститут молекулярної біології
і генетики НАН України, Київ

Надійшло до редакції 27.06.2007

УДК 577.3

© 2008

М. В. Нецветов, П. К. Хиженков, А. П. Энглези

Влияние магнитных полей 1,5–50 Гц на концентрацию ионов кальция и магния в головном мозге мышей

(Представлено академиком НАН Украины П. Г. Костюком)

The goal of our research was to determine the influence of low magnetic fields on the concentration of Ca^{2+} and Mg^{2+} ions in the brain tissue of experimental mice. During the experiment, one group of animals was kept intact (group 1), another one drank MgSO_4 10% solutions instead of water (group 2) or CaCl_2 10% solution (group 3), and the fourth one was with experimental brain injury and drank water (group 4). All of them were treated with magnetic fields $H = 30$ Oe and different low frequencies. Control animal groups were observed out of the magnetic field. The effect of magnetic fields on intact mice varies, by depending on the frequency. The dependence of $[\text{Ca}^{2+}]$ on the field frequency doesn't alter much. But the dependence of $[\text{Mg}^{2+}]$ on the frequency is different under different experimental conditions.

В последнее время у нейробиологов возрастает интерес к магнитным полям (МП), что обусловлено несколькими причинами. Во-первых, выяснена их экологическая значимость. Причем в первую очередь необходимо отметить естественные геомагнитные вариации, так как они присутствуют в биосфере с начала ее существования и являются в прямом смысле информационным носителем для живых организмов [1]. Диапазон наиболее значимых в экологическом смысле электромагнитных колебаний лежит в области сверхнизких частот [2]. Это значит, что именно в этом диапазоне следует искать реакции на электромагнитные поля, которые могут лежать в основе электромагнитного импринтинга [2, 3] или вызывать отклонения в развитии нервной системы, приводящие в онтогенезе к психическим и психосоматическим заболеваниям.

Во-вторых, очевидны перспективы применения МП в клинической медицине, так как оно свободно проникает сквозь биологические ткани и относится к неинвазивным средствам. Сильные (около 1,5 кЭ) МП, применяемые при транскраниальной магнитной стимуляции и магнитосудорожной терапии, используются в психиатрии. Результаты исследования эффектов переменных МП меньшей напряженности часто оказываются противоречивыми и неоднозначными (см., напр., [4–6]). Однако, опираясь на них, можно отметить,