

26. Тихонова И.Н. Род *Viola* L. Северного Кавказа (биология, экология, распространение): автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Ставрополь, 2007. – 20 с.
27. Леванцова Я.В. Род *Stipa* L. во флоре Северного Кавказа и Северо-Западного Закавказья: автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Астрахань, 2009. – 21 с.
28. Сотникова И.Ю. Флора лекарственных растений Ставропольского края и её анализ: автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Ставрополь, 2006. – 23 с.
29. Маренчук Ю.А., Дударь Ю.А. Антропофиты Ставрополья (проблема, кадастр, понятийный аппарат). – Ставрополь: Изд-во СГУ, 2007. – 198 с.
30. Иванов А.Л. Флора Предкавказья и ее генезис. – Ставрополь: Изд-во СГУ, 1998. – 204 с.
31. Толмачёв А.И. Введение в географию растений. – Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1974. – 224 с.
32. Толмачёв А.И. Методы сравнительной флористики и проблемы флогогенеза. – Новосибирск: Наука, 1986. – 195с.
33. Портениер Н.Н. Флора бассейна реки Черек Безенгийский (Центральный Кавказ): автореф. дис. ... канд. биол. наук. – СПб., 1992. – 16 с.
34. Галушко А.И. Анализ флоры западной части Центрального Кавказа // Флора Северного Кавказа и вопросы её истории. – Ставрополь, 1976. – Вып. 1. – С. 5–130.



УДК 581.1

А.П. Тюнин, Л.С. Лауве, К.В. Киселев

ВЛИЯНИЕ 5-АЗАЦИТИДИНА НА КАРИОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ В КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУРАХ ВИНОГРАДА АМУРСКОГО (*VITIS AMURENSIS*)^{*}

В данной статье с использованием кариологических показателей была дана оценка влиянию ДНК-деметилирующего агента 5-азацитидина (5A) на клеточную культуру винограда амурского *Vitis amurensis Rupr.* В результате обработки 5A в различных концентрациях изучаемой культуры было отмечено увеличение хромосомной вариабельности и уменьшение ядерно-ядрышкового отношения, что свидетельствует об активации биосинтеза белка в клетках.

Ключевые слова: 5-азацитидин, цитозиновое метилирование ДНК, виноград амурский (*Vitis amurensis*), кариологические показатели.

A.P.Tyunin, L.S. Lauve, K.V.Kiselyov

THE INFLUENCE OF 5-AZACITIDINE ON AMUR GRAPES (*VITIS AMURENSIS*) CELLULAR CULTURE KARYOLOGICAL INDICATORS

The influence of 5-azacitidine (5A) DNA-demethylation agent on Amur grapes (*Vitis amurensis Rupr*) cellular culture with the help of karyological indicators is described in the article. The chromosomal variability increase and the kernel relation reduction as the result of 5A processing in various studied culture concentrations are determined. These processes testify the cells protein biosynthesis activation.

Key words: 5-azacitidine, cytosine DNA methylation, *Vitis amurensis*, karyological indicators.

Введение. Роль цитозинового метилирования жизнедеятельности живых систем является наиболее интригующей темой последних десятилетий. Однако множество белых пятен остается в общей картине, характеризующей метилирование ДНК у растений. Благодаря исследованиям последних лет, установлено, что цитозиновое метилирование ДНК у растений выполняет функции, связанные с защитой и поддержанием стабильности генома, осуществляет контроль экспрессии генов на всех стадиях развития растения, играет важную роль в апоптозе растительных клеток [1]. Являясь ковалентной пострепликативной модификацией

* Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (10-04-00189-а) и Дальневосточного отделения Российской академии наук (12-III-B-06-053).

ДНК, метилирование относится к эпигенетическим факторам, контролирующими множество аспектов клеточного метаболизма.

На данный момент для растений установлено три основных семейства ДНК-метилтрансфераз (метилаз): Met, CMT, DRM [2]. Функция данных ферментов заключается в переносе метильной группы с молекулы S-аденозилметионина на атом углерода, находящийся в пятом положении в составе пуринового кольца цитозина. При этом представители каждого из семейств метилаз метилируют цитозин, находящийся в составе определенного сайта метилирования: CG, CHG, CHN (где H – A, T, C) [3]. Метилазы выполняют свою функцию в составе белковых комплексов, при этом белки-партнёры в большинстве случаев индивидуальны для представителей конкретного семейства метилаз [2]. Деметилирование ДНК в клетке также может осуществляться энзиматически – ферментами, относящимися к классу ДНК-гликозилаз [4]. Установлено, что представители данного класса способны разрывать связь между метилированным азотистым основанием цитозина и дезоксирибозным остатком нуклеотида в составе цепи ДНК. Образовавшийся дефект в составе полинуклеотидной цепи затем восстанавливается ферментами системы репарации ДНК. Кроме этого, для растений отмечен феномен пассивного деметилирования, когда по неустановленным причинам паттерн метилирования не копируется с материнской на дочернюю цепь ДНК при репликации, и, таким образом, метилирование в конкретном локусе не наследуется [5].

Деметилирование цитозиновых нуклеотидов также может быть вызвано действием различных химических соединений. Наиболее известным веществом, способным индуцировать деметилирование полинуклеотидной цепи ДНК в составе генома, является 5-азацитидин (5A). Попадая в клетку, 5A эффективно блокирует метилирование цитозиновых нуклеотидов, при этом действуя неспецифично. Действие 5A нашло применение в сельском хозяйстве, где он используется для увеличения белковости зерновок пшеницы [6], а также для получения крупнозерных форм кукурузы [7]. Эти исследования носят частный характер. С этой точки зрения представленная работа является комплексной. В нашем исследовании использованы методы, с помощью которых влияние индуцированного деметилирования фиксируется не по структурным перестройкам кариотипа, а по изменениям функциональной активности генома клетки.

Представители семейства Vitaceae (Виноградные), и в частности характерный для Приморского края России виноград амурский – *Vitis amurensis*, относятся к ценным сельскохозяйственным растениям, которые являются одними из древнейших, возделываемых человеком. В настоящее время в завершающей стадии находится проект полногеномного секвенирования модельного вида *Vitis vinifera*, близкородственного изучаемому в данной статье *V. amurensis* [8]. Кроме того, представители данного семейства являются одними из главных источников стильбенов – низкомолекулярных фенольных соединений, обладающих широким спектром применения в фармакологии. Все вышеописанное явилось основанием для проведенного исследования.

Цель работы. Изучение влияния ДНК-деметилирующего агента 5A на клеточную культуру *V. amurensis* с использованием кариологических показателей. Проведен анализ хромосомной вариабельности и ядерно-ядрышкового отношения под действием 5A.

Материалы и методы исследований. Каллусные культуры клеток *V. amurensis*. Для исследования влияния 5A на клетки *V. amurensis* использовалась культура клеток V2, которая была получена сотрудниками лаборатории биотехнологии Биологического почвенного института ДВО РАН в 2004 году из молодых стеблей лианы *V. amurensis* [9]. Каллусы представляют собой рыхлую активно растущую гомогенную ткань, не проявляющую тенденции к дифференциации.

Культивация клеточных культур осуществлялась в стандартных химических пробирках объемом 15 мл на твердой среде W_{Б/А} [10], содержащей 2 мг/л БАП и 0,5 мг/л АНУ, в темноте при 24–25°C с периодом субкультивации 35 дней [9, 10].

Компоненты питательных сред. Компоненты питательных сред и 5A получены из ICN Biomedicals, США. Водные растворы 5A добавляли в питательные среды в двух концентрациях: 20 и 50 мкМ (в расчете на 15 мл инкубационной среды), при этом деметилирующий агент был введен в агаризованные питательные среды после автоклавирования.

Кариологический анализ. Для кариологического анализа использовались стандартные методики, модифицированные применительно к данному объекту [11, 12]. Небольшие кусочки (объемом 0,5–1 мл) обрабатывали 0,2%-м раствором колхицина в течение 2 ч. В качестве фиксатора использовали уксуснокислый алкоголь (1:3). Перед окрашиванием материал протравливали 4%-ми железоаммонийными квасцами. В качестве красителя использовали ацетогематоксилин. Ядрышки окрашивали 50%-м раствором азотнокислого серебра при 42–45°C в течение 6–7 ч. В ацетогематоксилине материал выдерживали в течение 12–24 ч при комнатной температуре. Окрашенный материал помещали на предметное стекло в каплю насыщенного раствора хлорал-

гидрата, накрывали покровным стеклом и готовили давленый препарат. Далее препарат накрывали фильтровальной бумагой и притирали покровное стекло к предметному обратной стороной пинцета до появления колец Ньютона. Готовые препараты предварительно просматривали под микроскопом Leica DMLS (Leica Microsystems, Germany), а затем фотографировали в масляной иммерсионной системе под микроскопом Axioskop-40 с помощью встроенной видеокамеры AxioCam HRc (Zeiss, Germany). Определяли показатели, которые характеризуют ядрышковую активность: число клеток с разным числом ядрышек, среднее число ядрышек на клетку, диаметр (площадь) ядрышка и размер ядрышек на всю клетку (суммарный показатель), ядерно-ядрышковое отношение (отношение площади ядра к суммарной площади ядрышек в этом ядре).

Статистический анализ. Статистическую обработку результатов проводили при помощи программы Statistica, версия 10.0. Все данные представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка. Полученные данные проверены по спаренному критерию Стьюдента. Уровень значимости в 0.05 был выбран как минимальное значение статистической разницы во всех экспериментах.

Результаты и их обсуждение. Добавление в питательные среды 5A в концентрациях 20 мкМ и 50 мкМ вызвало снижение прироста биомассы в 1,3 и 1,7 раза соответственно (табл. 1). Наряду со снижением прироста биомассы в данных клеточных линиях обнаружены некрозы, нехарактерные для клеток контрольной линии. Согласно литературным источникам [13], эпимутаген 5A обладает сильным цитотоксическим эффектом, поэтому значительное снижение прироста сырой биомассы свидетельствует о том, что концентрация 50 мкМ 5A является критической для культуры V2.

Таблица 1

**Прирост сырой биомассы в контрольной группе каллусов V2 и при обработке 5A
в концентрациях 20 мкМ (V2-20) и 50 мкМ (V2-50)**

Клеточная линия	Сырая биомасса (г/л)	Сухая биомасса (г/л)
V2-k	175,1 \pm 22,1	6,4 \pm 0,6
V2-20	138,5 \pm 11,7	6,2 \pm 0,4
V2-50	102,9 \pm 19,3	6,1 \pm 0,5

Для клеток растения *V. amurensis* установлено число хромосом $2n=38$ [14]. Анализ хромосомной вариабельности показал, что для контрольной группы клеток культуры V2 свойственна хромосомная мозаичность, что характерно для клеточных культур многих растений [15, 16]. Число хромосом для делящихся клеток контрольной линии каллусов колеблется от 18 до 48 (рис. 1). При этом модальный класс общей выборки будут составлять клетки, имеющие хромосомный набор $2n=38-42$. Добавление деметилирующего агента в питательные среды значительно влияет на количество хромосом. При добавлении 20 мкМ 5A число хромосом в делящихся клетках составляет от 18 до 100 (рис. 1). Данная тенденция на увеличение максимального числа хромосом сохраняется при добавлении 50 мкМ 5A, в этом случае число хромосом колеблется от 18 до 106 (рис. 1). Таким образом, показано что обработка 5A значительно увеличивает число хромосом. Причиной такого влияния считается деметилирование локусов локализованных в центромерных областях хромосом, что в свою очередь ведет к нарушению расхождения хромосом при митозе [17]. При этом количество ядрышкообразующих хромосом не возрастает, о чем свидетельствуют результаты анализа максимального числа ядрышек.

Анализ числа ядрышек в интерфазных ядрах клеток контрольной группы каллусов V2 выявил, что число ядрышек в клетке колеблется от 1 до 5 (рис. 2). При этом процент клеток с одним ядрышком составляет 60,7% от общего числа проанализированных клеток, с двумя ядрышками – 24,0%, с тремя – 11,3, и по 2,0% приходится на долю клеток с 4 и 5 ядрышками. При добавлении 20 мкМ 5A в культивационные среды максимальное число ядрышек в клетке сокращается и находится в пределах от 1 до 4 (рис. 2). При этом процент клеток с одним ядрышком повышается до 74,5%, а 19,0, 4,5 и 2,0% приходится на долю клеток с 2, 3 и 4 ядрышками соответственно. При добавлении 5A в культивационные среды в концентрации 50 мкМ отмечено дальнейшее снижение максимального числа ядрышек на клетку (рис. 2). Таким образом, 82,1% от общего числа проанализированных клеток имеет одно ядрышко, 16,1% клеток – два ядрышка и 1,8% клеток – по три ядрышка. Для контрольной группы клеток можно предположить функционирование 2–3 пар нуклеолярных хромосом. При добавлении 5A в культивационные среды, исходя из данных о максимальном количестве ядрышек в клетке, имеются основания предположить функционирование 2 пар нуклеолярных хромосом.

Данный результат поддерживает гипотезу о том, что при обработке 5А количество хромосом в клетках увеличивается за счет нерасхождения некоторых пар гомологичных хромосом при митозе, а не за счет геномной дупликации.

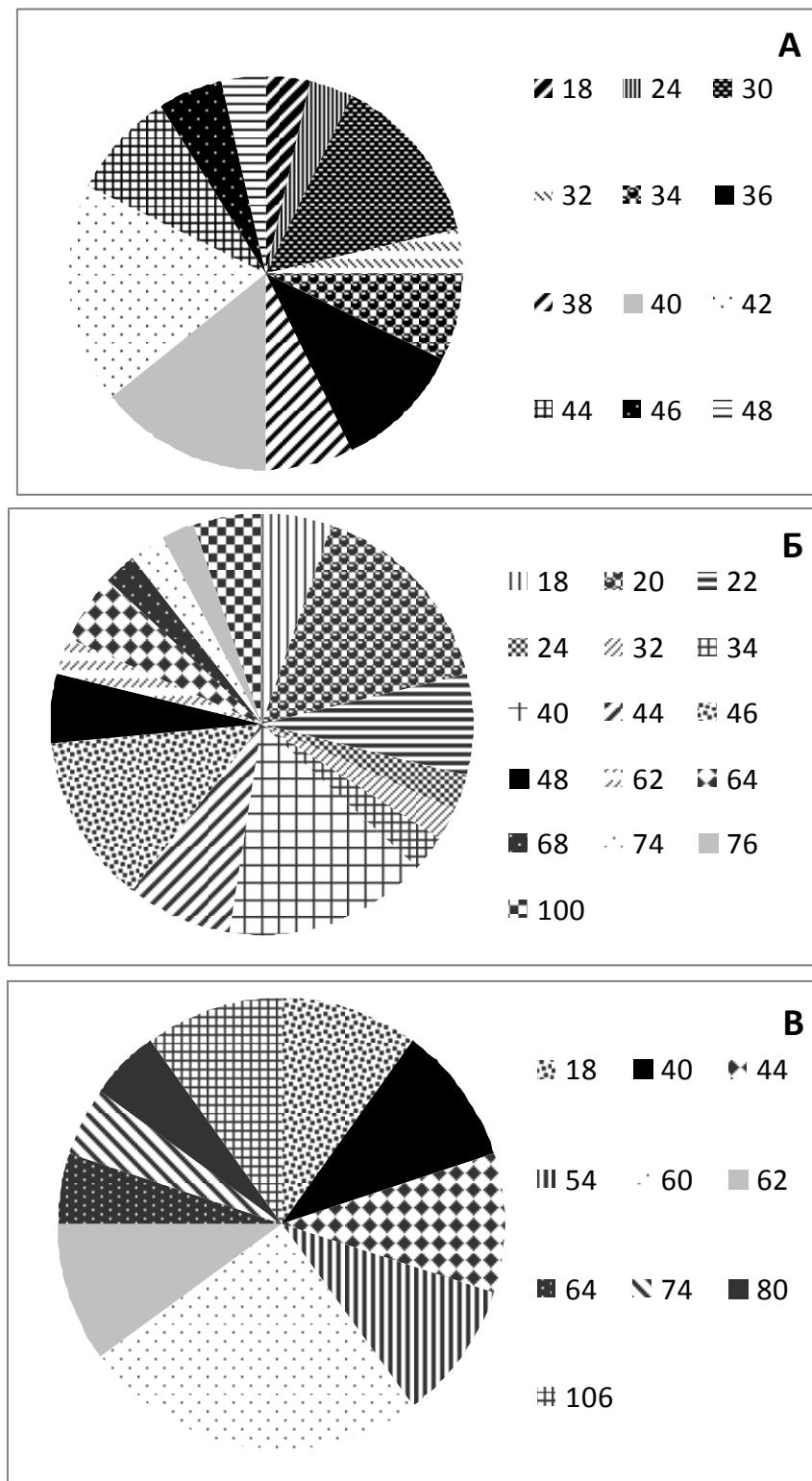


Рис. 1. Встречаемость клеток с различными числами хромосом в контрольной группе каллусов V2 (А), в каллусах V2, обработанных 20 мкМ (Б) и 50 мкМ 5А (В). Цифрами обозначены хромосомные числа

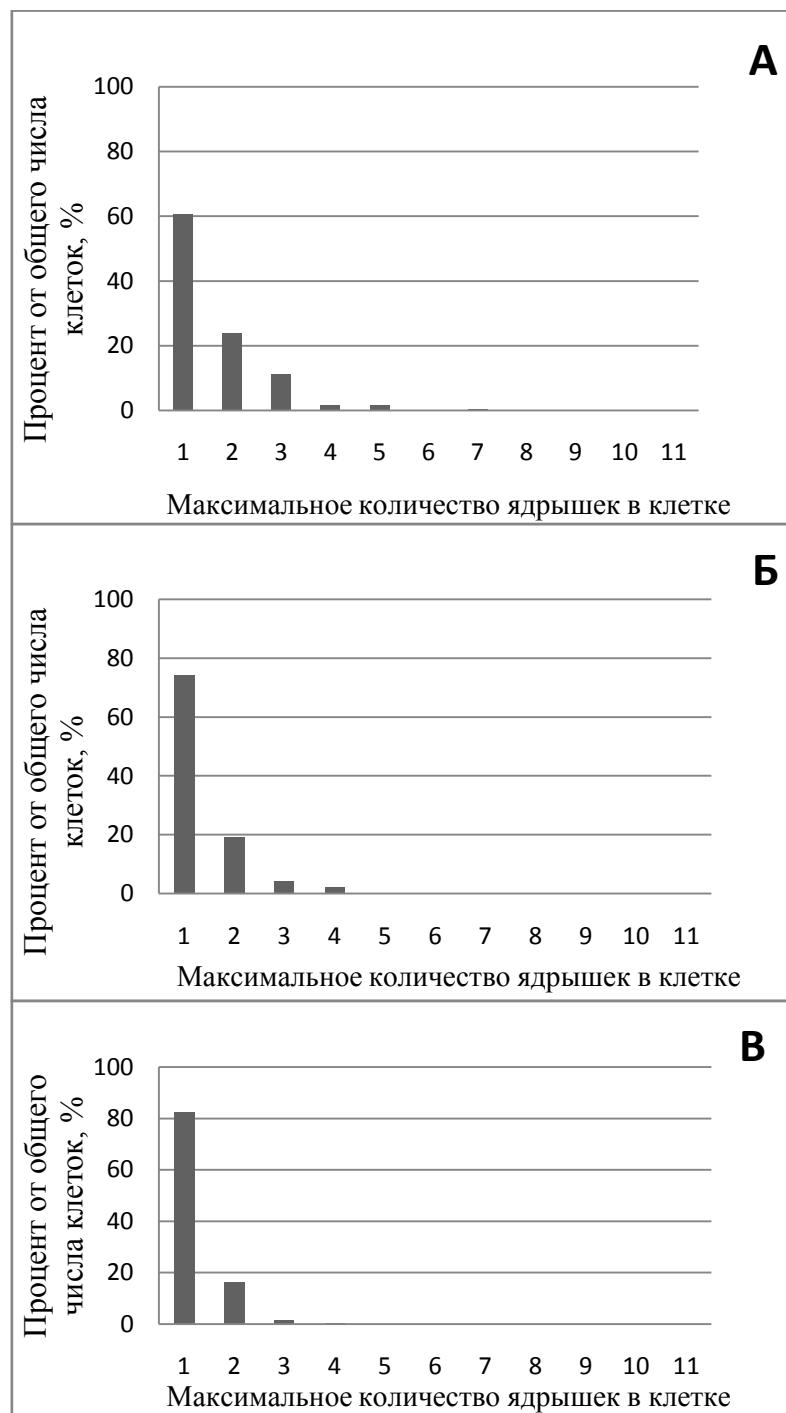


Рис. 2. Максимальное количество ядрышек в клетках в процентном отношении от общего числа клеток:
А – контрольная группа каллусов V2; Б – каллусы V2, обработанные 20 мкМ 5А; В – каллусы V2, обработанные 50 мкМ 5А

Объективным показателем активности белоксинтезирующей системы является ядерно-ядрышковое отношение [18]. Уменьшение ядерно-ядрышкового отношения свидетельствует о возрастании размера ядрышка в ядре и усилении биосинтетических процессов в клетке. Согласно проведенному исследованию, действие деметилирующего агента 5А значительно влияет на этот параметр в клетках культуры V2 (табл. 2). Максимального значения параметр ядерно-ядрышкового отношения достигает в клетках контрольной группы – $15,59 \pm 1,77$. Обработка клеток культуры V2 деметилирующим агентом в концентрации 20 мкМ снижает этот показатель в 1,4 раза, и дальнейшая обработка большей концентрацией 5А существенно не влияет на этот параметр (табл. 2). Показано, что неспецифическое снижение общего статуса цитозинового метилирования

ДНК, вызванного действием 5А, возможно, способно увеличивать продукцию белка клетками. Наиболее вероятно, что это происходит за счет деметилирования генов рибосомальной РНК, метилированных в норме.

Таблица 2

Параметры ядра и ядрышка в контрольной группе каллусов V2 и при обработке 5А в концентрациях 20 мкМ (V2-20) и 50 мкМ (V2-50)

Клеточная линия	Площадь ядра, мкм ²	Площадь ядрышка, мкм ²	Ядерно-ядрышковое отношение
V2-k	469,22 ±64,09	30,09 ±4,24	15,59 ±1,77
V2-20	527,69 ±47,67	46,42 ±5,31	11,37 ±2,15
V2-50	223,41 ±30,13	19,74 ±5,11	11,32 ±1,84

Заключение. Полученные в ходе работы факты свидетельствуют о том, насколько важную роль цитозиновое метилирование ДНК играет в жизнедеятельности клеток растений. На примере клеточной культуры *V. amurensis* показано, что индуцируемое изменение статуса цитозинового метилирования генома ведет к увеличению хромосомных чисел и мобилизации биосинтетического аппарата растительных клеток.

Таким образом, методики, использующие индуцируемое изменение статуса метилирования ДНК, являются весьма перспективными в свете биотехнологии растений, однако на основании данных нашего исследования ярко выраженный и непредсказуемый эффект данного подхода вносит существенные ограничения.

Литература

1. Vanyushin B.F., Ashapkin V.V. DNA methylation in higher plants: Past, present and future // Biochim. Biophys. Acta. – 2011. – № 1809. – P. 360–368.
2. Law J., Jacobsen S.E. Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals // Nat. – 2010. – Vol. 11. – P. 204–220.
3. Goll M.G., Bestor T.H. Eukaryotic cytosine methyltransferases // Annu. Rev. Biochem. – 2005. – № 74. – P. 481–514.
4. Zhu J.K. Active DNA demethylation mediated by DNA glycosylases // Annu Rev Genet. – 2009. – Vol. 43. – P. 143–166.
5. Meyer P. DNA methylation systems and targets in plants // FEBS Lett. – 2011. – Vol. 585. – P. 2008–2015.
6. Увеличение белковости зерновок пшениц под влиянием 5-азацитидина – ингибитора метилирования ДНК / Б.Ф. Ванюшин [и др.] // Известия АН СССР. Сер. биол. – 1990. – №1. – С. 75–83.
7. Моргун В.В. Экспериментальный мутагенез и его использование в селекции кукурузы – Киев: Наукова думка – 1983. – С. 278.
8. Grape genome browser. – URL: <http://www.genoscope.cns.fr>.
9. The *rolB* gene-induced overproduction of resveratrol in *Vitis amurensis* transformed cells / K.V. Kiselev [et al.] // Biotechnology J. – 2007. – Vol. 128. – P. 681–692.
10. Kiselev K.V., Dubrovina A.S., Bulgakov V.P. Phenylalanine ammonia-lyase and stilbene synthase gene expression in *rolB* transgenic cell cultures of *Vitis amurensis* // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2009. – Vol. 82. – P. 647–655.
11. Муратова Е.Н. Методики окрашивания ядрышек для кариологического анализа хвойных // Бот. журн. – 1995. – Т. 80. – № 2. – С. 82–86.
12. Смирнов Ю.А. Ускоренный метод исследования соматических хромосом плодовых // Цитология. – 1968. – Т. 10. – № 12. – С. 1601–1602.
13. Weber H., Ziechmann C., Graessmann A. In vitro DNA methylation inhibits gene expression in transgenic tobacco // EMBO J. – 1990. – Vol. 9. – P. 4409–4415.
14. A high quality draft consensus sequence of the genome of a heterozygous grapevine variety / R. Velasco [et al.] // PLoS One. – 2007. – Vol. 12. – P. 1326.
15. Генетическая изменчивость каллусных линий женьшеня *Panax ginseng* / М.М. Козыренко [и др.] // Биотехнология. – 2001. – № 1. – С. 19–26.

16. Числа хромосом женьшена *Panax ginseng* C.A. Mey / Л.С. Лаузе [и др.] // Бот. журн. – 2008. – Т. 93, № 1. – С. 158–161.
17. Effect of 5-azacytidine and trichostatin A on somatic centromere association in wheat / M. Vorontsova [et al.] // Genome. – 2004. – Vol. 47. – P. 399–403.
18. Шахbazов В.Г., Шестопалова Н.Г. Некоторые особенности ядрышка и ядра в клетках гибридного лука // Докл. АН СССР. – 1971. – Т. 196, № 5. – С. 1207–1208.



УДК 381.142:582.912.4(571.63)

Н.М. Воронкова

ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ ХРАНЕНИЯ И ГИББЕРЕЛЛИНА НА ПРОРАСТАНИЕ СЕМЯН RHODODENDRON SCHLIPPENBACHII Maxim. (ERICACEAE)

В статье приведены результаты изучения изменений всхожести семян редкого вида *Rhododendron schlippenbachii* в процессе хранения при различных температурных условиях и возможности ее регуляции с помощью гиббереллина.

Ключевые слова: семена *Rhododendron schlippenbachii*, редкий вид, хранение семян, прорастание семян, гиббереллин.

N.M. Voronkova

THE INFLUENCE OF STORAGE TEMPERATURES AND GIBBERELLIN ON RHODODENDRON SCHLIPPENBACHII Maxim. (ERICACEAE) SEEDS GERMINATION

The research results on rare genus *Rhododendron schlippenbachii* seeds germination changes during long-term storage with different temperature are presented in the article. The germination regulation possibility by gibberellin is revealed.

Key words: *rhododendron schlippenbachii* seeds, rare genus, seed storage, seed germination, gibberellin.

Введение. *Rhododendron schlippenbachii* Maxim. (рододендрон Шлиппенбаха), сем. Ericaceae – один из самых декоративных дикорастущих кустарников юга Дальнего Востока России. Вид является редким и занесен в Красную книгу РСФСР (1988) и в Красную книгу Приморского края (2008). Безусловно, его биология изучается давно [Александрова, 1972; Зорикова, 1973; Вриц, Парутута, 1998] и заслуживает внимания как редкий вид, а также как представитель декоративной флоры для интродукции с целью практического использования. Вид встречается на незначительной территории. На юге Приморского края проходит северо-восточная граница ареала вида, поэтому его считают относительно теплолюбивым растением [Зорикова, 1973]. Известно, что в природных условиях Южного Приморья вид размножается семенами. В ненарушенных ценозах на 1 квадратный метр насчитывали 58–200 сеянцев [Зорикова, 1978]. Однако антропогенные нагрузки очень высоки и приводят к резкому сокращению обилия вида. В качестве лимитирующих факторов указывают лесные пожары, изъятие цветущего и озеленительного материала из природных источников и хозяйствственно-строительную деятельность [Красная книга..., 2008]. Исключительно важным в сохранении и распространении вида является разработка методов введения его в культуру. Однако обзор литературы по размножению вида показал недостаточную изученность вопроса [Воронкова и др., 2000]. Например, изучение температурных режимов хранения для создания банка семян, использование регуляторов роста для стимуляции прорастания семян все еще остаются недостаточно исследованными. Изучение долговечности, или длительности жизни семян, несомненно, является необходимым как для общей характеристики вида, так и для сохранения генофонда. Продолжительность жизни семян в значительной степени зависит от температурных условий их хранения. Известно, что при хранении в лабораторных условиях всхожесть падала через 2 года на 32%, через 3 – на 61%, а в герметично закрытой таре и при пониженной температуре (5–8° С) оставалась на уровне контроля – 98% [Нестерова, 1991]. При кратковременном хранении в жидким азоте семена этого вида не теряли всхожести [Нестерова, 2004]. Однако имеющиеся в литературных источниках сведения не дают достаточно четкого и полного пред-