

У пре- та мейотичний періоди в цитоплазмі клітин середнього шару та ендотецію гістохімічно виявляється крохмаль та білок. У постмейотичний період внутрішній ряд клітин середнього шару, що примикає до тапетума, руйнується. У клітин, що залишилися, під час дозрівання мікроспор утворюються фіброзні потовщення (рис. 2, д). За конфігурацією вони схожі на фіброзні по-яски ендотецію, які при дегідратації клітин викликають додаткове механічне напруження, що полегшує розкриття масивних пиляків *C. scandens*. Отримані нами дані вказують на те, що середній шар мікроспорангіїв виконує запасну (депо крохмалю та білку), транспортну та механічну функції. Тапетум мікроспорангіїв *C. scandens* за структурною організацією відноситься до секреторного типу. Його клітини тангентально витягнуті ( $16,7 \pm 0,93$  мкм) з густою цитоплазмою, однією або двома крупними вакуолями, одно- частіше двоядерні. На початку постмейотичного періоду тапетум реорганізується (рис. 2, в). Структурно-функціональна перебудова тапетума призводить до формування синцитію (несправжнього периплазмодію), який характеризується тим, що після лізису клітинних оболонок протопласти вільно заповнюють внутрішній простір мікроспорангіїв. Утворення тетрад мікроспор у *C. scandens* симультанного типу. Зрілі мікроспори багатопорові двоклітинні. Генеративна клітина веретеноподібної форми.

В мікроспорангіїх багатьох досліджуваних нами рослин загальна кількість пилку була досить незначною, а частина аберантного та стерильного пилку складала 25–35%. Такі показники мікроспорогенезу передбачають зменшення коефіцієнта співвідношення кількості пилку до кількості насінних зачатків та відпо-

відно призводять до зниження ймовірності запилення рослин і утворення повноцінного насіння.

**Висновки.** Таким чином, найбільш критичним етапом в онтогенезі рослин *Cobaea scandens*, в аспекті реалізації їх репродуктивної функції в умовах НБС, є процес запилення. Ми пропонуємо два взаємодоповнюючих шляхів вирішення існуючої проблеми: 1) розробити технологію розмноження *C. scandens* як культури дворічного циклу вирощування в умовах відкритого ґрунту; 2) збільшити загальну чисельність особин у мікропопуляції. Для облігатних алогамів з яскраво вираженою самонесумісністю, до яких відноситься багато видів тропічних ліан [8], це може стати стабілізуючим чинником, здатним покращити антекологічні умови, сформувати нові симбіотичні зв'язки з природними запилювачами, синхронізувати цвітіння, сприяти успішному запиленню та формуванню повноцінного насіння. Окрім того, враховуючи можливі прояви репродуктивної несумісності, при інтродукції тропічних ліан бажано не використовувати насінневий матеріал, який було отримано з однієї материнської рослини.

1. Дженсен У. Ботаническая гистохимия. – М., 1965. 2. Жизнь растений / Под ред. Тахтаджяна А. Л. – Т.5., Ч.2. – М., 1981. 3. Паушева З. П. Практикум по цитологии растений. – 4-е изд. перераб. и доп. – М., 1988. 4. Поддубная-Арнольди В. А. Характеристика семейств покрытосеменных растений по цитозембриологическим признакам. – М., 1982. 5. Тахтаджян А. Л. Систематика и филогения цветковых растений. М.-Л., 1966. 6. Фурст Г. Г. Методы анатомо-гистохимического исследования растительных тканей. – М., 1979. 7. Шамров И. И. Семезачаток цветковых растений: строение, функция, происхождение / Под ред. Батыгиной Т.Б. – М., 2008. 8. Bernardello L., Galetto L., Rodriguez I. G. Reproductive biology, variability of nectar features and pollination of *Combretum fruticosum* (Combretaceae) in Argentina // Bot. J. Linn. Soc. – 1994. – V. 114. № 3. – P. 293–308.

Надійшла до редколегії 14.10.11

УДК 581.132.581.522.4.577.158.5 (477.20)

Н. Матвєєва, канд. біол. наук, В. Кучеренко, канд. біол. наук, О. Кваско, пров. інж.

## ПЕРОКСИДАЗНА АКТИВНІСТЬ ТРАНСГЕННИХ РОСЛИН *CICHORIUM INTYBUS* L. VAR *FOLIOSUM* HEGI З ГЕНАМИ ТУБЕРКУЛЬОЗНОГО АНТИГЕНУ *ESAT6* АБО ІНТЕРФЕРОНУ *A2B* ЛЮДИНИ

Проведено порівняння загальної пероксидазної активності екстрактів трансгенних рослин *Cichorium intybus* L. з генами *esxA* або інтерферону-*a2b* та контрольних рослин. Активність трансгенних рослин з геном *esxA* у 1,6–5,0 разів була вища, ніж у контрольних рослин, а у рослин з геном *ifn-a2b* – на рівні контролю або у 1,7 рази менше. Такі результати можуть свідчити про відмінності впливу різних генів, що перенесені до рослинного геному.

*The general peroxidase activity (GPA) analysis of the extracts of transgenic Cichorium intybus L. plants with esx or ifn-a 2b genes and control plants was carried out. GPA of the extracts of transgenic plants with esxA gene was higher in 1,6–5,0 times, than at control plants, and GPA of plants with ifn-a2b gene – as in control or over 1,7 times less. Such results can denotes the different influence of transgenes on transgenic plants GPA.*

Генетична трансформація за допомогою бактерій роду *Agrobacterium*, вірогідно, є стресом для рослин. Це обумовлено тим, що в процесі трансформації на рослинний організм діють такі стресові чинники, як поранення рослин, процес інфікування, проникнення бактерій та вбудовування бактеріальної ДНК в геном рослинної клітини. Стресовими факторами також можуть являтися власне культивування *in vitro* на синтетичних живильних середовищах, а також процес мікронального розмноження.

Реакція рослин на стрес має виражатися в активізації адаптивних механізмів, зокрема, у зміні функціонування активності антиоксидантної системи, в тому числі активності ферментів.

У стійкості рослин до естремальних умов середовища особлива роль належить ферменту клітинного метаболізму – пероксидазі. Пероксидазу можна визначити як антитілоподібний фермент, що реагує на

будь-які зміни навколишнього середовища та стресові ситуації. Підвищена увага до ферменту пероксидази обумовлена тим, що досі залишається нез'ясованою функція великого набору ізоферментів (від 3 до 42) у багатьох рослинних пероксидаз.

Пероксидазі надається особливе значення в стійкості рослин до несприятливих факторів, дія яких призводить до "окислювального стресу", накопичення  $H_2O_2$  в клітині [8].

Як вважає В.А. Андрєєва [1], суттєві впливи на рослину супроводжуються зміною активності або ізоферментного спектру пероксидази. Стресові умови підвищують активність пероксидази, що забезпечує нормальні метаболічні процеси в рослині [3; 6].

Отже, вивчення пероксидазної активності дає можливість виявити деякі реакції відповіді рослинного організму на агробактеріальну трансформацію як біотичний стресовий фактор.

**Матеріали та методи.** Об'єктами досліджень були трансгенні рослини цикорію, що культивувалися *in vitro*.

Рослини з трансформованим геномом отримували шляхом генетичної трансформації рослин *Cichorium intybus* L. var *foliosum* Hegi сорту Пала росса за допомогою *Agrobacterium tumefaciens* (вектори pCB124 з геном *ifn-α2b* та pCB063 з геном *esxA* туберкульозного антигена ESAT6) [4; 5].

Бактеріальну суспензію вирощували та трансформування сім'ядоль рослин цикорію проводили за методикою, використаною нами раніше [4]. Експланти (сім'ядолі) кокультивували з бактеріальною суспензією протягом 30 хвилин, просушували фільтрувальним папером та переносили на середовище MC [4] з додаванням 2,5 мг/л кінетину та 0,5 мг/л нафтилоцтової кислоти. Через 3 доби сім'ядолі переносили на середовище такого ж складу, до якого додавали 25 мг/л канаміцину ("Київмедпрепарат", Україна) та 600 мг/л цефатоксиму ("Дарниця", Україна). Антибіотики канаміцин та цефатоксим додавали відповідно для селекції трансформованих рослин та для елімінації агробактерій. Після початку регенерації експланти переносили на середовища MC з 0,5 мг/л кінетину та 0,05 мг/л α-

нафтилоцтової кислоти. Отримані на селективному середовищі зелені рослини укорінювали на середовищі MC без регуляторів росту. Субкультивування отриманих трансгенних ліній проводили кожні 3 тижні на середовищі MC з канаміцином та цефатоксिमом при 16-годинному світловому фотоперіоді та температурі 24°C.

Для визначення загальної пероксидазної активності (ЗПА) зразки рослинного матеріалу (листки) відбирали о восьмій годині. Листки масою 200 мг розтирали в охолоджених ступках з ацетатним буфером (pH 4,7), переносили кількісно за допомогою буфера в пробірки ємкістю 10 мл. Після 15-тихвилинного настоювання з періодичним перемішуванням, витяжку центрифугуванням при 8 000g протягом 10 хв. Загальну пероксидазну активність розраховували в умовних одиницях на 1 г рослинного матеріалу за методикою [2].

**Результати та їх обговорення.** Загальна пероксидазна активність рослин, трансформованих вектором pCB063 (рослини мали селективний ген *nptII* та цільовий ген *esxA*) виявилася вищою, ніж у контрольних рослин. Так, ЗПА екстрактів рослин лінії № 4/6 перевищувала активність контрольних рослин у 1,6 рази, лінії № 3/1 – у 3,7 разів, лінії № 5/7 – у 5,0 разів (рис. 1).

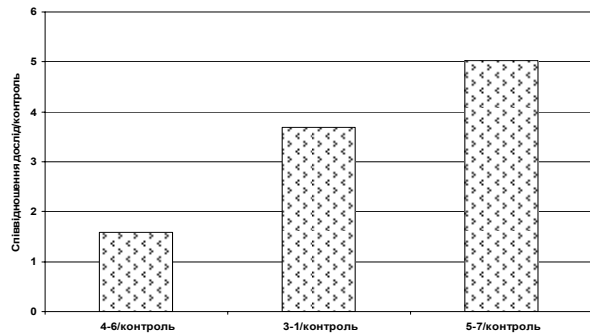
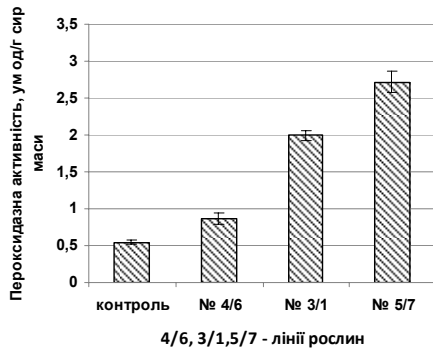


Рис. 1. Пероксидазна активність рослин цикорію з геном туберкульозного антигена ESAT 6

ЗПА двох ліній трансгенних рослин (№ 22 та 8), отриманих з використанням вектору pCB124 (трансформація за допомогою *A. tumefaciens*, селективний ген *nptII* та цільовий ген *ifn-α2b*), достовірно не відрі-

знялася від активності рослин дикого типу. Загальна пероксидазна активність екстрактів, отриманих з рослин лінії №2, була у 1,75 рази меншою, ніж у контрольних рослин (рис. 2).

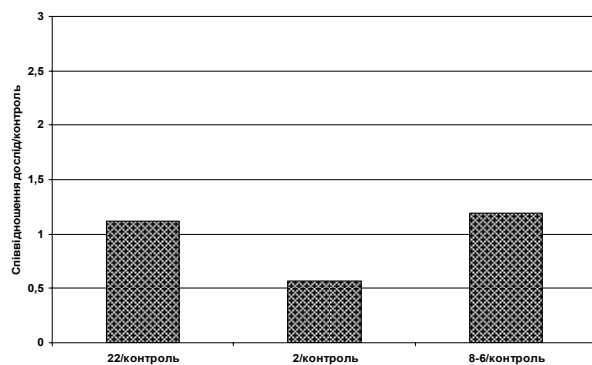
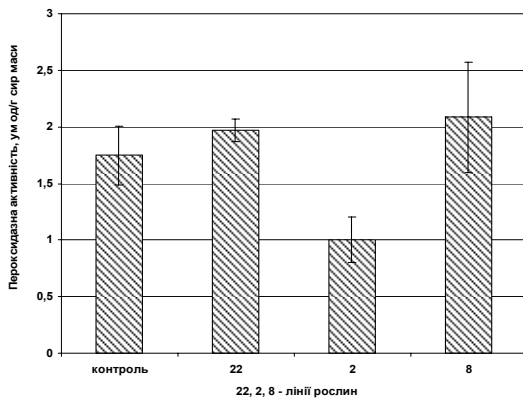


Рис. 2. Загальна пероксидазна активність рослин цикорію, трансформованих вектором pCB124 (селективний ген *nptII* та цільовий ген *ifn-α2b*)

Слід зазначити, що у якості контрольних рослин використовували рослини цикорію, що були отримані шляхом прямої регенерації з листових експлантів та культивувалися в умовах *in vitro*. Отже, як дослідні, так і контрольні рослини пройшли етап культивування у стерильних умовах та регенерації на живильних середовищах з регуляторами росту. Таким чином, культивування в умовах *in vitro* як стресовий фактор впливало

на експериментальні та контрольні рослини в однаковому ступені. Значне підвищення пероксидазної активності у трансгенних рослин з геном *esxA* може бути як результатом стресу, якому було піддано рослини у процесі генетичної трансформації, так і перенесенням саме цього гена та стресовим впливом синтезованого білка ESAT6 на трансформовані рослини.

Відсутність підвищення пероксидазної активності у трансгенних рослин з геном *ifn-α2b* може свідчити про те, що синтезований у трансформованих клітинах інтерферон не є токсичним для рослин, крім того, можливо, зменшує стресовий вплив генетичної трансформації на рослини. Методом ЗТ-ПЛР нами раніше було показано, що у рослин лінії №22 відбувалося "мовчання" цільового гена, і, таким чином, цільовий білок не синтезувався, а в інших двох здійснювався синтез мРНК та виявлена біологічна (протівірусна) активність. Оскільки обидві групи досліджуваних рослин, що відрізнялися перенесеними до них цільовими генами, були трансформовані за допомогою агробактерій, вірогідно припустити, що відмінності у ЗПА викликані саме перенесеними цільовими генами - *ifn-α2b* та *esxA*. Наявність гена *esxA* призводила до значного підвищення рівня ЗПА, в той же час ЗПА рослин з геному *ifn-α2b* була нижчою або не відрізнялася від пероксидазної активності контрольних нетрансформованих рослин.

**Висновки.** Порівняльний аналіз показав, що, вірогідно, різні цільові гени можуть по-різному впливати на рівень загальної пероксидазної активності екстрактів трансгенних рослин цикорію. ЗПА у рослин з геном *esxA* була вищою, ніж у рослин дикого типу у 1,6 – 5,0

разів, а рівень ЗПА у рослин з геном *ifn-α2b* не відрізнявся від контроль, або був нижчим у 1,75 рази. Можна припустити, що відсутність збільшення або зниження загальної пероксидазної активності у рослин пов'язано з наявністю та активністю інтерферону-*α2b*.

1. Андреева В. А. Фермент пероксидаза: Участие в защитном механизме растений. – М., 1988. 2. Бояркин А. Н. Определение активности пероксидазы // Практикум по биохимии растений. – М., 1976. 3. Капустян А. В. Фермент пероксидаза – универсальный маркер зимостойкости растений // Интродукция растений. – 2000. - №1. - С. 152–154. 4. Матвеева Н. А., Василенко М. Ю., Шаховский А. М., Банникова М. А., Кваско Е. Ю., Кучук Н. В. Эффективная агробактериальная трансформация растений цикория (*Cichorium intybus* L.) вектором с геном туберкулезного антигена ESAT 6 // Цитология и генетика. – 2011. - Т. 45, № 1. – С. 11–17. 5. Матвеева Н. А., Шаховский А. М., Герасименко И. М., Кваско О. Ю., Кучук М. В. Перенесенная гена биосинтезу интерферону-*α2b* в растения цикория (*Cichorium intybus* L.) методом агробактериальной трансформации // Биополимеры и клетка. – 2009. - Т. 25, № 2. - С. 120–125. 6. Олейников Т. М., Волкова А. М., Пушина Р. Н. Действие высокой температуры на изоферментный состав и активность изоэнзимов пероксидазы листьев пшеницы // Физиология и биохимия культурных растений - 1979. – Т.11, № 2. – С. 113–117. 7. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture // Phys. Plant. – 1962. - V.15, N.3. - P. 473–497. 8. Willekens H., Chamnongpol S., Montagu M.V. et al. Role of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-scavenging enzymes in environmental stress // Ag. Biotech. News and information. – 1995. – Vol.7, №9. – P. 189–197.

Надійшла до редколегії 15.09.11

УДК 615.322: 612.017.1: 576.3

І. Михайлова, лікар, Г. Гревцова, д-р біол. наук, К. Гаркава, д-р біол. наук

## АНАЛІЗ МЕТАБОЛІЧНОЇ АКТИВАЦІЇ ФАГОЦИТУЮЧИХ КЛІТИН ПІД ВПЛИВОМ ВОДНО-СОЛЬОВИХ ВИТЯЖОК ІЗ ЛИСТКІВ КИЗИЛЬНИКІВ СЕРІЇ *SALISIFOLI* ТА *BULLATI*

*Вивчено вплив водно-сольових витяжок із листків кизильників серії *Salisifoli* та *Bullati* на метаболічну активність фагоцитів*

*The influence of the water-sault extracts of *Cotoneaster folium* (serium *Salisifoli* and *Bullati*) on metabolic activity of phagocytes has been studied*

Рослини супутники нашого життя і чим більше ми будемо знати про їх властивості тим ефективніше будемо використовувати їх як лікарські засоби [3] у повсякденному житті. Зростання рівня багатьох хвороб, пов'язаних з погіршенням стану навколишнього середовища, вимагає удосконалення та розширення бази лікарських засобів рослинного походження [8]. Вивчення лікарських властивостей кизильників - рослин, які не є офіційно визнаними як лікарські рослини, але про їх лікарські властивості відомо із досвіду використання у народній медицині для покращення здоров'я людей з трактатів тибетської медицини 17 століття [1, 2, 4], є актуальним. Біологічну активність рослин відносно адаптаційних можливостей важливо визначати з урахуванням регіону їх зростання. В зв'язку з цим метою роботи стало вивчення впливу водно - сольових витяжок із листків кизильників серії *Salisifoli* та *Bullati*, що інтродуковані в ботанічному саду імені акад. О.В.Фоміна Київського національного університету ім. Тараса Шевченка на активацію кисеньзалежного метаболізму фагоцитуючих клітин, активність яких пов'язана з адаптаційними можливостями [7] організму.

**Матеріали і методи.** Джерелом отримання біологічно-активних речовин із листків були кизильники серії *Salisifoli* таких видів: *C. x sueticus* Klotz; *C. x sueticus* "Coral Beaty"; *C. x sueticus* Klotz "Skogholm"; *C. floccosus* Flinck et Hylmo ; *C. x watereri* Exell ; *C. dammeri* Schneid.; *C. rugosus* Pritzel; *C. salicifolius* Franchet; *C. salicifolius* Franchet" Repens" та кизильників серії *Bullati*: *C. boisianus* Klotz, *C. bullatus* Bois, *C. obscurus* (Rehd.et Wils.) Flinck et Hylmo, *C. rechderi* Pojark., *C. sikangensis* Flinck et Hylmo; кисеньзалежну бактерицидність фагоцитів визначали за рівнем кисень-

залежного метаболізму на фагоцитах крові у НСТ-тесті за Нагевим [5], а активність пероксидазних систем оцінювали за середньоцитохімічним коефіцієнтом (СЦК) за Нарцисовим [6]. З цією метою до фагоцитів крові додавали 0,1 мл 0,1% водно-сольових витяжок (0,15 M NaCl) із листків рослин і інкубували при 37°C 30 хв, а потім відмивали і в кожному пробі вносили по 0,2 мл 0,2% розчину нітросинього тетразолію. Проби інкубували в термостаті 15 хв при 37°C після чого виливали на предметне скло, підсушували і фарбували нейтральним червоним. Кількість НСТ – позитивних клітин визначали у відсотках. Активність пероксидазних систем визначали за середньоцитохімічним коефіцієнтом і підраховували кількість клітин з різним вмістом гранул формазану. Дослідження проводили *in vitro* у трьох пробах після обробки фагоцитів витяжкою із листків кожної дослідної рослини.

**Результати та їх обговорення.** Результати досліджень по визначенню впливу на кисеньзалежну бактерицидність фагоцитів крові водно-сольових витяжок із листків кизильників серії *Salisifoli* та *Bullati* представлені в таблицях 1 і 2.

Кизильники *C. x sueticus* Klotz, *C. floccosus* Flinck et Hylmo, *C. x watereri* Exell збільшували кількість активованих НСТ- позитивних клітин у 1,5 рази. Рівень метаболічної активності фагоцитів за показниками середньо-цитохімічного коефіцієнта зростав у 1,3 рази за умов використання *C. floccosus* Flinck et Hylmo, *C. x watereri* Exell. В межах контрольних значень знаходилися показники активації фагоцитів під впливом *C. salicifolius* Franchet "Repens" і *C. dammeri* Schneid та *C. x sueticus* "Coral Beaty".