

**Summary.** The methods for the purification of the main tissue-specific antigens (actin, myosin and tropomyosin) from the normal and affected by dilatative cardiomyopathy human heart are described. Some their physico-chemical properties were investigated. The decrease of the contractive proteins content in the DCMP myocardium in comparison with the normal was shown.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Клиническая иммунология и аллергология / Под ред. Л. Йегера. — М.: Медицина, 1990. — Т. 3. — 527 с.
2. Rose N. R., Neumann D. A., Herskowitz A. Autoimmune myocarditis: concepts and questions // Immunol. Today. — 1991. — 12, N 8. — P. 253—255.
3. Coderholm B., Wieslander J., Bygren P., Neinegard D. Patients with IgA nephropathy have circulating anti-basement membrane antibodies reacting with structures common collagen I, II and IV // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 1986. — 83. — P. 6151—6155.
4. Michael D., Michael S., Tsoukas W. C., Hoffmann G. W. Distribution of antibodies against collagen in AIDS risk groups and homosexual AIDS patients suggests a link between autoimmunity and the immunopathogenesis of AIDS // J. Immunol. — 1990. — 144, N 4. — P. 1241—1250.
5. Dan-Goor M., Muhland A. Antibody directed against 142-148 sequence of the myosin heavy chain interferes with myosin-actin interaction // Biochemistry. — 1991. — 30, N 2. — P. 400—405.
6. Spudich J. A., Walt S. The regulation of rabbit skeletal muscle contraction // J. Biol. Chem. — 1971. — 246, N 15. — P. 4866—4871.
7. Epstein H. F., Fischman D. A. Molecular analysis of protein assembly in muscle development // Science. — 1991. — 251. — P. 1039—1044.
8. Ивановский Ю. В., Назорнев В. А., Зубжицкий Ю. Н. Получение иммунных сывороток против антигенов аорты для иммуноморфологического изучения экспериментального атеросклероза // Бюл. эксперим. биологии и медицины. — 1975. — № 3. — С. 72—77.
9. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T4 // Nature. — 1970. — 227, N 52. — P. 680—685.
10. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. — 1976. — 72. — P. 248—254.
11. Moore L. A., Arrizubieta M. J., Tidyman W. E. et al. Analysis of the chicken fast myosin heavy chain family // J. Mol. Biol. — 1992. — 225. — P. 1143—1151.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН Украины, Киев  
УкрНИИ кардиологии им. акад. А. Д. Стражеско МЗ Украины, Киев

Получено 28.06.93

УДК 58.04:581.162.41:635.64

**Ю. В. Чесноков, О. Б. Шевкун, А. А. Глушакова**

#### **УСТОЙЧИВОСТЬ К КАНАМИЦИНУ ПРОРАСТАЮЩЕЙ IN VITRO ПЫЛЬЦЫ ТОМАТА**

*В работе исследовано влияние различных концентраций канамицина на общий процент прорастания пыльцевых зерен и длину пыльцевых трубок у пыльцы томата. Установлена корреляция между спорофитом и гаметофитом растений томата по признаку «устойчивость к канамицину», в том числе выявлены различия между гомо- и гетерозиготным состояниями у устойчивых к канамицину растений с помощью селекции на уровне гаметофита на стадии зрелой пыльцы. Обсуждаются возможные эффекты воздействия канамицина на физиологическую и генетическую активность прорастающей пыльцы различных (устойчивый и неустойчивый к канамицину) генотипов томата.*

**Введение.** Мужской гаметофит, обладая сравнительно простой морфологией, тем не менее, в процессе своего развития и функционирования проявляет значительную физиологическую и биохимическую активность, транскрибируя и транслируя большое число генов своего гаплоидного генома [1—4].

© Ю. В. Чесноков, О. Б. Шевкун, А. А. Глушакова, 1993

Значительное число генов, транскрибируемых и транслируемых в мужском гаметофите, экспрессируется также и в вегетативных клетках растения. Впервые о слабой дивергенции экспрессии генов спорофита и гаметофита сообщалось в работе [5], где с помощью изоферментного анализа авторам удалось показать значительную степень генетического перекрытия между спорофитной и гаметофитной фазами у *Lycopersicon esculentum*. Позднее сходные результаты были получены для *Zea mays* [6], *Tradescantia padulosa* [1] и для различных видов *Populus* [7]. Предположение об экспрессии части генов генома на обеих фазах жизненного цикла было подтверждено также экспериментальными исследованиями по влиянию селекции микрогаметофитов, устойчивых к абиотическим стрессам, на качество спорофитного поколения [8].

Помимо этого, ранее были проведены работы, в которых исследовались и применялись подходы по гаметофитной селекции на устойчивость к канамицину у томата [9] и кукурузы [10]. Данные работ [9, 10] продемонстрировали достаточно явную корреляцию между проявлением признака устойчивости к канамицину в гаметофитной и спорофитной фазах развития растения, а также возможность использования подобного подхода для селекции трансформантов на стадии гаметофита.

В настоящем исследовании нами предпринята попытка установления коррелятивной связи между спорофитом и гаметофитом растений томата по признаку устойчивости к канамицину, в том числе выявления различий между гомо- и гетерозиготным состояниями у устойчивых к канамицину растений с помощью селекции на уровне гаметофита на стадии зрелой пыльцы.

**Материалы и методы.** Растительный материал. Трансформированные гибридные растения томата (*L. esculentum* × *Solanum pennellii*), использованные в данном исследовании, получены описанным ранее способом посредством процесса опыления-оплодотворения [10, 11]. В качестве экзогенной при опылении использовали ДНК плазмид *pCT2T3* [12] и *pGV1501* (Deblaere, персональное сообщение), содержащих полиаинсинтезазный промотор, структурный ген неоминифосфотрансферазы II (*nptII*) из транспозона *Tn5* и терминаторный район вируса мозаики цветной капусты — в случае плазмиды *pCT2T3* и 3'-октоинсинтезазный терминаторный район — в случае *pGV1501*. Интеграция химерного гена *nptII* в геном растений и их экспрессия были подтверждены проведенным молекулярным анализом, устойчивостью отселектированных растений к канамицину [10, 11] и расщеплением в F<sub>2</sub> по признаку устойчивости к канамицину в полученном от самоопыленных растений потомстве в соотношении 3 : 1 (устойчивые : неустойчивые). Контролем служили гибридные растения томата, не подвергавшиеся трансформации.

**Проращивание пыльцы *in vitro*.** Растения томата выращивали до фазы цветения в полевых условиях по общепринятым правилам. Пыльники собирали с цветков в период полного цветения и высушивали в термостате в течение ночи при 28°C. Свежевысушенную пыльцу отделяли от пыльников и помещали на питательную среду (РДП), содержащую 15 % сахарозы, 0,018 % H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> и 0,04 % Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O. В качестве селектирующего агента к РДП добавляли канамицин в различных концентрациях. Пыльцу проращивали в течение 60—90 мин во влажной камере в термостате при 27°C.

Подсчет процента прорастания и измерение длины пыльцевой трубки осуществляли в 4—5-кратной повторности. Для каждой концентрации канамицина подсчитывали не менее 500 пыльцевых зерен в 3—4 полях зрения под микроскопом. Пыльцу считали проросшей, если длина пыльцевой трубки превышала 1,5 диаметра пыльцевого зерна. Длину пыльцевой трубки измеряли с помощью окуляр-микрометра при 70-кратном увеличении.

Биометрические расчеты проводили на основе анализа зафиксиро-

рованных эмпирических вариант, а результаты выражали в виде средней арифметической  $\pm$  стандартное отклонение. Прочие параметры выявленных статистических рядов вычисляли на основании полученных числовых значений для 5 %-го уровня значимости [13].

**Результаты и обсуждение.** Эффект влияния увеличения концентрации канамицина (Кп) на прорастание пыльцевых зерен, собранных с трансформированных (устойчивых) и контрольных (неустойчивых)

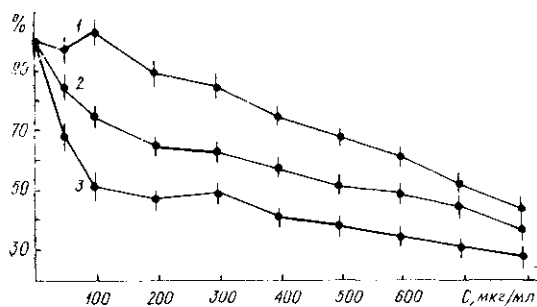


Рис. 1. Эффект влияния концентрации Кп на прорастание пыльцевых зерен томата: 1, 2 — устойчивые гомозиготный и гетерозиготный по гену *nptII* генотипы соответственно; 3 — неустойчивый контрольный генотип. Прорастание пыльцы дано в % от прорастания при концентрации Кп 0 мкг/мл

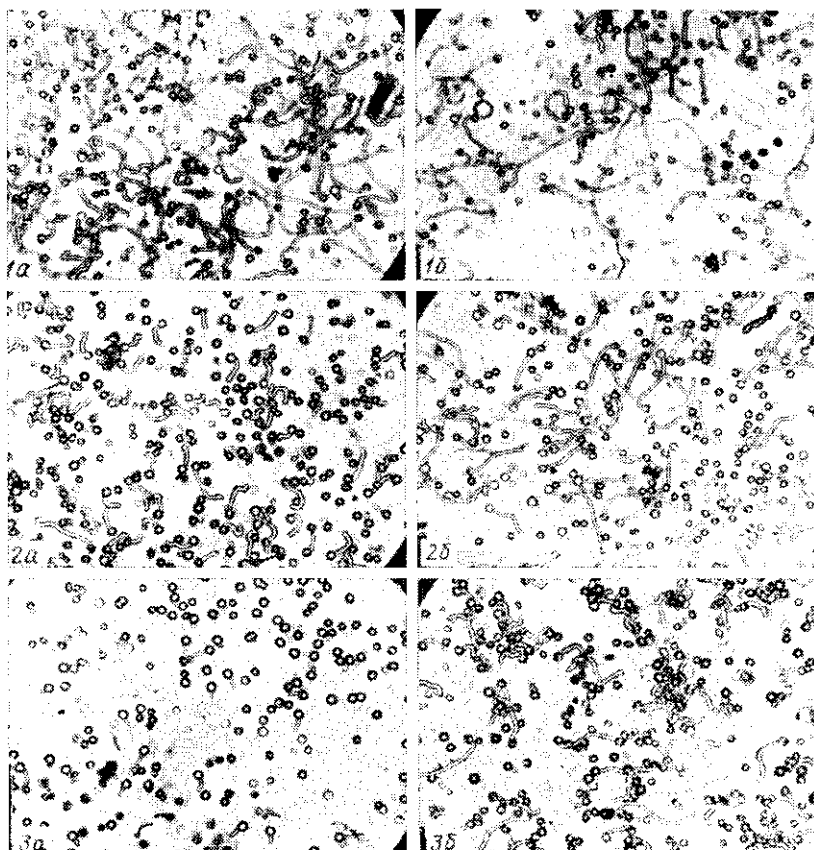


Рис. 2. Прорастание пыльцевых зерен устойчивого и неустойчивого генотипов при различных концентрациях Кп (а — контроль; б — трансформант): 1 — 0; 2 — 500; 3 — 800 мкг/мл

растений, показан на рис. 1. Отличия между гомо- и гетерозиготным состояниями, впрочем как и между устойчивым и неустойчивым генотипами, сравнительно просто выявляются благодаря гаплоидности генома пыльцы.

Добавление Кп в РДП ингибирует у пыльцы томата рост пыльцевых трубок. Изначальный эффект Кп на пыльцу контрольных (неус-

тойчивых) растений отмечался уже при концентрации 50—100 мкг/мл. В то же время с увеличением концентрации Кт в проведенных экспериментах происходило постепенное ингибирование общего прорастания пыльцы для всех генотипов. Однако для устойчивых генотипов, в отличие от контрольного неустойчивого, наблюдалось более постепенное уменьшение прорастания пыльцевых зерен. Такое же отличие обнаружено и для гомозигот по отношению к гетерозиготам по признаку устойчивости к Кт. Поскольку для гетерозиготы характерно наличие в пыльцевой популяции как устойчивых, так и неустойчивых пыльцевых зерен (примерное соотношение которых равно 1 : 1), то она занимает на графике (см. рис. 1) промежуточное положение между двумя гомозиготными (устойчивая и контрольная неустойчивая) формами по признаку устойчивости к Кт. Вместе с тем, как было показано ранее [9], отличия по проценту прорастания зна-

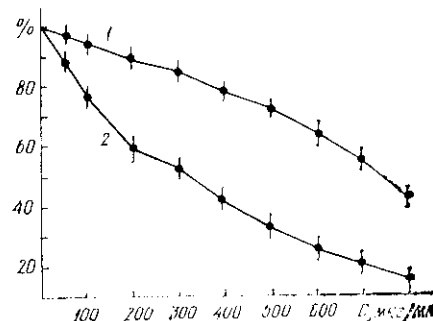


Рис. 3. Эффект влияния концентраций Кт на прорастание пыльцевых трубок пыльцы томата: 1, 2 — устойчивый и неустойчивый генотипы соответственно. Длина пыльцевых трубок выражена в % от длины при концентрациях Кт 0 мкг/мл

чительно зависят от изначальной жизнеспособности пыльцы. Поэтому, на наш взгляд, более наглядные и существенные различия между устойчивыми и неустойчивыми генотипами можно выявить по длине прорастающей пыльцевой трубки (рис. 2 и 3). Так, после полутора часов инкубации пыльцы на среде без Кт длина пыльцевых трубок для обоих (устойчивый и неустойчивый) генотипов составляла в среднем  $260 \pm \pm 3,0$  мкм. Первичное ингибирование роста пыльцевых трубок контрольной пыльцы отмечалось уже при 50—100 мкг/мл Кт, а 50 %-е — при 300—350 мкг/мл Кт. В то же время в случае устойчивой пыльцы первичное ингибирование происходило при 200—300 мкг/мл Кт, а 50 %-е — при 700—800 мкг/мл.

Достоверные отличия между длиной пыльцевых трубок устойчивой и контрольной пыльцы получены при концентрации Кт в интервале от 200 до 700 мкг/мл ( $p < 0,05$ ). Так, например, длина пыльцевой трубки устойчивой пыльцы при концентрации Кт 500 мкг/мл в 2,2 раза больше таковой контрольной пыльцы (см. рис. 2). По общему проценту прорастания пыльцевых зерен для контрольного и двух устойчивых генотипов (гомо- и гетерозиготы по гену Кт) достоверные отличия наблюдались при концентрации Кт от 200 до 500 мкг/мл ( $p < 0,05$ ). Никаких других или дополнительных отличий между исследованными генотипами при воздействии различных концентраций Кт на прорастающую пыльцу этих генотипов нами обнаружено не было. И хотя на сегодня соотношение в проявлении признака устойчивости к Кт для спорофита и гаметофита растений окончательно не установлено, нами продемонстрированы достоверные отличия по общему проценту прорастания пыльцевых зерен между контрольным и двумя устойчивыми генотипами (гомо- и гетерозиготы по гену Кт). Однако не стоит забывать, что выявленные отличия значительно зависят от изначального процента жизнеспособности пыльцы, и, как было показано ранее [9], не всегда могут быть достаточно четко выявлены.

Тем не менее, на наш взгляд, использование гаметной селекции с привлечением введенных экзогенных рекомбинантных маркерных генов представляет большой интерес не только как более простой способ отбора трансформированных генотипов (с возможным разделением гомо- и гетерозигот), но и как способ выявления и селекции генотипов с важными, представляющими особый интерес, агрономическими свой-

ствами, которые могут оказаться связанными с новым сравнительно легко выявляемым маркерным геном [8, 10].

Авторы благодарны В. А. Ляху за критические замечания, сделанные по прочтении рукописи статьи.

**Резюме.** В работе досліджено вплив різних концентрацій канаміцину на загальний відсоток проростання пилоквих зерен і довжину пилоквих трубок томата. Встановлено кореляційний зв'язок між спорофітом і гаметофітом рослин томата за стійкістю до канаміцину, в тому числі виявлено різницю між гомо- та гетерозіготним станом у стійких до канаміцину рослин за допомогою селекції на рівні гаметофіту на стадії зрілого пилку. Обговорюються можливі ефекти впливу канаміцину на фізіологічну і генетичну активність проростаючого пилку різних (стійких і нестійких до канаміцину) генотипів рослин.

**Summary.** An influence of various kanamycin concentration on total tomato pollen grain germination percentage and tomato pollen tube length is described in the article. A correlation is established between tomato plant sporophyte and gametophyte with the trait of resistance to kanamycin. At the same time differences are distinguished by means of breeding at gametophyte level at the stage of mature pollen between homo- and heterozygous state of plants which are resistant to kanamycin. Possible effects of kanamycin action on physiological and genetical activity of germinating pollen are discussed in various (resistant and susceptible to kanamycin) tomato genotypes.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Willing R. P., Mascarenhas J. P.* Analysis of the complexity and diversity of mRNA from pollen and shoots of *Tradescantia* // *Plant Physiol.*—1984.—75.— P. 865—868.
2. *Mascarenhas J. P., Mermelstein J.* Messenger RNAs: their utilization and degradation during pollen germination and tube growth // *Acta Soc. bot. pol.*—1981.—50, N 1.— P. 13—20.
3. *Mascarenhas N. T., Bashe D., Eisenberg A. et al.* Messenger RNA in corn pollen and protein synthesis during germination and pollen tube growth // *Theor. and Appl. Genet.*—1984.—68.— P. 323—326.
4. *Tupy J.* Alternations in polyadenylated RNA during pollen maturation and germination // *Biol. Plant.*—1982.—24.— P. 331—340.
5. *Tanksley S. D., Zamir D., Rick C. M.* Evidence for extensive overlap of sporophytic and gametophytic gene expression in *Lycopersicon esculentum* // *Science.*—1981.—213, N 24.— P. 453—455.
6. *Sari Gorla M., Frova C., Binelli G., Ottaviano E.* The extent of gametophytic-sporophytic gene expression in maize // *Theor. and Appl. Genet.*—1986.—72, N 1.— P. 42—47.
7. *Rajora O. P., Szuffa L.* Sporophytic and gametophytic gene expression in *Populus deltoides* Marsh., *P. nigra* L. and *P. maximowiczii* Henry // *Can. J. Genet. Cytol.*—1986.—28.— P. 476—482.
8. *Чалык С. Т., Лях В. А., Перчулак Л. П.* Новые подходы в селекции кукурузы.— Кишинев: Штиинца, 1992.— С. 56—117.
9. *Bino R. J., Hille J., Franken J.* Kanamycin resistance during in vitro development of pollen from transgenic tomato plants // *Plant Cell Rep.*—1987.—6, N 5.— P. 333—336.
10. *Чесноков Ю. В.* Возможность генетической трансформации растений с использованием процесса опыления — оплодотворения: Автореф. дис. ... канд. биол. наук.— Минск, 1990.—21 с.
11. *Чесноков Ю. В., Седов Г. И., Виконская Н. А.* Простой метод генетической трансформации двудольных растений // *Известия АН МССР. Сер. биол. и хим. наук.*—1989.— № 6.— С. 61—62.
12. *Uchimiya H., Fushimi T., Hasimoto H. et al.* Expression of a foreign gene in callus derived from DNA-treated protoplast of rice (*Oryza sativa* L.) // *Mol. and Gen. Genet.*—1986.—204, N 2.— P. 204—207.
13. *Зайцев Г. Н.* Методика биометрических расчетов.— М.: Наука, 1973.—256 с.

Ин-т генетики АН Молдовы, Кишинев

Получено 12.01.93