

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ИНСТИТУТ БИОРЕСУРСОВ И ПРИКЛАДНОЙ ЭКОЛОГИИ ОРЕНБУРГСКОГО
ГОСУДАРСТВЕННОГО ПЕДАГОГИЧЕСКОГО УНИВЕРСИТЕТА
УПРАВЛЕНИЕ ФЕДЕРАЛЬНОЙ СЛУЖБЫ ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ПРИРОДОПОЛЬЗОВАНИЯ
(РОСПРИРОДНАДЗОР) ПО ОРЕНБУРГСКОЙ ОБЛАСТИ
АДМИНИСТРАЦИЯ ОРЕНБУРГСКОЙ ОБЛАСТИ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ПРИРОДНЫЙ ЗАПОВЕДНИК «ОРЕНБУРГСКИЙ»
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ПАРК «БУЗУЛУКСКИЙ БОР»

Avtor e-mail: apismell@hotmail.com

ТРУДЫ

ИНСТИТУТА БИОРЕСУРСОВ И ПРИКЛАДНОЙ ЭКОЛОГИИ

МАТЕРИАЛЫ

IV МЕЖДУНАРОДНОЙ КОНФЕРЕНЦИИ
БИОРАЗНООБРАЗИЕ И БИОРЕСУРСЫ УРАЛА
И СОПРЕДЕЛЬНЫХ ТЕРРИТОРИЙ
ОРЕНБУРГ, 29-31 мая 2008 года

4th INTERNATIONAL CONFERENCE
BIODIVERSITY & BIORESOURCES
OF URALS AND ADJACENT TERRITORIES
ORENBURG, May 29-31, 2008

Il'iasov R.A., Poskriakov A.V., Nikolenko A.G. Dinamika izmeneniia chastot genov antibakterial'nogo peptida v populiacii pchel na Urале. Materialy IV mezhdunarodnoj konferencii "Bioraznoobrazie i bioresursy Urала i sopredel'nyh territorij". Orenburg. 2008. S. 134-136.

ОРЕНБУРГ – 2008

Секция II. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ СОХРАНЕНИЯ БИОРАЗНООБРАЗИЯ

Ильясов Р.А., Поскряков А.В., Николенко А.Г.

Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН
450054, г.Уфа, ул. Пр. Октября, 71. e-mail: apismell@hotmail.com

ДИНАМИКА ИЗМЕНЕНИЯ ЧАСТОТ ГЕНОВ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОГО ПЕПТИДА В ПОПУЛЯЦИИ ПЧЕЛ НА УРАЛЕ

Болезнетворные бактерии пчел широко распространены в окружающей среде. Для защиты от микроорганизмов пчелы продуцируют антибактериальные пептиды. Мы изучили вариабельность фрагмента гена дефензина ядерной ДНК в популяциях *A.m.mellifera* на Урале. Было обнаружено изменение распределения частот генов в популяции пчел на Урале за последние десять лет.

Болезнетворные бактерии пчел широко распространены в почве, воде, воздухе и пище. В большинстве случаев бактерии попадают в полость тела пчелы через поглощаемый корм. Бактерии могут инфицировать пчел и через дыхальца или даже через раны, наносимые внешними паразитами – клещами *Varroa jacobsoni* [1]. Любое ранение кутикулы или пищеварительного тракта является входным путем для бактерий.

Личинки медоносных пчел могут быть поражены американским гнильцом *Paenibacillus larvae larvae*, европейским гнильцом *Mellissococcus pluton*, *Bacillus pulvifaciens*, а взрослые пчелы - *Pseudomonas aeruginosa*, *Hafnia alvei*, *Enterococcus faecalis*. Сапрофитные и патогенные бактерии растений могут также случайно индуцировать болезни пчел при попадании в полость тела.

Как известно, пчелы продуцируют антибактериальные пептиды для защиты от микроорганизмов. На данный момент у пчел известны антибактериальные пептиды - абецин, дефензин и гименоптецин, которые, по Б.В.Зюману (1992), являются необходимыми компонентами групповой и индивидуальной системы иммунитета пчелиной семьи. С.С.McCleskey, R.M.Melampy (1938) и Н. Yamauchi (2001) продемонстрировали антибактериальные свойства маточного молочка пчел, секретлируемого фарингеальными железами, которое активно против бактерий и грибков. К. Casteels-Johnson с соавт. (1994) изучали в гемолимфе у пчел, инфицированных *Escherichia coli*, четыре различных типа антимикробных каталитических пептидов – апидацин, гименоптецин, абецин и дефензин.

Антибактериальный пептид дефензин объединяет большое семейство цистеин-богатых каталитических антимикробных пептидов, воздействующих на разнообразные микроорганизмы, составляющих основную защитную систему большинства организмов. Дефензины пчел - пептиды длиной 36-51 аминокислот, обладающие сходством последовательности, основная структура которых состоит из концевых аминокислотных повторов, альфа-спирали и двух антипараллельных цепочек, стабилизированных 3-дисульфидными мостиками [2]. Дефензин обычно продуцируется последним из всех, но его активность продолжается свыше двух недель после инфекции [3]. Дефензин гемолимфы и его предшественник пропептид были охарактеризованы по кДНК, выделенных из брюшной полости инфицированных пчел [4].

пчел и
пчел сс
стояще
дунаро
ный, б
было г
мотри
антигр
патоген

ных, а
нуклео
наруже
А.В.Ль
к амин
с соавт
рые пр
ного S.
которые
известн
1, тогда
сходна
зин 1 о
прессир
ных и г
ставлен

A.m.mel
фрагмен
тотой 0,
дефензи
лель В
ния мож
восточн
дефензи
зянской
ской по
значител
генотип
ВВ фра
0,61-0,8
нотип В
I
ной ДНК
что попу
возможн
венных
жающей

Другой дефензин пчел, названный роялизином, был выделен из маточного молочка пчел и был охарактеризован S.Fujiwara с соавт. (1990) на уровне пептидов. Оба дефензина пчел содержали 51 аминокислоту. Они отличались по одной аминокислоте и по группе, состоящей из двух аминокислот при сравнении последовательностей, представленных в международном GeneBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Пчелиный дефензин, также как шмелиный, был амелирован и имел дополнительное удлинение на 11 аминокислот с С-конца, что было несхоже с другими насекомыми. Оказалось, что роялизин очень активен против грамотрицательных бактерий и неэффективен против грамположительных. Также была описана антигрибковая активность пчелиного роялизина [5] и его антибактериальная активность к патогену *Paenibacillus larvae*, который является возбудителем болезни личинок пчел.

А.В.Львов и А.Г.Николенко (2000) обнаружили существование двух, ранее не известных, аллельных форм А и В фрагмента гена дефензина. J.Klaudiny с соавт. (2005) изучили нуклеотидную и аминокислотную последовательности гена дефензина 1 и показали, что обнаруженный ими антибактериальный пептид отличался от дефензина, описанного А.В.Львовым и А.Г.Николенко (2000), заменой Т на А в положении 1471, которая приводила к аминокислотной замене Leu на His; отличался от дефензина, описанного K.Casteels-Johnson с соавт. (1994) нуклеотидными заменами GGAGT на TTAGA в положении 1507–1511, которые приводят к аминокислотной замене GlyVal на ValGly; отличался от роялизина, описанного S.Fujiwara с соавт. (1990), нуклеотидными заменами CG на TA в положении 1832–1833, которые приводят к аминокислотной замене Arg на Trp. Кроме того, они показали, что ранее известные дефензин и роялизин были не чем иным, как полиморфными формами дефензина 1, тогда как обнаруженная ими новая последовательность гена дефензина 2 лишь на 55,8% сходна с последовательностью дефензина 1 и являлся геном новой формы дефензина. Дефензин 1 обладал уникальной среди артропод экзон-интронной структурой. Оба дефензина экспрессировались в голове и груди. Дефензин 1 обнаружен в гипофаренгиальных, мандибулярных и грудных слюнных железах пчел, тогда как дефензин 2 отсутствовал. Различная представленность этих генов отражает тканезависимую экспрессию дефензина.

Мы изучили варибельность фрагмента гена дефензина ядерной ДНК в популяциях *A.mellifera* на Урале. В исследовании наблюдалось два аллеля этого локуса. Аллель В фрагмента гена дефензина ядерной ДНК встречался с частотой 0,14–0,25, а аллель А – с частотой 0,75–0,86. В работе А.В.Львова и А.Г.Николенко (2002) частота аллелей фрагмента гена дефензина ядерной ДНК в популяциях пчел на Урале распределялась более равномерно: аллель В встречался с частотой 0,25–0,45, а аллель А – 0,55–0,75. Для более детального сравнения можно показать, что работах А.В.Львова и А.Г.Николенко (2002) в западной и северо-восточной популяциях пчел на Урале частота встречаемости аллелей В и А фрагмента гена дефензина ядерной ДНК была 0,25 и 0,75, соответственно, в янаульской – 0,45 и 0,55, в бурзянской – 0,41 и 0,59, в иглинской – 0,32 и 0,68. В нашем исследовании в бурзянской и иглинской популяциях аллель В фрагмента гена дефензина ядерной ДНК встречался с частотой значительно меньшей таковых в работе А.В.Львова (2002). Различалось также распределение генотипов фрагмента гена дефензина ядерной ДНК в популяциях. В нашей работе генотип ВВ фрагмента гена дефензина ядерной ДНК встречался с частотой 0,06–0,11, генотип АА – 0,61–0,80, генотип АВ – 0,12–0,29, тогда как в работе А.В.Львова и А.Г.Николенко (2002) генотип ВВ встречался с частотой 0,00–0,28, генотип АА – 0,35–0,75, генотип АВ – 0,16–0,48.

Причину такого распределения аллелей и генотипов фрагмента гена дефензина ядерной ДНК на данный момент очень сложно однозначно объяснить, но можно предположить, что популяция пчел на Урале за несколько лет претерпела некоторые изменения, которые, возможно, связаны с особенностями организации и развития популяций пчел, как общественных насекомых, а также с глобальными изменениями экосистем и загрязнением окружающей среды.

Литература

1. Glinski Z., Jarosz J. Varoa jacobsoni as a carrier of bacterial infections to a recipient bee host. *Apidologie*. - 1992. - 23. - P. 25-31.
2. Hanzawa H., Shimada I., Kuzuhara T., Komano H., Kohda D., Inagaki F., Natori S., Arata Y. ¹H nuclear magnetic resonance study of the solution conformation of an antibacterial protein, sapecin // *FEBS Lett.* - 1990. - V. 269. - P. 413-420.
3. Casteels P., Ampe C., Jacobs F., Vaek M., Tempst P. Apidaecins: antibacterial peptides from honeybees // *EMBOJ.* - 1989. - V. 8. - P. 2387-2391.
4. Casteels-Josson K., Zhang W., Capaci T., Casteels P., Tempst P. Acute transcriptional response of the honeybee peptideantibiotics gene repertoire and required post-translational conversion of the precursor structures // *J. Biol. Chem.* - 1994. - V. 269. - P. 28569-28575.
5. Bilikova K., Gusui W., Simuth J. Isolation of a peptide fraction from honeybee royal jelly as a potential antifoulbrood factor // *Apidologie*. - 2001. - V. 32. - P. 275-283.

T. Motohashi¹, K. Takahashi¹, F. Watanabe¹, Y. Asoh¹, A. Komamine², N. Katsumasa¹

¹Tokyo University of Agriculture, Atsugi, Japan,

²Institute of Evolutionary Biology, Tokyo, Japan

motohasi@nodai.ac.jp

INTRODUCTION OF DWARF GENE *rolC* TO *PELARGONIUM* × *DOMESTICUM* cv. 'FLEECY CLOUD' via *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*

Pelargonium × *domesticum* (Geraniaceae) is horticultural ornamental plant and is produced by the conventional breeding among the species of *Pelargonium* originated in the southern part of Africa. These plants have various flower colors such as red, orange, pink, white, red-purple and so on and set larger flowers than those of the geraniums. Its inflorescence is setting at leaf axile of newly growing stems, therefore its stems elongate remarkably. So horticultural worth becomes down as growing. It is time-consuming to prune the stems or it causes environmental problems to treat dwarfing chemicals in order to improve this character. In Japan *Pelargonium* breeding has been very difficult since it does not readily get seeds by the cross pollination among the *Pelargonium* species and cultivars, and so it must need more efficient methods. Thus, we attempt to apply genetic engineering to breed *Pelargonium* × *domesticum*. We introduce *rolC* via *Agrobacterium tumefaciens* into *P. x domesticum* cv. 'Fleecy Cloud' and newly produced dwarf form.

A few studies on *Pelargonium* gene transformation have been done regarding an infection study on unknown *Pelargonium* species via *Agrobacterium rhizogenes* (Pellegrineschi *et al.* 1994, 1996), a study of gene transformation on introducing *phtA* to *P. x domesticum* cv. 'Dubonnet' by Boase *et al.* (1996, 1998) and on introducing *gus* and *nptII* to *P.* cv. 'Frensham' by Raj *et al.* (1997). However, these studies have not practically been a point of plant breeding because plant materials were unknown species and the introducing genes were marker genes. Therefore, there is significance of breeding dwarfism plants on *Pelargonium* by genetic engineering in standpoint of plant breeding.

The *rolC* is one of the genes of *Agrobacterium rhizogenes* plasmid maintain and the 12th Open Reading Frame in the TL-DNA region of *Agrobacterium rhizogenes*. Its effects of the *rolC* gene are (1)weaken of the apical meristem, (2)shorten the internodes, (3)miniaturize the flower size, and (4)reduce of the setting seeds number. If we can introduce successfully the *rolC* gene into the genomes of *P. x domesticum*, we can get the dwarf type of *P. x domesticum*.

RB

Fig. I. C
ing Fra
pro: pr
Califlo
sites of
site in t

or the 3
sterilize
were rin
and cut
supplem
off by s
and 500
on MS a
obtained

pBI121+
Tokyo).
by its na
gene wer

mycin an
supplem
spectroph
were for
were rins
g/l agaros
analysis.
mg/l NA/
ted dry fil
fotaxime a
C
ducing 25
cin. Then,
mented wi
transforme