

наибольшую урожайность кабачка получено в вариантах с использованием строка посева 25.04 – 89,7, 5.05 – 81,7 т/га – сорт Чаклун, что больше от контрольного варианта на 29,7 т/га и 21,7 т/га соответственно.

**Ключевые слова:** кабачок, урожайность, срок сева, фенологические фазы, биометрические параметры.

#### *Annotation*

**Chernetsky V.M., Palamarchuk I.I.**

#### **Summer squash yield capacity formation depending on the sowing terms in conditions of the Right-Bank Forest-Steppe of Ukraine**

*In conditions of the Right-bank forest-steppe of Ukraine the researches on the effect of sowing term on the yield capacity of summer squash fruit is carried out. It is determined that the optimal conditions for the growth, development, the formation of productive organs are formed under the sowing 25.04. On the plants of this period the largest number of leaves, fruits were formed, which contributed to the highest yield capacity of marketable fruits: the variety of Zolotyinka – 60.0, the variety Chaklun – 89.7 t/ha. During the late sowing terms (5.05, 15.05, 25.05), yield capacity of fruits of summer squash is significantly reduced. It is found that the highest yield capacity of summer squash was obtained in variants with the sowing term 25.04 – 89.7 5.05 – 81.7 t/ha of Chaklun variety which is higher in comparison with the control variant by 29.7 t / ha and 21.7 t / ha, accordingly.*

**Keywords:** summer squash, yield capacity, term of sowing, phenological phase, biometric parameters.

**УДК 633**

#### **СТВОРЕННЯ ПЛАЗМІДНОЇ КОНСТРУКЦІЇ ПРОТЕЇН-КІНАЗИ AtKIN10 ЗЛИТОЇ ІЗ RFP ДЛЯ ДОСЛІДЖЕННЯ КЛІТИННОЇ ЛОКАЛІЗАЦІЇ ЦЬОГО ФЕРМЕНТУ**

**О.Є. Краснопорова<sup>1</sup>, Д.О. Новожилов<sup>1</sup>, Я.Б. Блюм<sup>2</sup>, С.В. Ісаєнков<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Київський національний університет ім. Тараса Шевченка,

ННЦ «Інститут біології»

<sup>2</sup>Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН

*Проаналізовано описується процес клонування гена AtKIN10 та створення нової плазмідної конструкції рART7-KIN10-RFP, що продукує химерний злитий білок KIN10-RFP, для трансформації протопластів. В подальшому ця конструкція була використана для дослідження клітинної локалізації протеїн-кінази KIN10 та її можливих зв'язків з елементами цитоскелета.*

**Ключові слова:** протеїн-кіназа AtKIN10, плазмідна конструкція, химерний білок, протопласти.

Рослинні організми застосовують широкий спектр адаптаційних механізмів у відповідь на дію різних типів стресів. Вони живуть в умовах, що постійно змінюються. На відміну від тварин, рослини не можуть рухатися та вибирати собі місце з оптимальними для них умовами, тому вони повинні постійно пристосовуватися та адаптуватися до змін навколишнього середовища. Розуміння

цих механізмів адаптації може суттєво допомогти у створенні рослин стійких до дії стресів різної природи. Саме тому вивчення механізмів стійкості рослин до абіотичних та біотичних стресів є надзвичайно актуальним.

Зелені рослини є головними споживачами енергії сонця на Землі. На жаль, дуже мало відомо про те, як рослини адаптуються до темряви або як пристосовуються до інших абіотичних стресів навколишнього середовища. Рослинні організми використовують широкий спектр адаптивних механізмів для сприйняття стресів та формування відповідної відповіді.<sup>1,2</sup> Рослини реагують на дію стресових факторів за допомогою формування відповідних адаптивних реакцій та загальних стресових відповідей. Із швидким розвитком методів транскриптоміки та метаболоміки стало зрозуміло, що формування стресової відповіді є результатом складної мережі багатьох сигнальних каскадів.<sup>3</sup> І хоча механізми дії деяких стрес залежних сигнальних каскадів були вивчені в деталях, роль більшості із залишається невідомою.<sup>4</sup>

Відомо, що протеїн-кіназа KIN10 (AKIN10/At3g0190) з *Arabidopsis thaliana* є одним із головних регуляторів транскрипції у відповідь на дію низки стресових факторів різної природи, наприклад: темрява, дефіцит поживних речовин, пригнічений фотосинтез та ін.<sup>5-6</sup> Також було показано, що KIN10 грає ключову роль в регуляції анаболічних і катаболічних шляхів, що приймають участь у формуванні клітинної відповіді на дію стресових факторів, за умов нормального росту та розвитку.<sup>7</sup> Тому подальше дослідження механізмів дії протеїн-кінази KIN10 є важливим напрямком досліджень для глибшого розуміння молекулярної природи формування клітинної відповіді на дію різноманітних факторів.

Біоінформаційні дослідження каталітичного домену кіназ, що фосфорилують елементи цитоскелету, вказують на те що KIN10, можливо, приймає участь в фосфорилуванні мікротрубочок.

Для подальшого дослідження клітинної локалізації протеїн-кінази KIN10 та з'ясування її можливої функції у фосфорилуванні елементів цитоскелету було сконовано ген *AtKIN10* та відповідно до цього створено конструкцію *pART7-KIN10-RFP*, що продукує химерний злитий білок KIN10-RFP, для трансформації протопластів.

**Методика досліджень.** Рослини *Arabidopsis thaliana* були пророщені із насіння та росли в умовах культуральної кімнати при 22 °C та довжині світлового періоду 14 годин на добу при штучному освітленні. Рослини віком 6 – 8 тижнів використовувались для подальшого виділення протопластів із молодого листя.

Виділення та трансформацію протопластів проводили наступним чином:

Молоде листя арабідопсису поміщали на чашку Петрі із буфером для плазмолізу (500 мМ манітол, 10 мМ CaCl<sub>2</sub>, 10 мМ MES-KOH (pH 5,6)). Рослинний матеріал нарізали лезом тоненькими смужками. Нарізаний рослинний матеріал переміщували у нову чашку Петрі із ферментним розчином для арабідопсису (1% Cellulysin, 0,3% Macerase, 0,4 М манітол, 20 мМ MES-KOH (pH 5,6), 20 мМ KCl, 10 мМ CaCl<sub>2</sub>, 0,1% BSA) на 3 – 4 годин у темряві. Після цього, ферментний розчин із рослинним матеріалом фільтрували через нейлонову сітку та збирали у новій центрифужній пробірці об'ємом 50 мл. До 1 об'єму суспензії протопластів додавали 0,5 об'єму 200 мМ CaCl<sub>2</sub> та обережно перемішували. Суспензію протопластів осаджували центрифугуванням при 500 – 700 об/хв протягом 2 хв та

ресуспендували у 3 мл охолодженого середовища W5 (125мМ CaCl<sub>2</sub>, 154 мМ NaCl, 2 мМ MES-KOH (pH 5,6), 5 мМ KCl). Протопласти залишали інкубуватись на льодяній бані у темряві при горизонтальному положенні пробірки протягом 30 хв. Після цього протопласти осаджували центрифугуванням при 500 – 700 об/хв. 1 хв. та ресуспендували у тому ж самому об'ємі розчину МаМg (0,4 М манітол, 15 мМ MgCl<sub>2</sub>, 5 мМ MES-KOH (pH 5,6)). До окремих пробірок додавали 10мкл плазмідної ДНК (10 – 20 мкг), потім додавали 100мкл суспензії протопластів у розчині МаМg та обережно перемішували. В останню чергу до суміші ДНК із протопластами додавали 110 мкл розчину 110 μL of PEG-CMS (40% Поліетиленгліколю (PEG 4000, Fluka), 1 0,28 М манітол, 0,14 М Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). Суміш добре але обережно перемішували та залишали інкубуватись у темряві при 23°C протягом 20 хв. Після етапу інкубації до трансформаційної суміші поступово додавали інкубаційне середовище (0,6М манітол, 4мМ MES-KOH (Ph 5,7), 4мМ KCl, 3мМ CaCl<sub>2</sub>) за наступним алгоритмом: 0,5мл, 1мл, 2мл та в кінці 3мл та залишали інкубуватись у темряві близько 10 – 15 годин. На наступний день ефективність трансформації протопластів оцінювали за допомогою епіфлуоресцентного мікроскопа.

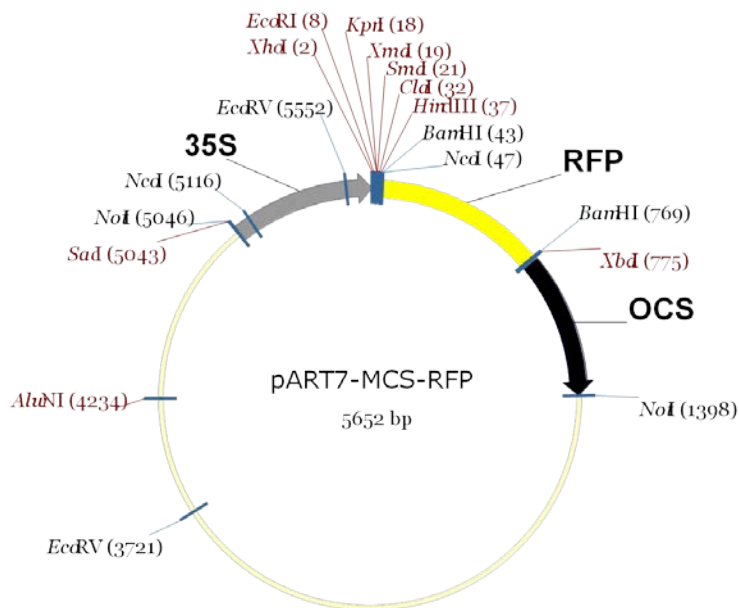
Клонування гену *AtKIN10* проводили із кДНК *Arabidopsis thaliana*. Для синтезу кДНК із проростків *Arabidopsis thaliana* була виділена загальна РНК. Виділення РНК проводили за допомогою TRIsol -реагенту (Invirogen) відповідно до протоколу рекомендованого компанією – виробником. Якість та цілісність виділеної РНК визначалась спектрофотометрично та за допомогою агарозного гелю електрофорезу. Синтез кДНК проводили у 20 мкл загального об'єму. Для реакції синтезу кДНК використовували 3 мкл загальної РНК, 2 мкл (5X First-Strand Buffer), 1мкл DTT (20 mM), 1 мкл dNTP Mix (10 mM), 1 мкл (dT25), 11мкл H<sub>2</sub>O. Реакційну суміш перемішували на вортексі та швидко осаджували на мікроцентрифузі. Мікропробірки із сумішшю інкубували 5 хвилин при 70°C, потім швидко охолоджували на льоду та добавляли по 1 мкл RevertAid M-MuLV Reverse Transcriptase (Fermentas). Мікропробірки із реакційними сумішами інкубувати при 42°C протягом 1,5 годин. Після цього ферментативну реакцію інактивували інкубацією при 72°C протягом 10 хвилин.

Кодуючу послідовність без стоп кодону *AtKIN10* було ампліфіковано із синтезованої кДНК за допомогою ПЛР із використанням відповідних праймерів, що містять XhoI та SmaI сайти рестрикції відповідно (KIN10XhoI\_for 5'-GCCTCGAGATGGATGGATCAGGCACAGG-3' та KIN10SmaI\_rev 5'-CGCCCGGGGAGGACTCGGAGCTGAGCAA-3'). Ампліфікаційний профіль із *Pfu* ДНК полімеразою (Fermentas) був наступний: початкова денатурація 95°C протягом 3 хв, наступні 35 циклів ампліфікації були виконані таким чином: 30 сек при 95°C, 30 сек при 56°C та 1 хв при 72°C, фінальна елонгація – при 72°C протягом 3 хв.

Після обробки відповідними рестриктазами та лужною фосфатазою, ДНК фрагменти бінарного вектору pART7-RFP (рис. 1.) та ПЛР-фрагмент *AtKIN10* розділяли за допомогою електрофорезу на 1% агарозному гелі (Рис. 2.) та у подальшому вирізали та виділяли із гелю.

Після виділення ДНК фрагментів із агарозного гелю за допомогою спеціалізованих китів, плазмідний вектор pART7-RFP, що був оброблений

відповідними рестриктазами та фосфатазою, використовували для подальшої реакції лігування (Fermentas T4 DNA Ligase) із ДНК фрагментом -KIN10 у співвідношенні 1:6.

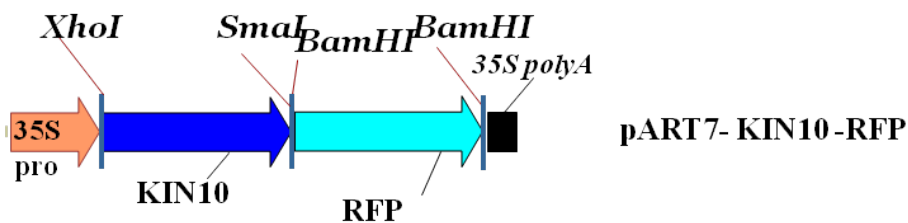


**Рис. 1. Бінарний плазмідний вектор pART7-RFP**



**Рис. 2. ПЦР-фрагмент протеїн-кінази KIN10 на агарозному гелі**

**Результати досліджень.** В ході клонування *AtKIN10* у pART7-RFP (рис. 3.) було проведено трансформацію компетентних клітин *E. coli* (*dH5a*). Компетентні клітини було трансформовано реакційними сумішами лігування. За рахунок створення стійкості до антибіотику у трансформованих бактерій плазмідною, що несе ген стійкості до ампіциліну, проводили первинну селекцію трансформантів.

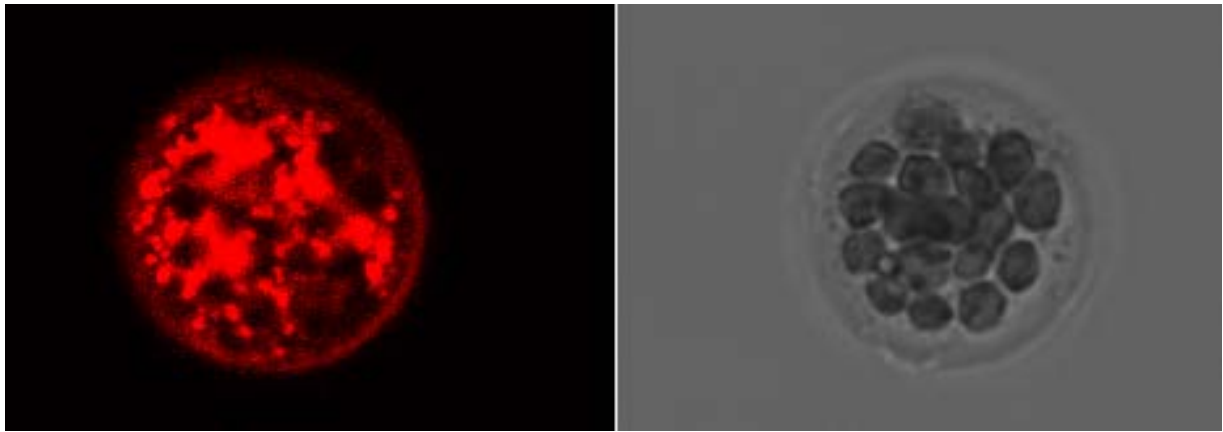


**Рис. 3. Плазмідна конструкція pART7-KIN10-RFP**

Із трансформованих колоній виділяли плазмідну ДНК. Було проведено аналіз та скринінг зразків плазмідної ДНК на присутність в них кДНК *AtKIN10*.

Позитивні клони було відібрано для подальшої ампліфікації та трансформації протопластів рослин. В ході трансформації протопластів була показана функціональність створеної нами плазмідної конструкції.

Близько 5% популяції трансформованих протопластів мало флуоресценцію (рис. 4). Такий підхід показує, що химерний білок RFP з кіназою *AtKIN10* може бути введений в клітини рослин за рахунок транз'єнтної експресії цього химерного гену.



**Рис. 4. Експресія KIN10-RFP в протопластах арабідопсису після трансформації вектором у рART7-*AtKIN10-RFP*.**

### **Висновки.**

В результаті проведених досліджень було показано внутрішньоклітинну локалізацію *AtKIN10*. Було з'ясовано, що *AtKIN10* є рівномірно розповсюджена у всьому об'ємі цитоплазми. Використання створеної *AtKIN10-RFP* конструкції може бути корисним знаряддям для подальшого вивчення клітинного сигналіngu та ролі цієї кінази у регуляції елементів цитоскелету. Створена векторна конструкція може бути використана для подальшого конструювання бінарного вектору для стабільної трансформації рослин.

### **СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ**

1. Yamaguchi-Shinozaki, K. & Shinozaki, K. Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57, 781 – 803 (2006).
2. Hasegawa, P. M., Bressan, R. A., Zhu, J. — K. & Bohnert, H. J. Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 57, 463 – 499 (2000).
3. Li, Y. et al. Establishing glucose- and ABA-regulated transcription networks in Arabidopsis by microarray analysis and promoter classification using a Relevance Vector Machine. *Genome Res.* 16, 414 – 427 (2006).
4. Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki 2006; Ma and Bohnert 2007.
5. Halford, N. G. et al. Metabolic signalling and carbon partitioning: role of Snf1-related (SnRK1) protein kinase. *J. Exp. Bot.* 54, 467 – 475 (2003).
6. Bhalerao, R. P. et al. Regulatory interaction of PRL1 WD protein with Arabidopsis SNF1-like protein kinases. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 96, 5322 – 5327 (1999).
7. Baena-González et al. 2007.

*Одержано 18.11.2013*

### *Аннотація*

*Краснопёрова Е.Е., Новожилов Д.О., Блюм Я.Б., Исаенков С.В.*

*Создание плазмидной конструкции протеин-киназы AtKIN10 слитной с RFP для исследования клеточной локализации этого фермента.*

*В этой работе была создана плазмидная конструкция pART7- AtKIN10-RFP, что продуцирует химерный белок KIN10-RFP. Эта конструкция была использована для изучения внутриклеточной локализации протеин-киназы AtKIN10. Было показано, что AtKIN10 равномерно распространена во всем объеме цитоплазмы, что указывает на ее участие в разнообразных внутриклеточных процессах фосфорилирования.*

**Ключевые слова:** протеин-киназа AtKIN10, плазмидная конструкция, химерный белок, протопласты.

#### **Annotation**

**Krasnoperova E. E., Novozhylov D.O., Blume Y. B., Isayenkov S. V.**

**Creating of the plasmid construction protein kinase AtKIN10, conjoint with RFP to study the cellular localization of this enzyme.**

*In this work the plasmid construct pART7--AtKIN10-RFP was created, which produces the chimeric protein KIN10-RFP. This construction was used to study the subcellular localization of protein kinase AtKIN10. It was detected distribution of RFP signal in the whole volume of the cytoplasm.*

**Key words:** protein kinase AtKIN10, plasmid construct, chimeric protein, protoplasts.

**УДК 332.33:332.64:167.22**

## **РІЗНОМАНІТНІСТЬ ҐРУНТОВОЇ БІОТИ В УМОВАХ ҐРУНТОВО-КЛІМАТИЧНИХ ЗОН ПОЛТАВСЬКОЇ ОБЛАСТІ**

**А.О. Тараненко, аспірант  
Полтавська державна аграрна академія**

*Проведено аналіз стану біологічного різноманіття ґрунту в різних ґрунтово-кліматичних зонах Полтавської області залежно від виду використання земель (природні кормові та сільськогосподарські угіддя).*

**Ключові слова:** біологічна різноманітність ґрунту, чисельність дощових черв'яків (*Lumbricina*), чисельність ногохвісток (*Collembola*), чисельність бактеріальної мікрофлори та мікрومیцетів, мікробіологічна активність ґрунту.

Родючість ґрунту визначається досить складним комплексом природних та антропогенних чинників, одним із найважливіших із поміж них є діяльність ґрунтової біоти [2]. Від її активності залежить нагромадження гумусу в ґрунті, мінералізація органічних речовин і перетворення важкодоступних сполук у доступні для рослин форми. За приблизними підрахунками [9], ґрунтові мікроорганізми щорічно засвоюють із повітря близько 100 млн. т азоту, сприяють фосфорному і калійному забезпеченню рослин, мінералізації органічного фосфору та перетворенню фосфорних солей у доступні для рослин форми. Окремі види бактерій беруть участь у відтворенні сульфатів та окисненні сірководню в ґрунті, виділяючи різні фізіологічно активні речовини (ауксин, гіберелін, вітаміни), що поліпшують ріст і розвиток рослин [3,7].

Незважаючи на високу пристосованість ґрунтової біоти до постійних змін навколишнього середовища, рівновага ценозів ґрунту порушується внаслідок