

9. Безуглий М.Д. Методи біотехнології відтворення сільськогосподарських тварин / М.Д.Безуглий.- Харків, 2002.- 155с.
10. Woods E.J. Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissue / E.J.Woods, J.D.Benson, Y.Aga, J.K.Crister // Cryobiology.- 2004.- Vol.48.- P.146-156.
11. Capacitation of bovine spermatozoa by oviduct fluid /Parrish J.J., Sushko-Parrish J.L., Handron R.R. et al. // Biol.Reprod.- 1989.- Vol.40.- P.1020-1025.
12. Relationship between the cell number and Quality of Day-8 bovine blastocysts /Ushijima M., Okuda M., Nakajama T. et al. // Proc. 3 rd East Jpn. Soc. Anim. Embr. Trans.- 1988.- №9.- P.37-38.
13. Лакин Г.Ф. Биометрия,- М.: Высшая школа, 1990.- 351 с.
14. Макарова З.Н. Роль культуральной среды в процессе получения эмбрионов коров вне организма / З.Н.Макарова, Т.Э.Позднякова, О.Е.Гузеватый // Бюл. науч. работ / ВНИИРГЖ.- 1985.- Вып.85.- С.27-29.
15. Hochi H. In vitro production of bovine embryos and their application for embryo transfer // Theriogenology.- 2003.- V.59, I.2.- P.553-697.
16. Use of media for commercial bovine embryo culture: equivalent development and pregnancy rates compared to co-culture / Lane N., Gardner D.K., Hasler M.J., Hasler J.F // Theriogenology.- 2003.- V.60, I.3.- P.407-419.

Резюме

Наведено результати експериментальних досліджень розвитку в різних культуральних системах ранніх ембріонів великої рогатої худоби, отриманих *in vitro* з деконсервованих ооцит-кумулюсних комплексів корів. Установлено, що застосування моношару клітин гранульози або кумулюса більш ефективно порівняно з кондиційованими середовищами для подальшого розвитку в умовах *in vitro* зигот великої рогатої худоби, отриманих з деконсервованих та дозрілих поза організмом ооцитів корів.

Приведены результаты экспериментальных исследований развития в различных культуральных системах ранних эмбрионов крупного рогатого скота, полученных *in vitro* из деконсервованных ооцит-кумулюсных комплексов коров. Установлено, что применение монослоя клеток гранулёзы или кумулюса более эффективно по сравнению с кондиционированными средами для последующего развития в условиях *in vitro* зигот крупного рогатого скота, полученных из деконсервованных и дозревших вне организма ооцитов коров.

Results of experimental researches of development in the various cultural systems of early bovine embryos used *in vitro* from frozen-thawed bovine oocyte-cumulus complexes are resulted. It's set that application of monolayer of granulose or cumulus cells more effectively comparatively with conditions mediums for subsequent development of *in vitro* bovine zygote, used from frozen-thawed and matured *in vitro* bovine oocytes.

КИЩЕНКО Е.М., БЕЛОКУРОВА В.Б., ПАТОН Е.Б., КУЧУК Н.В.

*Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины,
Украина, 03680, г. Киев, ул. Заболотного, 148, e-mail: iicb@iicb.kiev.ua*

ПРОСТРЕЛ ЧЕРНЕЮЩИЙ (*PULSATILLA NIGRICANS* STORCK) КАК ОБЪЕКТ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Прострел чернеющий (*Pulsatilla nigricans* Storck.) семейства лютиковых (Ranunculaceae) – сокращающийся в численности, уязвимый вид, занесенный в Красную Книгу Украины (2-я категория). Растения этого вида издавна использовались в народной медицине при различных нервных и сердечнососудистых заболеваниях. На сегодняшний день прострел не относят к официальным препаратам, хотя он достаточно популярен в гомеопатии и применяется при заболеваниях нервной системы, кровообращения, желудочно-кишечного тракта и воспалительных процессах. Биологически активные вещества,

обуславливающие лекарственное действие, у *P. nigricans* практически не исследованы [1]. Интенсивное изучение родственных видов *P. chinensis* (Bunge.) Reg. и *P. koreana* (Nakai.) привело к обнаружению в их корнях сапонинов люпанового и олеананового рядов, обладающих противоопухолевой активностью [2-6]. Разработка биотехнологических методов у *P. nigricans* представляет интерес, прежде всего, для сохранения и клонального размножения *in vitro* этого редкого растения, а так же для создания клеточных и корневых культур как источника сырья для получения фармакологически ценных веществ. В связи с этим целью работы было введение *P. nigricans* в асептическую культуру, изучение особенностей морфогенеза, создание культуры недифференцированных клеток *P. nigricans* и корневых трансгенных культур, трансформированных *Agrobacterium rhizogenes*.

Материалы и методы

Семена *P. nigricans* были предоставлены Банком зародышевой плазмы растений мировой флоры (ИКБГИ НАН Украины). Поверхностную стерилизацию семян проводили согласно разработанной ранее методике [7]. Для прорастания семян использовали питательную среду MS/2, в которой была вдвое уменьшена концентрация макросолей и сахарозы по сравнению с питательной средой MS [8] и добавлена гибберелловая кислота (1 мг/л). Асептические растения выращивали на безгормональной среде SH [9] при +24°C и 16 часовом световом периоде с интервалом субкультивирования три недели.

Для инициации первичного каллуса по срезам листовых эксплантов использовали несколько типов сред на базе минерального состава SH с добавлением разных комбинаций регуляторов роста: 1) 2 мг/л дикамба (DC2); 2) 2 мг/л дикамба и 1 мг/л 2-iP (DC2iP1); 3) 1 мг/л 2-iP (iP1); 4) 2 мг/л TDZ (TDZ2); 5) 2 мг/л TDZ и 1 мг/л NAA (TDZ2NAA1); 6) 1 мг/л TDZ и 1 мг/л NAA (TDZ1NAA1); 7) 2 мг/л BAP и 1 мг/л NAA (BAP2NAA1); 8) 1 мг/л BAP и 1 мг/л NAA (BAP1NAA1); 9) 2 мг/л 2,4-D, 0,5 мг/л NAA, 0,5 мг/л IAA и 0,2 мг/л кинетина (4x).

Для получения корневых трансгенных культур «hairy roots» проводили генетическую трансформацию, используя агропиновый штамм *Agrobacterium rhizogenes* A4. Ночную агробактериальную культуру осаждали, далее ресуспендировали питательной средой MS/2 с 0,2 mM ацетосерингона и инкубировали 2 часа на шейкере (200 об/мин), а затем проводили вакуум-инfiltrацию [10] листовых эксплантов, предварительно культивированных на питательной среде 4x в течение 3 дней. После infiltration экспланты оставляли на фильтровальной бумаге на 2 суток при рассеянном свете, а затем переносили на безгормональную среду SH с 500 мг/л цефотаксима для элиминации бактерий. Образовавшиеся корни отсекали и переносили на питательную среду того же состава.

ДНК из растительных тканей выделяли СТАВ-методом [11]. Реакцию амплификации ДНК проводили в термоциклере Mastercycler® personal (Eppendorf) с использованием пары праймеров, специфических к гену *rolB*: 5'ATGGATCCCAAATTG СТАТТСТТССАСГА3' и 5'TTAGGCTTCTTCTTCAGGTTTACTGCAGC3' (продукт амплификации 780 п.н.). Для ПЦР использовали следующую программу: денатурация 94°C/3 мин; 34 цикла (денатурация 94°C/30 с, отжиг 65°C/30 с, синтез 72°C/45 с); заключительный синтез 72°C/3 мин. Продукты амплификации фракционировали с помощью электрофореза в 0,7% агарозном геле в трис-бортном буфере.

Результаты и обсуждение

Проведенные исследования по введению *P. nigricans* в асептическую культуру показали, что проросток чернеющий обладает низкой всхожестью семян, и для прорастания *in vitro* необходимо присутствие гибберелловой кислоты в питательных средах. Эффективность прорастания составила около 10% на питательной среде MS/2 с добавлением гибберелловой кислоты (1 мг/л), на безгормональных же питательных средах семена не прорастали.

Асептические растения выращивали на безгормональной среде SH. При добавлении в питательную среду 0,5 мг/л BAP происходила пролиферация пазушных почек, что вызывало кущение побегов. Использование этой же питательной среды при культивировании листовых

эксплантов приводило к прямой регенерации побегов, формировавшихся преимущественно вдоль центральных жилок листков (рис. 1а).

При культивировании листовых эксплантов на питательных средах для каллусогенеза, содержащих только цитокинины (iP1, TDZ2) либо только ауксины (DC2), каллус не формировался (табл.). Низкая частота формирования и, в дальнейшем, медленный рост полученных каллусных культур, наблюдался при использовании питательных сред, в которых содержание ауксинов превышало содержание цитокининов (DC2iP1, 4x).

Таблица

Особенности образования каллуса листовыми эксплантами *P. nigricans* в зависимости от состава питательной среды

Среда	Частота образования каллуса, %	Тип каллуса
DC2	0	-
DC2iP1	20	белый, рассыпчатый, растет медленно
iP1	0	-
TDZ2	0	-
TDZ2NAA1	100	желто-зеленый, гранулярный, растет быстро, с высокой частотой формирует эмбриоидоподобные структуры
TDZ1NAA1	100	желто-зеленый, гранулярный, растет быстро
BAР2NAA1	75	зеленоватый, гранулярный, регенерация побегов
BAР1NAA1	75	зеленоватый, гранулярный, регенерация побегов
4x	20	темный, рассыпчатый, витрифицированный, растет медленно

Смещение гормонального баланса в сторону цитокининов приводило к формированию морфогенного каллуса. При использовании питательных сред BAР2NAA1 и BAР1NAA1 наблюдали непрямую регенерацию, частота которой составляла около 25% (отношение регенерирующих эксплантов к их общему количеству). При использовании сред TDZ2NAA1 и TDZ1NAA1 формировался первичный гранулярный быстрорастущий каллус желто-зеленого цвета. При дальнейшем культивировании на тех же средах каллус формировал эмбриоидоподобные структуры (рис. 1б), в количестве 16-20 на чашку Петри за пассаж. Эмбриоидоподобные структуры развивались в побеги с частотой 80% лишь при переносе их на питательную среду SH с 0,4 мг/л гибберелловой кислоты. Полученные результаты указывают на различие между действием TDZ и BAР на морфогенез прострела чернеющего. Хотя TDZ по своему морфофизиологическому воздействию на растения относят к цитокининам [12], он может стимулировать соматический эмбриогенез подобно ауксинам, как было показано для некоторых видов [13-17].

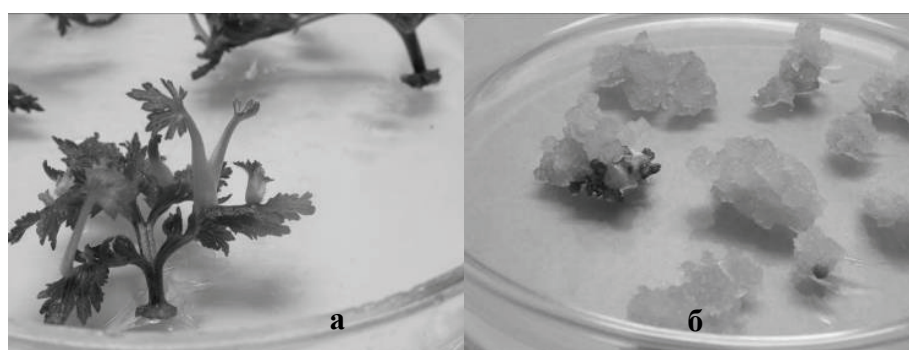


Рис. 1. Морфогенез прострела чернеющего в культуре *in vitro*: прямой органогенез (а) и формирование эмбриоидоподобных структур (б).

Переход к неорганизованному росту в условиях *in vitro* может сопровождаться снижением интенсивности вторичного биосинтеза и/или изменением спектра синтезированных веществ [18], тогда как уровень синтеза и накопления вторичных метаболитов в «hairy roots» культурах обычно стабилен и соответствует интактному растению

или даже превышает его [19]. Поэтому следующим этапом нашей работы было получение корневых трансгенных культур прострела чернеющего.

Генетическую трансформацию растений *P. nigricans* проводили с помощью агробактерий агропинового штамма *A. rhizogenes* A4. Прекультивирование эксплантов на питательной среде 4х способствовало повышению эффективности генетической трансформации (отношение количества эксплантов, формировавших корни после агробактериальной трансформации, к суммарному количеству эксплантов). Было обнаружено, что *P. nigricans* является довольно устойчивой к заражению агробактериями, т.к. корни формировались с частотой 0-20% в зависимости от опыта (в среднем около 5%). Образовавшиеся корни переносили на безгормональную среду SH с цефотаксимом, где они медленно росли. Большая часть из них прекращала рост после 2-3 месяцев культивирования, тем не менее нам удалось отобрать 6 клонов, способных расти на безгормональной питательной среде. Полученные корни не имели типичного фенотипа «бородатых корней», хотя и характеризовались отсутствием положительного геотропизма (рис. 2а). Для подтверждения переноса TL-фрагмента T-ДНК плазмиды pRi проводили ПЦР суммарной ДНК, выделенной из 3 образцов корневых культур, с использованием праймеров, специфических к гену *rolB*. В результате амплификации фрагмент ДНК ожидаемого размера (780 п.н.) дали 2 пробы. Проведенный анализ позволяет сделать вывод о трансгенной природе полученных клонов.

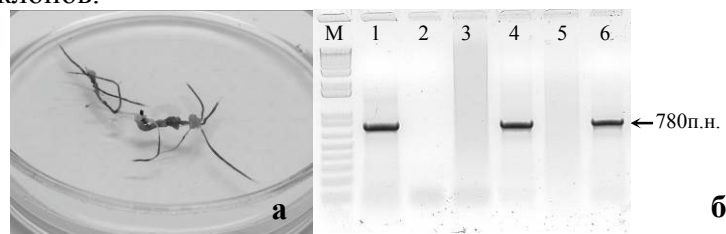


Рис. 2. Корневая культура *P. nigricans*, полученная после трансформации *A. rhizogenes* (а), и ПЦР-анализ корневых культур с использованием праймеров к *rolB* гену (б). М - ДНК-маркер (Invitrogen, 1 Kb Plus DNA Ladder), 1 – положительный контроль, суммарная агробактериальная ДНК, 2 – отрицательный контроль без ДНК-матрицы, 3 – ДНК исходного растения, 4 - 6 – ДНК трансформированных корневых культур

Выводы

В ходе проведенного исследования прострел чернеющий (*P. nigricans* Storck.) был введен в асептическую культуру. При изучении процессов морфогенеза было выявлено различие между действием цитокининов TDZ и ВАР на каллусную культуру прострела: в первом случае регенерация происходила путем соматического эмбриогенеза, во втором - побегообразования. Были созданы культуры недифференцированных клеток и корневые трансгенные культуры *P. nigricans*, трансформированные *A. rhizogenes*. Интеграция *rolB* гена подтверждена с помощью ПЦР анализа.

Работа выполнена в рамках проекта «Створення та застосування клітинних культур-продуцентів для отримання антимікробних та антигрибкових речовин рослинного походження» комплексной программы НАН Украины «Новітні медико-біологічні проблеми та навколишнє середовище людини».

Литература

1. Філь У.Г. До хімічного вивчення сону чорніючого // Фармакологічний журнал. – 1962. – т. 17, №5. – С. 47-51.
2. Ye W., He A., Zhao S., Che C.T. Pulsatilloside C from the roots of *Pulsatilla chinensis* // J. Nat. Prod. - 1998. – vol. 61, № 5. – P. 658-659.
3. Ye W., Zhang Q., Hsiao W.W., Zhao S., Che C.T. New lupane glycosides from *Pulsatilla chinensis* // Planta Med. – 2002. – vol. 68, № 2. – P. 183-186.
4. Kim Y., Kim S.B., You Y.J., Ahn B.Z. Deoxypodophyllotoxin; the cytotoxic and antiangiogenic component from *Pulsatilla koreana* // Planta Med. – 2002. – vol. 68, № 3. – P. 271-274.

5. Kim Y., Bang S.C., Lee J.H., Ahn B.Z. Pulsatilla saponin D: the antitumor principle from *Pulsatilla koreana* // Arch. Pharm. Res. – 2004. – vol. 27, № 9. – P. 915-918.
6. Bang S.C., Lee J.H., Song G.Y., Kim D.H., Yoon M.Y., Ahn B.Z. Antitumor activity of *Pulsatilla koreana* saponins and their structure-activity relationship // Chem. Pharm. Bull. (Tokyo). – 2005. – vol. 53, № 11. – P. 1451-1454.
7. Белокурова В.Б., Листван Е.В., Майстров П.Д., Сикура Й.Й., Глеба Ю.Ю., Кучук Н.В. Использование методов биотехнологии растений для сохранения и изучения биоразнообразия мировой флоры. // Цитология и генетика. – 2005. - №14. - с. 41-51.
8. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. - 1962. – Vol. 15. - P. 473-497.
9. Schenk R.U., Hilderbrandt A.C. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures // Can. J. Bot. - 1972.- Vol. 50. - P. 199-204.
10. Kapila J., De Rycke R., Van Montagu M., Angenon G. An *Agrobacterium*-mediated transient gene expression system for intact leaves // Plant Sci. – 1997. – vol. 122. – P. 101-108.
11. Генная инженерия растений. Лабораторное руководство: Пер. с англ. / Под ред. Дж. Дрейнера, Р. Скотта, Ф. Армидиджа, Р. Уолдена. – М.: Мир, 1991. – 408 с.
12. Murthy B.N.S., Murch S.J., Saxena P.K. Thidiazuron: a potent regulator of *in vitro* plant morphogenesis // In Vitro Cell Dev. Biol. – 1998. – vol. 34. – P. 267–275.
13. Rugkhla A., Jones M.G.K. Somatic embryogenesis and plantlet formation in *Santalum album* and *S. spicatum* // J. Exp. Bot. – 1998. - vol. 49. – P. 563–571.
14. Dolendro Singh N., Sahoo L., Sarin N.B., Jaiwal P.K. The effect of TDZ on organogenesis and somatic embryogenesis in pigeonpea (*Cajanus cajan* L. Millsp) // Plant Sci. – 2003. – vol. 164. – P. 341–347.
15. Vila S., Gonzalez A., Rey H., Mroginski L. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature zygotic embryos of *Melia azedarach* (Meliaceae) // In Vitro Cell Dev. Biol. Plant. – 2003. – vol. 39. – P. 283–287.
16. Haensch K.-T. Thidiazuron-induced morphogenetic response in petiole cultures of *Pelargonium x hortorum* and *Pelargonium x domesticum* and its histological analysis // Plant Cell Rep. – 2004.- vol. 23. – P. :211–217.
17. Jones M.P.A., Yi Zh., Murch S.J., Saxena P.K. Thidiazuron-induced regeneration of *Echinacea purpurea* L.: Micropropagation in solid and liquid culture systems // Plant Cell Rep. – 2007. – vol. 26. – P. 13–19.
18. Кунах В.А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи Моногр. /; НАН України. Ін-т молекуляр. біології і генетики. — К.: Логос, 2005. — 724 с.
19. Christen P., Roberts M.F., Phillipson J.D. and Evans W.C. High-yield production of tropane alkaloids by hairy-root cultures of *Datura candida* hybrid // Plant Cell Rep. – 1989. – Vol. 8, № 2. – P. 75-77.

Резюме

Создана асептическая культура прострела чернеющего (*Pulsatilla nigricans* Storck.) и изучены особенности морфогенеза *in vitro*. Получены культуры недифференцированных клеток и корневые трансгенные культуры, трансформированные *Agrobacterium rhizogenes*.

Створено асептичну культуру соню чорніючого (*Pulsatilla nigricans* Storck.) та досліджено особливості морфогенезу *in vitro*. Отримано культури недиференційованих клітин та кореневі трансгенні культури, які були трансформовані *Agrobacterium rhizogenes*.

Pasqueflower (*Pulsatilla nigricans* Storck.) aseptic culture was created and peculiarities of its morphogenesis *in vitro* were investigated. Undifferentiated cell cultures and hairy roots transformed with *Agrobacterium rhizogenes* were obtained.