

6. Stice S.L., Robl J.M. Nuclear reprogramming in nuclear transplant rabbit embryos // Biol. Reprod.— 1988.— №39 (3).— P. 657–664.

7. Ковтун С.І. Одержання зародків свиней *in vitro*: стан та перспективи використання / С.І. Ковтун // Вісн. аграр. науки.— 2004.— №5.— С. 52–54.

8. Щит И.Ю., Кузнецов А.В., Каурова С.А. и др. Негативное действие экзогенной ДНК на оплодотворение // Проблемы репродукции.— 1998.— №4.— С. 5–10.

Резюме

Обсуждается эффективность получения эмбрионов кроликов *in vitro* с использованием эпидидимальных сперматозоидов для оплодотворения яйцеклеток вне организма. Установлено, что высокий уровень формирования эмбрионов кроликов *in vitro* позволяет использовать их в исследованиях по трансгенезу и клонированию животных.

Обговорюється ефективність одержання ембріонів кролів *in vitro* з використанням епідидимальних сперматозоїдів для запліднення яйцеклітин поза організмом. Встановлено, що високий рівень формування ембріонів кролів *in vitro* дозволяє застосовувати їх у дослідженнях з трансгенезу та клонування тварин.

It is discussed effects of production rabbit embryo *in vitro* with using epididymal spermatozoa for *in vitro* ova fertilization. It is set high level forming *in vitro* rabbit embryos allows to using them in researches of animal transgenic and cloning.

КОЛОМІЄЦЬ Ю.В.¹, БУЦЕНКО Л.М.²

¹ Національний університет біоресурсів і природокористування України, Україна, 03041, Київ, вул. Героїв Оборони, 15, e-mail: julyja@i.ua

² Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, Україна, Д 03680, Київ, вул. Заболотного, 154, e-mail: plant_path@ukr.net

КАЛЮСОГЕНЕЗ *IN VITRO* ПШЕНИЦІ ЯРОЇ: ПЕРЕДУМОВИ КУЛЬТИВУВАННЯ КЛІТИН І РЕПРОДУКЦІЇ РОСЛИН-РЕГЕНЕРАНТІВ

Найпріоритетнішим завданням усіх цивілізованих країн є забезпечення своїх громадян продуктами харчування, вживання яких у фізіологічно необхідних нормах і асортименті сприяє нормальному функціонуванню організму та його працездатності. З багатющого набору продуктів харчування, що входять до споживчого кошика, найбільшої уваги заслуговують зернові культури, адже їхнє безпосереднє споживання та споживання продуктів їхньої переробки посідають чільне місце у раціоні харчування людини. Саме до таких культур належить пшениця.

Пшениця займає провідне місце серед оброблених у всьому світі культур за посівними площами. Таке її розповсюдження пояснюється високою поживністю та можливістю різностороннього використання і переробки. Зерно пшениці використовується для виготовлення найбільш масових про-

дуктів повсякденного харчування населення, таких як хлібобулочні, борошняні, кондитерські, макаронні вироби, крупи, екструдовані продукти і інші вироби, отримані на основі борошна. Якість зерна — це сукупність біологічних, фізико-хімічних, технологічних і споживчих властивостей зерна, що визначають його придатність до використання на продовольчі потреби. Масло зародків пшениці містить понад 75% тригліцеридів різних жирних кислот, до 6% вільних жирних кислот та до 4% гліколіпідів і фосфоліпідів. Вміст поліненасичених жирних кислот понад 70%, при цьому співвідношення лінолевої і ліноленової кислот 3:1, що є найоптимальнішим для ліпідного обміну в організмі. Масло також містить міристинову, олеїнову, ерукову і близько 10 нуклеїнових кислот. Ніби сама природа сконцентрувала унікальний збалансований комплекс біологічно активних речовин, вітамінів, ліпідів, незамінних амінокислот і мінералів для відновлення життя [9].

В теперішній час для вирішення прикладних завдань селекції цінних сільськогосподарських рослин [2, 4, 8] і зокрема ярої пшениці — основного хлібного злаку [1, 6, 9], широко використовуються біотехнологічні методи культури *in vitro*, зокрема регенерація рослин в морфогенних калюсних культурах *in vitro*. Сучасна біотехнологія кардинально змінює процес селекційної роботи щодо виведення нових високопродуктивних гібридних ліній і сортів ярої пшениці. Практичне значення більшості методів культури *in vitro* визначається утворенням на кінцевому етапі повноцінних фертильних рослин-регенерантів.

Основна проблема, пов'язана з розробкою ефективної біотехнології масового стабільного отримання фертильних рослин-регенерантів, полягає в їхньому низькому виході. Вирішення цієї проблеми безпосередньо пов'язане з виявленням шляхів морфогенезу *in vitro* калюсів на живильному середовищі для регенерації і можливістю регуляції цих шляхів в контрольованих експериментальних умовах *in vitro*.

Пшениця, як і всі злаки, належить до групи гормонзалежних об'єктів культивування *in vitro*. Підбір оптимальної концентрації певних гормонів, що вводяться до складу живильного середовища, — один з ключових етапів в роботі з культурою *in vitro*.

Метою нашої роботи було отримання морфогенного калюсу, рослин-регенерантів та визначення жирнокислотного складу ліпідів калюсних тканин пшениці сорту Рання 93, що буде слугувати підґрунтям для подальших досліджень з підвищення адаптивних властивостей та продуктивності пшениці.

Матеріали і методи

Об'єктами досліджень були калюсні тканини пшениці сорту Рання 93. Для одержання первинного калюсу як експлантат використовували дозріле насіння, апікальні ділянки асептичного коріння і листкові експлантати. Насіння стерилізували 5 хв. в 70%-вому розчині спирту, потім 20 хв. в 16,5% розчині пероксиду водню, далі насіння занурювали у спирт і обпалювали двічі в полум'ї. Для індукції калюсогенезу простерилізоване насіння висад-

жували на модифіковані середовища Мурасіге-Скуга (МС) [12], які містили 0,5 мг/л 6-бензиламінопурину (6-БАП), 3,0 мг/л 2,4-дихлорфеноксіцтової кислоти (МС1); 2,0–4,0 мг/л 2,4-дихлорфеноксіцтової кислоти, 150 мг/л *l*-аспарагіну, 146 мг/л глютаміну (МС2). Для використання як експлантатів апікальних ділянок коріння заздалегідь вирощували 4–5-денні асептичні проростки пшениці на безгормональному середовищі МС в темряві при 25 ± 1 °С. Потім видаляли апікальні сегменти коріння завдовжки 1–1,5 см і переносили їх на середовище МС для індукції калусогенезу. У разі використання листових експлантатів вирощували асептичні проростки на безгормональному середовищі МС протягом 5–7 днів та в асептичних умовах з колеоптиля вичленяли первинний лист. Для культивування застосовували його базальну частину розміром 1–1,5 см. Експлантати вирощували при 26 °С в темряві протягом 10–14 діб. Після утворення первинного калюсу продовжували інкубування при освітленні 2 клк і 16-годинному фотоперіоді. Частоту індукції калусогенезу (у відсотках) визначали як відношення числа експлантатів, що утворили калус, до початкової кількості експлантатів. Для індукції морфогенезу калус, отриманий на різних експлантатах, переносили на регенераційне середовище МС, доповнене 2 мг/л 6-БАП і 1,0 мг/л індоліцтової кислоти.

Ліпіди з калусних клітин екстрагували сумішшю хлороформ-метанол-вода (1:2:0,8). Жирно-кислотний склад ліпідів калусних тканин вивчали методом газорідинної хроматографії їхніх метилових ефірів [5, 11]. Для одержання метилових ефірів жирних кислот висушені ліпіди суспендували в 5 мл метанолу, що містив 1,5% H_2SO_4 . Метилування здійснювали в запаяних ампулах при 80 °С протягом 1 год. Метилові ефіри жирних кислот екстрагували сумішшю ефір-гексан (1:1). Проби перемішували та, після їхнього розшарування, відбирали верхню фракцію, яка містить метилові ефіри жирних кислот. Екстракцію здійснювали тричі. Одержані екстракти об'єднували і упарювали на вакуумному роторному випаровувачі.

Результати і обговорення

У досліджах ми використовували різні типи експлантатів для отримання первинного калюсу: зрілі зародки, апікальні ділянки асептичного коріння і листові експлантати. На всіх типах експлантатів формувався калус, але з різною частотою — від 9 до 100%. Зрілі зародки і апікальні ділянки асептичного коріння були ефективнішими експлантатами для отримання первинного калюсу в порівнянні з первинним листям. Частота індукції калусоутворення при використанні листових експлантатів була мінімальною і становила 9,2–24,2%. При цьому найвищий відсоток калусоутворення спостерігали на середовищі МС1. При формуванні первинного калюсу із зрілих зародків частота калусогенезу на середовищі МС1 була 100%, при цьому приріст калусної маси становив 410 мг, тоді як на середовищі МС2 — 198 мг. При використанні коріння як первинного експлантату максимальна частота калусогенезу становила 87%. Отже, тип експлантату визначає максимальні і мінімальні показники частоти калусогенезу.

За використання різних типів експлантатів встановлені відмінності в типах і швидкості формування первинного калюсу. Початок калюсогенезу при формуванні калюсних тканин з асептичного коріння відбувався найшвидше — на 2–5 добу з дня перенесення на середовище для культивування. За культивування насіння на поверхні живильного середовища протягом перших трьох днів спостерігали значне його набухання. На четвертий день культивування в районі щитка у 33% експлантатів відмічали початок калюсоутворення, а на 10 добу калюс утворювався у 100% експлантатів. Довше за все формувалася калюс з листових експлантатів — на 30–35 добу. Відмінності зафіксовані також за ступенем оводненості, щільності, кольору, наявності елементів диференціювання і прояву морфогенетичного потенціалу.

З асептичного коріння формувалася сильно оводнений рихлий майже прозорий злегка білуватий калюс (рис. 1). Із зрілих зародків — щільніший менш оводнений жовтуватий калюс (рис. 2), що характеризується наявністю елементів диференціації. Такого ж типу калюс — щільний і жовтуватий, формувалася при використанні в якості експлантатів первинних листків.

У подальших дослідженнях при перенесенні калюсних тканин, сформованих з різних експлантатів, на середовище для індукції морфогенезу встановлено відмінності в морфогенетичному потенціалі різних типів калюсу. Щільний жовтуватий морфогенетичний калюс, сформований із зрілих зародків, характеризувався регенераційною здатністю. На 10–15 добу культивування на середовищі для регенерації було відмічено формування проростків і коріння. Частота регенерації становила 65,9–75,0%. Морфогенез прозорого гомогенного рихлого калюсу, сформованого з асептичного коріння, відбувався лише по шляху інтенсивного формування коріння. Багатьма дослідниками відмічено, що такий тип морфогенезу не є регенераційно здатним, тобто надалі неможливе формування повноцінних фертильних рослин-регенерантів [3, 7, 10].

Наступним етапом нашої роботи було вивчення жирнокислотного складу ліпідів калюсних тканин пшениці сорту Рання 93. Ліпіди калюсних тканин пшениці характеризувалися наявністю жирних кислот з числом вуглецевих атомів від C_{15} до C_{24} . Серед них насичені (тетрадеканова, пентадеканова, гексадеканова, октадеканова, ейкозанова, докозанова, тетракозанова),



Рис. 1. Рихлий калюс з асептичного коріння

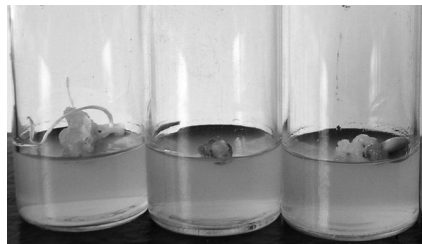


Рис. 2. Щільний, жовтуватий калюс із зрілих зародків

мононенасичені (гексадеценава, *cis*-октадеценава, *trans*-октадеценава), диненасичені (9,12-октадекадієнова) жирні кислоти. В ліпідах калюсних клітин виявлені жирні кислоти переважно з парним числом вуглецевих атомів. Ліпіди характеризуються високим вмістом ненасичених кислот. Вміст мононенасичених жирних кислот становив 21,9%, диненасиченої кислоти — 43,7%. Серед мононенасичених кислот переважала *cis*-октадеценава кислота (18,6%). Сумарний вміст насичених кислот становив 34,4%. Основною кислотою серед насичених є гексадеканова кислота — 27,7%, вміст інших кислот не перевищував 1,9%.

Висновки

Вид обраного експлантату визначає тип сформованого калюсу: зрілі зародки і листові експлантати формують компактний гетерогенний калюс, що володіє морфогенним потенціалом; асептичне коріння — дає початок рихлому гомогенному калюсу, не здатному до повноцінної регенерації. У ліпідах калюсної тканини пшениці сорту Рання 93 основними жирними кислотами є гексадеканова, 9,12-октадекадієнова та *cis*-октадеценава.

Література

1. *Анапьяев Б.Б.* Культура микроспор и гаплоидная биотехнология пшеницы.— Алматы: Гылым, 2001.— 220 с.
2. *Атанасов А.А.* Биотехнология в растениеводстве.— Новосибирск: Наука, 1993.— 242 с.
3. *Бавол А.В., Дубровная О.В., Лялько И.И.* Регенерация растений из различных типов экплантов мягкой пшеницы // Физиология и биохимия культ. растений.— 2008.— Т.40, №2.— С. 150–156.
4. *Бутенко Р.Г.* Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе.— М.: ФБК-ПРЕСС, 1999.— 160 с.
5. *Жеребило О.Е., Вишталюк Н.М.* Жирные кислоты общих липидов некоторых представителей рода других энтеробактерий // Микробиол. журн.— 1987.— 49, №6.— С. 83–85.
6. *Круглова Н.Н., Батыгина Т.Б., Горбунова В.Ю., Титова Г.Е., Сельдмирова О.А.* Эмбриологические основы андроклинии пшеницы.— М.: Наука, 2005.— 99 с.
7. *Круглова Н.Н., Зайнутдинова Э.М.* Андроклинийный каллус пшеницы в динамике развития: цитолого-гистологический анализ // Вестник Башкирского университета.— 2001.— №2 (1).— С. 137–141.
8. *Лутова Л.А.* Биотехнология высших растений.— СПб.: Изд-во Санкт-Петербургск. ун-та, 2003.— 227 с.
9. *Рахимбаев И.Р., Тивари Ш., Бишимбаева Н.К., Кушнарченко С.В.* Биотехнология зерновых культур. Алма-Ата: Гылым, 1992.— 240 с.
10. *Чеченева Т.Н.* Изменчивость злаков в культуре *in vitro* и в процессе регенерации растений // Физиология и биохимия культ. растений.— 2006.— Т.38, №2.— С. 163–175.
11. *Brian B.L., Gardner E.W.* Preparation of bacterial fatty acid methyl esters for rapid characterization by gasliquid chromatography // Appl. Microbiol.— 1967.— 15, №6.— P. 1499–1500.
12. *Murasige T., Scoog F.* A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // Physiol. plant.— 1962.— 15.— P. 473–497.

Резюме

Досліджено процеси індукції калусогенезу ярої пшениці (*Triticum aestivum* L.) сорту Рання 93. Показано, що ефективність процесу та тип калусної тканини обумовлені обраним експлантатом. Встановлено, що морфогенний потенціал проявляють калуси зі зрілих зародків та листових експлантатів. Показано, що в ліпідах калусних тканин основними жирними кислотами є гексадеканова, 9,12-октадеканова, *cis*-октадеценева.

Исследованы процессы индукции каллусогенеза ярой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Ранняя 93. Показано, что эффективность процесса и тип каллусной ткани обусловлены выбранным эксплантатом. Установлено, что морфогенетическим потенциалом обладают каллусы из зрелых зародышей и листовых эксплантатов. Показано, что в липидах каллусных тканей главными жирными кислотами были гексадекановая, 9,12-октадекадиеновая, *cis*-октадеценевая.

The processes of callusogenesis induction of spring wheat *Triticum aestivum* L., cultivar Rannja 93 were investigated. It was shown that callusogenesis and the type of callus tissue were caused by the type of explants. It was established that the callus from mature germs and leaf explants had morphogenetic potential. It is shown, that in callus tissue lipids the main fat acids were hexadecanoic, 9,12-octadecadienoic, *cis*-octadecenoic.

КОЧУБЕЙ Т.О., ШВЕНЬ О.О, АНДРІЄНКО В.І., КАРПОВА І.С, ЛУКАШ Л.Л.
*Інститут молекулярної біології та генетики НАН України,
Україна, 03143, Київ, вул. Заболотного, 150, E-mail: lukash@imbg.org.ua*

ІНДУКЦІЯ АПОПТИЧНИХ ЗМІН У КУЛЬТУРАХ КЛІТИН ССАВЦІВ СУМАРНИМ ПРЕПАРАТОМ ФГА ТА ЙОГО ІЗОФОРМАМИ

Відомо, що вуглевод-білкові взаємодії лежать у основі багатьох біологічних процесів і саме тому лектини широко використовуються для вирішення цілого ряду фармакологічних, біотехнологічних, гістологічних та інших питань біології. Широке застосування лектинів на практиці спонукає і розвиток наукових досліджень у цій галузі. Актуальними стають роботи з вивчення впливу цієї групи білків на мутаційний процес та репарацію, проліферацію та апоптоз [1–2].

Показано, що деякі лектини здатні виступати не лише у якості мітогенів, а й мають цитотоксичну активність. Раніше нами було показано здатність лектинів рослинного та тваринного походження дозозалежно впливати на проліферацію клітин ссавців та індукувати апоптичні зміни [3]. І хоча для деяких лектинів описані лектинасоційовані ензиматичні активності [4], завдяки яким вони здатні безпосередньо взаємодіяти з макромолекулами у клітині, більшість з них все ж таки реалізує свою активність опосередковано, через взаємодію з вуглеводними детермінантами на поверхні клітинної мембрани. Тож вуглеводна специфічність лектину, його молекулярна будова