

Выводы

Получен аналог кисломолочного продукта на основе зерна ячменя путем приготовления на его основе ферментативного гидролизата, поочередного (с интервалом 6 ч) высева заквасок *Bifidum adolescentis* и *Lactobacillus acidophilus* и культивирования в течение 20 ч.

Литература

1. *Капрельяну Л.В., Киселев С.В.* Функциональная пища из зерновых// Пищевая промышленность, 1999. - №7. – С. 40-42.
2. *Капрельяну Л.В., Йоргачова К.Г.* Функціональні продукти. – Одеса.: Друк, 2003. – 312 с.
3. *Красникова Л.В. и др.* Бифидобактерии и использование их в молочной промышленности//Л.В.Красникова, И.В.Салахова, В.И.Шаробайко, Т.М.Эрвольдер //АгроНИИТЭИ мясомолпрома. – 1991. – 342 с.
4. *Егорова А.В.* разработка технологии производства безлактозного зернового продукта: Автореф. дис....канд.техн.наук. – Одесса, 1996. – 24 с.

Резюме

Разработаны биотехнологические основы производства безлактозного зернового продукта путем ферментативного гидролиза шелушенного зерна ячменя, высева и культивирования заквасок *Bifidum adolescentis* и *Lactobacillus acidophilus*.

Розроблено біотехнологічні основи виробництва безлактозного зернового продукту шляхом ферментативного гідролізу лущеного зерна ячменю, висіву і культивування заквасок *Bifidum adolescentis* и *Lactobacillus acidophilus*.

They had been elaborating the biotecnology basis of processing of a lactose's free grain product by fermentative hydrolysis of grain and cultivating of *Bifidum adolescentis* и *Lactobacillus acidophilus*.

СМЕЦЬ А.І., ПАХОМОВ О.В., РАДЧУК В.В., БЛЮМ Я.Б.

*Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України
вул. акад. Заболотного, 148, 03680, Київ, Україна, e-mail: alyemets@univ.kiev.ua*

БІОЛІСТИЧНА ТРАНСФОРМАЦІЯ СОЇ *Glycine max* (L.) ГЕНОМ СТІЙКОСТІ ДО ДІНІТРОАНІЛІНОВИХ ГЕРБІЦИДІВ

Соя є однією з найважливіших сільськогосподарських культур у світі завдяки високому вмісту висоякісного по амінокислотному складу рослинного білку, подібного до тваринного, який в середньому складає близько 40% від маси насіння, а у деяких сортів сягає 67,5%. Більш того, соя цінна тим, що її насіння містить приблизно 23% жирів і до 35% вуглеводів (Steinke, 1991). Завдяки цим поживним характеристикам соя входить до складу широкого кола продуктів харчування людини та до складу деяких кормів для тварин. У зв'язку із зростаючим інтересом до вирощування сої в Україні, стає надзвичайно актуальним використання сучасних генетичних підходів щодо покращення господарсько цінних ознак сої української селекції, зокрема стійкості до гербіцидів, що може призвести до значного збільшення врожаїв даної культури.

Хоча в 1995 р. компанія «Монсанто» ввела в обіг генетично модифіковану сою, яка містить повну копію гена енолпіруватшкіматфосфатсинтетази із ґрунтової бактерії *Agrobacterium*, що забезпечує стійкість до гліфосату (раундап), існує декілька інших класів гербіцидів, широко вживаних у сільському господарстві, до яких соя є чутливою. Зокрема, одним із таких класів, порушників мітозу, є динітроаніліни, до котрих належать такі відомі гербіциди, як трифлуралін (трефлан, нітран) та споріднені з ним пендаметалін (стомп, проул), нітралін та оризалін (Мельников, 1987; Брицун та інш., 2008). Зокрема, трифлуралін

використовується у великих масштабах для обробки посівів бавовника, сої, соняшника, капусти, томатів та інших культур.

Враховуючи вищезазначене, метою даної роботи було здійснення біолістичної трансформації високоембріогенного сорту сої Київська-91 з використанням векторної конструкції (Емец и др, 2008), що містить мутантний ген альфа-тубуліну *TuAm* природного біотипу гусячої трави (*Eleusine indica*), який забезпечує стійкість до динітроанілінових гербіцидів, для отримання гербіцид-стійких ліній сої та проведення молекулярно-генетичного аналізу задля підтвердження їх трансгенної природи.

Матеріали і методи

В експериментах використовували калус сої (*Glycine max*), котрий вирощували на середовищах, як описано раніше (Пахомов и др., 2004). Біолістичну трансформацію здійснювали згідно протоколу Abumhadi et al. (2001) з деякими модифікаціями. В якості векторних конструкцій використовували створені нами плазмиди рАНТUB1 та рАНТУAm (Емец и др, 2008). По 2 мкг кожної плазмідної ДНК (рАНТUB1 та рАНТУAm) додавали до суміші з 25 мкл 2,5 М CaCl₂ та 10 мкл 0,1 М спермі дину, преципітували на фольфрамкові мікрочастинки, які потім відмивали в етанолі і підсушували на фільтрі протягом 10 хв. Калусні експланти розміром 2-3 см розміщували по центру чашки Петрі, що містила осмотичне середовище (Abumhadi et al., 2001) на 4 год до та на 16 год після бомбардування. Біолістичну трансформацію калусу сої здійснювали з використанням наступних параметрів: тиск гелію – 0,7 МПа, рівень вакууму – 0,9 бар, дистанція польоту мікрочастинок - 7 см. Через тиждень після бомбардування експланти переносили на відповідне поживне середовище (Пахомов и др., 2004), що містило селективну концентрацію динітроанілінового гербіциду трифлюраліну, для селекції гербіцид-стійких ліній сої.

Оскільки трифлюралін (DowElanco, Greenfield, USA) є найбільш ефективним представником із гербіцидів класу динітроанілінів, також було проведено аналіз чутливості клітин калусу сої до його дії з метою встановлення селективної концентрації даної речовини. Селективну концентрацію трифлюраліну визначали за допомогою тесту *in vitro*, розробленого нами раніше (Yemets et al., 2000; 2003). Тестування проводили в діапазоні концентрацій трифлюраліну від 0,1 до 50 мкМ. З цією метою відповідні аліквоти стокового розчину трифлюраліну (10 мМ) в диметилсульфоксиді додавали в охолоджене стерильне поживне середовище для калусоутворення сої, а решту зберігали при -20 °С.

Для проведення молекулярно-біологічного аналізу, зокрема, для блотинг-гібридизації за Саузерном, тотальну ДНК виділяли з молодих пагонів регенерантів за допомогою DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Німеччина). П'ять мкг рослинної ДНК з контрольної та кожної з протрансформованих ліній обробляли ендонуклеазою *Hind* III (Roche Diagnostics, Germany) протягом ночі при 37°C. Рестракційні фрагменти ДНК розділяли в 1%-ному агарозному гелі та переносили на нейлоновий фільтр Hybond-NX („Amersham“, США) згідно стандартній процедурі (Sambrook et al., 1989). Наступні гібридизацію, відмивку та експозицію проводили як описано раніше (Radchuk et al., 2005). В якості зондів використовували повнорозмірний ген α -тубуліну, отриманий за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) при створенні відповідної конструкції для трансформації. ПЛР-ампліфікований фрагмент гену *TUAm* мітили ³²P-dCTP з використанням Rediprime II kit (Amersham, UK).

Результати та обговорення

Відомо, що успіх генетичної трансформації залежить від ряду факторів, до яких, зокрема, належать правильний підбір експлантів та добре розроблений метод регенерації з них рослин. Раніше нами було введено в культуру *in vitro* та проведено

оцінку ембріогенного потенціалу сортів сої, районуваних в зоні українських Лісостепу та Полісся (Пахомов и др., 2004). Зокрема, у таких сортів як Чернятка, Київська-27, Київська-91, Васильківська, Мар'яна, Чорнобура та Альтаїр було проаналізовано здатність до калусоутворення та регенерації рослин. Було встановлено, що найефективніша регенерація пагонів із ембріогенного калусу, отриманого з незрілого насіння сої, спостерігалася у сортів Київська-91, Мар'яна та Васильківська (Пахомов и др., 2004). Серед цих трьох генотипів для проведення подальших експериментів по генетичній трансформації був відібраний сорт Київська-91, оскільки показники його регенераційного потенціалу були найвищими.

Для даного сорту також було проведено аналіз на виживання клітин калусу в присутності трифлюраліну для встановлення його ефективної селективної концентрації. Необхідно зазначити, що динітроанілінові гербіциди мають дуже високу спорідненість до рослинних тубу лінів у порівнянні з тубулінами тварин, тобто діють в низьких мікромольних концентраціях, які є майже нетоксичними для ссавців (Емец и Блюм, 2007; Baird et al., 2000; Blume et al., 2003; Yemets and Blume, 1999). Було встановлено, що ефективною концентрацією трифлюраліну, яка призводила до загибелі більше, ніж 50% клітин калусу сої та майже повністю пригнічувала його регенераційну здатність була концентрація 10 мкМ. Тому, в подальшому саме таку концентрацію використовували для селекції трансгенних ліній сої після біолістичної трансформації експлантів.

Для успішної інтеграції в геном *G. max* мутантного гену альфа-тубуліну під час бомбардування та його експресії в реципієнтних клітинах було також додатково здійснено перенесення гену бета-тубуліну, ізольованого із ячменю (*Hordeum vulgare*), що знаходився в сконструйованій нами плазміді рАНТUB1 (Емец и др., 2008). Раніше було встановлено, що наявність саме обох субодиниць (альфа- та бета-) екзогенного тубуліну є передумовою його успішної коекспресії та подальшої кополімеризації в складі мікротрубочок клітин трансгенних ліній (Antony et al., 1998).

Після бомбардування експланти витримували на середовищі для калусогенезу без додавання селективного агенту. Через тиждень їх переносили на відповідне поживне середовище для регенерації пагонів (Пахомов и др., 2004), що містило селективну концентрацію трифлюраліну (10 мкМ), для селекції гербіцид-стійких ліній сої. Селективний тиск в культурі здійснювали протягом 3-4 місяців. Лінії, що були здатні виживати в присутності трифлюраліну, переносили для подальшого культивування та розмноження.

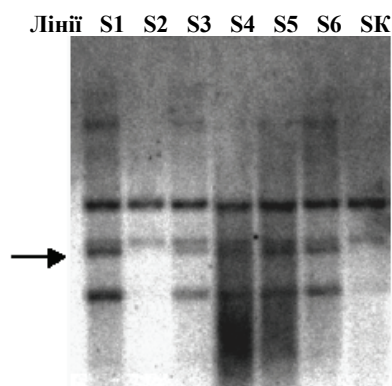


Рис. 1. Трансгенні лінії сої (S1-S6) мають одну додаткову полосу (за виключенням лінії S2), характерну для альфа-тубуліну (стрілка) в порівнянні з контролем (SK). Розмір полоси відповідає інтегрованому мутантному альфа-тубуліну (*TUAm1*) *E. indica*, що забезпечує стійкість до динітроанілінових гербіцидів.

Для з'ясування трансгенної природи відселектованих ліній та ідентифікації перенесеного гену альфа-тубуліну було проведено молекулярно-генетичний аналіз шести трансгенних регенерантів сої за допомогою гібридизації за Саузерном. Для цього ДНК трансгенних та контрольних (непротрансформованих) ліній обробляли

ендонуклеазою *Hind* III, потім, після електрофоретичного розділення і блотингу, ДНК гібридували із зондом до послідовності гену *TuAm1*. Було встановлено, що серед шести проаналізованих ліній сої (лінії S1-S6) лише лінія S2 не була трансгенною, всі інші – S1, S3, S4, S5 та S6 - демонстрували наявність в геномі перенесеного мутантного гену тубуліну, який забезпечує стійкість рослин до гербіцидів з класу динітроанілінів (Рис. 1).

Висновки

Вперше здійснено успішний перенос мутантного гену тубуліну, що забезпечує стійкість до динітроанілінових гербіцидів, у рослини сої за допомогою біолістичної трансформації. Продемонстровано можливість селекції трансформантів на гербіциді трифлураліні – одному з найефективніших динітроанілінів. Трансгенна природа відселектованих ліній підтверджена за допомогою блотинг-гібридизації за Саузерном.

Література

1. Брицун В.М., Ємець А.І., Лозинський М.О., Блюм Я.Б. 2,6-Динітроаніліни: синтез, пестицидні та антипротозойні властивості // Укр. Biorganica Acta. – 2008. - прийнята до друку.
2. Ємець А.И., Блюм Я.Б. Устойчивость растений к гербицидам с антимикротрубочковым механизмом действия: от природных мутантов до переноса генов // Физиол. растений. – 1999. – 46, № 6. – С. 899–907.
3. Ємець А.И., Блюм Я.Б. Мутантныя гены тубулинов растений как маркерные селективные гены для генетической инженерии // Цитология и генетика. – 2007. - Т. 41, № 3 - С. 29-43.
4. Ємець А.И., Радчук В.В., Пахомов А.В., Блюм Я.Б. Создание конструкций для биолістической трансформации и получение трансгенной сои с устойчивостью к динитроанилиновым гербицидам // Цитология и генетика.- 2008. – прийнята до друку.
5. Мельников Н.Н. Пестициды: химия, технология, применение. - М., Химия, 1987. - 711 с.
6. Пахомов А.В., Ємець А.И., Ху Ч.-Е., Блюм Я.Б. Оценка эмбрионного потенциала сортов сои, районированных в зоне украинских Лесостепи и Полесья, как необходимый этап для их дальнейшей трансформации // Цитология и генетика. – 2004. - Т. 38, №1. - С. 49-54.
7. Пахомов А.В., Ємець А.И., Блюм Я.Б. Сравнительный анализ эмбрионного потенциала сортов сои, районированных в различных эколого-географических зонах мира // Цитология и генетика. – 2005.- Т. 39, №5. – С. 20-27.
8. Abumhadi N., Trifonova A., Takumi S., Nakamura C., Todorovska E., Getov L., Christov N., Atanassov A. Development of the particle inflow gun and optimizing the particle bombardment method for efficient genetic transformation in mature embryos of cereals // Biotech. Equip. – 2001. - V.15, N 2. – P. 87-96.
9. Anthony R., Waldin T., Ray J., Bright S., Hussey P. Herbicide resistance caused by spontaneous mutation of the cytoskeletal protein tubulin // Nature. – 1998. – V. 393 – P. 260-263.
10. Baird V., Blume Ya.B., Wick S.M. Microtubular and cytoskeletal mutants. In: Plant microtubules - potential targets for biotechnological applications / P. Nick (ed). - Frankfurt-Berlin: Springer Verlag. - 2000. - P. 155-187.
11. Blume Ya.B., Yemets A.I., Nyporko A.Yu., Baird W.V. Structural modeling of plant α -tubulin interaction with dinitroanilines and phosphoroamidates // Cell Biol. Int. – 2003. V. 27. – P. 171-174.
12. Radchuk V.V., Van D.T., Klocke E. Multiple gene co-integration in *Arabidopsis thaliana* predominantly occurs in the same genetic locus after simultaneous *in planta*

- transformation with distinct *Agrobacterium tumefaciens* strains // Plant Sci. – 2005. – V. 168, N 6 – P. 1515-1523.
13. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual. - Cold Spring Harbour Press, Cold Spring Harbour, NY. - 1989.
14. Steinke F.H. Nutritional value of soybean protein foods / New protein foods in human health: nutrition, prevention and therapy. Eds.: Steinke F.H., Waggle D.H., Volgarev M.N. – 1991.- P. 59-67.
15. Yemets A.I., Klimkina L.A., Tarassenko L.V., Blume Ya.B. Efficient callus formation and plant regeneration from dinitroaniline-resistant and susceptible biotypes of *Eleusine indica* (L.) // Plant Cell Rep. – 2003. – V. 21. – P. 503-510.

Резюме

Осуществлена биолистическая трансформация сои конструкцией с мутантным геном α -тубулина, обеспечивающим устойчивость к динитроанилиновым гербицидам. В результате селекции отобраны трифлуралин-устойчивые растения сои, трансгенная природа которых подтверждена с помощью блоттинг-гибридизации по Саузерну с использованием специфического зонда к мутантному гену тубулина.

Здійснено біолистичну трансформацію сої конструкцією з мутантним геном α -тубуліну, що забезпечує стійкість до динітроанілінових гербицидів. В результаті селекції відібрано трифлуралін-стійкі рослини сої, трансгенна природа яких підтверджена за допомогою блотинг-гібридизації за Саузерном з використанням специфічного зонду до мутантного гена тубуліну.

Biolistic transformation of soybean by construct with mutant α -tubulin gene has been realized. During the selection a trifluralin-resistant soybean plantlets were picked up. Their transgenic nature was confirmed by Southern blotting hybridization using specific probe to mutant tubulin gene.

ЗАБЕЛИНА В.Ю., ДОРОШЕНКО К.А., КЛИМЕНКО В.В.

Харьковский национальный университет им. В.Н.Каразина

Украина, 61077, Харьков, пл. Свободы, 4, E-mail: belkina1983@mail.ru

РАЗВИТИЕ В ЧУЖЕРОДНОЙ СОМЕ ТРАНСПЛАНТИРОВАННЫХ ЯИЧНИКОВ И СПОСОБНОСТЬ К ТЕРМИЧЕСКОМУ ПАРТЕНОГЕНЕЗУ СФОРМИРОВАВШИХСЯ В НИХ ЯИЦ У ТУТОВОГО ШЕЛКОПРЯДА *ВОМВУХ MORI L.*

Полученные нами ранее результаты показывают, что при имплантации яичников породы Советская-5 в клон Р29 показатели полного термопартеногенеза повышаются с низкого до такого уровня, который достаточен для партеноклонирования этой известной породы. При трансплантации яичников клона Р29 в мужскую сому породы Советская-5 нами было обнаружено, что яйца, развившиеся в имплантате, несмотря на моновольтинность и донора и реципиента, не входят в диапаузу. Для проверки выявленных особенностей партеногенеза, в эксперимент были включены другие партеноклоны. Целью данной работы был сравнительный анализ приживаемости имплантата в чужеродной соме в зависимости от пола реципиента, способности к термоактивации и полному термическому партеногенезу яиц, развившихся в имплантате при использовании различного исходного материала.

Изучение изменений способности яйца к партеногенезу вследствие прохождения оогенеза в чужеродной соме позволит приблизиться к пониманию природы факторов,