

Література

1. Програма збереження генофонду основних видів сільськогосподарських тварин в Україні на період до 2015 року / заг. наук. ред. І.В. Гузева, консультація та специфікація Ю.В. Мельника. – К.: Арістей, 2009. – 132 с.
2. Бірта Г.О., Бургу Ю.Г. Влияние генотипа на мясные качества свиней // Вісник Полтавської держ. аграр. академії. – 2012. – № 1. – С. 212–214.
3. <http://dad.fao.org>.
4. Герасимов В.І. та ін. Світовий генофонд свиней: монографія. – Харків: Еспада. – 2006. – 520 с.
5. Ернст Л.К. Генетические основы селекции сельскохозяйственных животных. – М.: РАСХН, ВГНИИ животноводства, 2004. – 736 с.
6. Барановський Д.І. та ін. Генофонд свійських тварин України: навч. посібник. – Харків: Еспада, 2005. – 400 с.
7. Вепринцев Б.Н., Ротт Н.Н. Стратегия сохранения животного и растительного мира земли // Консервация генетических ресурсов. – Пушино, 1991. – С. 47–62.
8. Вепринцев Б.Н., Ротт Н.Н. Консервация генетических ресурсов // Природа. – М., 1978. – № 11. – С. 10–21.
9. FAO Guidelines for the Cryoconservation of Animal Genetic Resources. – Rome, Italy, 2010. – 170 с.
10. Лебедева Я.В. Измерение и оценка биологического разнообразия. – Ростов Н/Д. УПЛ РГУ, 1999. – Ч. 2. – 94 с.
11. Соколов Б.П., Джемелинский В.В. Выделение высокомолекулярной эукариотической ДНК с использованием ацетата калия // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 1989. – № 6. – С. 45–46.
12. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Д. Молекулярное клонирование. – Москва: Мир, 1984. – 479 с.
13. Медицинские лабораторные технологии. Справочник / [под ред. А.И. Карпищенко]. – Санкт-Петербург: Интермедика, 2002. – 2. – 600 с.

METLITSKA O.I., SHCHERBAK O.V., KOVTUN S.I., TROSKIY P.A., ZYUZYN A.B., OSYPCHUK O.S.

Institute of Animal Breeding and Genetics, National Academy of Agrarian Science of Ukraine, Ukraine, 08321, Kiev Region, Borispol District, v. Chubinske, Pogrebnyaka str., 1, e-mail: ov19792006@yandex.ru

OPTIMIZATION BIOTECHNOLOGICAL METHODS IN THE SYSTEM OF MIRGORODSKA BREED PIGS GENE POOL PRESERVATION

Aims. Gene pool preservation endangered, indigenous pig breeds requires using methods modern biotechnology and genetic. Create a cryocollection Mirgorodska breed pigs viable oocytes and DNA bank for the development of scientific methods of maintenance and further improvement. **Methods.** In carrying out this work used biotechnology, cryobiological, morphological, molecular genetic methods. **Results.** As a result of working for long-term storage in the Bank Animal Genetic Resources of the Institute of Animal Breeding and Genetics laid full *in vitro* matured oocytes 25 sows Rysalka № 274/ 05 128, 19 oocytes Sojka № 314 and 53 oocytes Smorodina № 674 Mirgorodska breed pigs. For DNA studies the optimal treatment primary regimes biomaterial: ovarian tissue and immature oocyte cumulus complexes. **Conclusion.** Used complex biotechnology and molecular-genetic methods to form oocytebank pigs of Mirgorodska breed in Bank Animal Genetic Resources of the Institute of Animal Breeding and Genetics

Key words: cryobank, oocyte, cryopreservation, DNA-analysis, gene pool.

УДК 604.6:633.15

НІТОВСЬКА І.О.¹, АБРАЇМОВА О.Є.², САТАРОВА Т.М.², ШАХОВСЬКИЙ А.М.¹, МОРГУН Б.В.¹

¹ Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України,

Україна, 03680, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 148, e-mail: molgen@icbge.org.ua

² Державна установа Інститут сільського господарства степової зони НААН України,

Україна, 49600, м. Дніпропетровськ, вул. Дзержинського, 14

БІОЛІСТИЧНА ТРАНСФОРМАЦІЯ НЕЗРІЛИХ ЗАРОДКІВ КУКУРУДЗИ

Генетичну трансформацію рослин покращення їх характеристик, збільшення сільськогосподарських культур використовують врожаю та здешевлення виробництва. З кожним для надання їм певних ознак з метою роком світова площа, зайнята під вирощування

біотехнологічних рослин, невпинно зростає та становить станом на 2013 рік понад 175 млн га [1]. Кукурудза (*Zea mays* L.) є важливою сільськогосподарською культурою широкого використання, яку вирощують по всьому світі у промислових масштабах, у тому числі і генетично модифіковану. Найбільше поширення отримала трансгенна кукурудза, стійка до гербіцидів та комах [2]. Для отримання трансгенних рослин кукурудзи найчастіше використовують *Agrobacterium*-опосередкований або біолістичний методи та незрілі зародки як безпосередній об'єкт для проведення генетичної трансформації [3, 4]. Проте не зважаючи на певний успіх по створенню та вирощуванню трансгенної кукурудзи, генетична трансформація комерційних генотипів не є рутинною та надійно відтворювальною процедурою.

Метою нашого дослідження було проведення біолістичної трансформації незрілих зародків кукурудзи певних генотипів, які створені та вирощуються на території України, та оцінка їх компетентність для генетичної трансформації.

Матеріали та методи

Для трансформації використовували незрілі зародки кукурудзи 21 генотипу: 8 інбредних ліній, 10 гібридів F₁ та соматональні варіанти на основі гібридів F₁ (табл. 1). Донорні рослини кукурудзи вирощували у польових умовах. Незрілі зародки у віці 10–12 діб після запилення ізолювали з донорних рослин, стерилізували та експлантували на живильне середовище для калусогенезу *in vitro*, як описано раніше [5]. Через 2–16 діб культивування на середовищі для калусогенезу незрілі зародки, на щитках яких почали розвиватися калуси, піддавали біолістичній трансформації.

В експериментах використовували вектор рАНС25 [6], який містить ген β-глюкуронідази *uidA* та ген фосфінотрицин-ацетил-трансферази *bar*, обидва під контролем промотору убіквітину кукурудзи.

Експерименти з біолістичної трансформації кукурудзи проводили, використовуючи гармату PDF-1000/He.unit, Bio-Rad. Носіями ДНК були частинки золота (Bio-Rad) діаметром 1 мкм. ДНК плазмиди адсорбували на частинках золота, використовуючи розчин Mg²⁺-PEG [7]. Процедуру біолістичної трансформації проводили за загально прийнятим протоколом, застосовуючи тиск 900 psi та відстань від макроносія до рослинного матеріалу 6 см. Підготовку рослинного матеріалу до

трансформації та подальше культивування робили як описано раніше [5]. Кількість зародків, яку обробляли одним пострілом, була від 25 до 50. Через тиждень після біолістичної обробки рослинний матеріал переносили на селективне середовище для калусогенезу [5] з додаванням 5 мг/л фосфінотрицину та вирощували у темряві при 27 °С. Калуси переносили на свіже середовище що два тижні. Через 2–4 тижні після початку селекції калуси переносили на селективне регенераційне середовище, яке містило сольовий компонент та вітаміни середовища МС [8], 700 мг/л проліну, 0,25 мг/л 6-бензил-амінопурину, 20 г/л сахарози, 7 г/л агару та 5 мг/л фосфінотрицину, і вирощували в умовах освітлення при 26 °С та 16-годинному фотоперіоді. Рослини-регенеранти висаджували в банки на безгормональне середовище МС з додаванням 5 мг/л фосфінотрицину та вирощували в тому ж режимі освітлення.

Гістохімічний аналіз наявності β-глюкуронідази у рослинному матеріалі проводили за методикою [9] через 4 доби після обстрілу з метою виявлення транзйентної експресії гена *uidA*, і через 2–3 місяця для визначення події стабільної трансформації.

З отриманого стійкого до фосфінотрицину рослинного матеріалу виділяли ДНК, використовуючи ЦТАБ-метод [10]. Концентрацію та чистоту ДНК визначали спектрофотометрично. Наявність гену *bar* в рослинній ДНК визначали методом ПЛР, використовуючи праймери: форвардний 5'-ACA TCG AGA CAA GCA CGG TC-3' та реверсний 5'-GCC AGA AAC CCA CGT CAT GC-3'. Довжина очікуваного фрагменту була 411 п.н. Умови ампліфікації були: денатурація 94°C/4 хв; 32 циклі ампліфікації (денатурація 94°C/30 с, відпал 59°C/30 с, синтез 72°C/30 с); заключний синтез 72°C/5 хв. В якості позитивного контролю використовувалась загальна ДНК вже трансформованої рослини. Продукти реакції фракціонували в 1% агарозному гелі з бромистим етидієм (0,5 мкг/мл) у трис-боратній буферній системі при 8 В/см протягом 90 хв.

Результати та обговорення

Було проведено три серії експериментів з біолістичної трансформації незрілих зародків 21 генотипу кукурудзи при різних термінах культивування від експлантації на живильне середовище ізольованих зародків до проведення біолістичної трансформації (DIC) (табл.). У дослідах використовували вектор рАНС25.

Таблиця. Біолістична трансформація незрілих зародків кукурудзи

Генотип	Кількість пострілів	DIC*	Кількість регенерантів	Gus-зabarвлення	
				Калюс, кількість зародків	Листки, кількість регенерантів
PLS61	3	7	2	-	-
PLS61	2	9	45	-	6
RS15	5	12	1	-	-
ПРЖ5	2	8	1	-	-
ПРЖ5	2	16	0	1	-
P205	8	12	0	-	-
ДК744	3	13	0	-	-
ДК959	4	7	0	-	-
КС277	4	4	0	-	-
КГ232	4	9	0	-	-
PLS61♀×КГ232♂	2	9	1	-	-
PLS61♀×КГ232♂	4	10	0	1	-
PLS61♀×P205♂	4	8	0	-	-
PLS61♀×ДК744♂	2	7	0	-	-
PLS61♀×ДК744♂	4	9	3	1	-
PLS61♀×ДК959♂	2	5	0	-	-
PLS61♀×КП7♂	1	14	3	-	-
PLS61♀×ПРЖ5♂	2	15	4	-	-
ДК959♀×PLS61♂	6	9	6	5	1
КГ232♀×PLS61♂	2	11	0	-	-
ПРЖ5♀×PLS61♂	2	2	0	-	-
ДК744♀×PLS61♂	2	3	0	-	-
с.в. ДК304♀×PLS61♂	2	5	1	-	-
с.в. ДК304♀×PLS61♂	2	15	0	-	-
с.в. PLS61♀×ДК304♂	3	7	1	1	1
с.в. PLS61♀×ДК304♂	3	14	12	1	-
с.в. ДК675♀×Chi31♂	2	13	3	3	-
Загалом	82		82	13	8

Примітка: *DIC (days in culture) – кількість днів від експлантації незрілих зародків на середовище для калюсогенезу до проведення біолістичної обробки; с.в. – соматональний варіант.

Через 4 доби після обстрілу проводили гістохімічний аналіз транзійтної експресії гену β -глюкуронідази в калюсних тканинах. За інтенсивністю блакитного забарвлення найкраще в експериментах з біолістичної трансформації себе показали наступні генотипи кукурудзи: інбредні лінії PLS61 і КС277 та гібриди F₁ ДК959♀×PLS61♂, PLS61♀×ДК959♂, PLS61♀×ПРЖ5♂, PLS61♀×КП7♂.

Через 1,5–2 місяці після трансформації спостерігали регенерацію пагонів на селективному середовищі для різних генотипів кукурудзи (рис. 1, табл.).

Пагони регенованих рослин відокремлювали від калюсу та садили в банки з селективним середовищем. Більшість рослин-

регенерантів були чутливі до гербіциду, тоді як решта укорінювались та залишались зеленими на селективному середовищі. Паралельно проводили гістохімічний аналіз на присутність експресії гену *uidA* для частини рослинного матеріалу (листочки рослин-регенерантів і калюс) стійкого до фосфінотрицину. Гістохімічне фарбування на присутність β -глюкуронідази показало, що синє забарвлення спостерігалось не по всій тканині, а на окремих ділянках, що може свідчити, або про замовчування експресії гену *uidA* в окремих ділянках, або про химерність одержаного рослинного матеріалу.

Стійкий до фосфінотрицину калюс та листки рослин-регенерантів використовували

для виділення загальної ДНК. Рослинну ДНК аналізували методом ПЛР на наявність послідовності трансгена *bar*. Аналіз методом ПЛР показав присутність гена *bar* в рослинній ДНК стійкого до фосфінотрицину калюсу кукурудзи, який виявляв блакитне забарвлення при гістохімічному аналізі, а також для 6 ліній рослин-регенерантів (рис. 2). Результати ПЛР свідчать про трансгенну природу одержаного рослинного матеріалу.

Цікаво, що у нашому дослідженні спостерігається певна кореляція між рівнями транз'єнтної експресії β -глюкуронідази для різних генотипів кукурудзи і результатами зі стабільної трансформації, що може бути використано для швидкого відбору

компетентних для трансформації генотипів кукурудзи.

В експериментах з генетичної біолістичної трансформації ми використовували незрілі зародки кукурудзи, які до обстрілу перебували на середовищі для калюсогенезу від 2 до 16 діб (табл. 1). Найкращим для трансформації рослинним матеріалом були незрілі зародки з калусами, які до обстрілу культивувалися 9 діб. У проведених експериментах по отриманню стабільних трансформантів кукурудзи методом біолістичної трансформації серед 21 генотипу найкраще себе показали інбредна лінія PLS61 та гібриди F₁ PLS61♀×ДК744♂, PLS61♀×ДК304♂ і ДК959♀×PLS61♂.

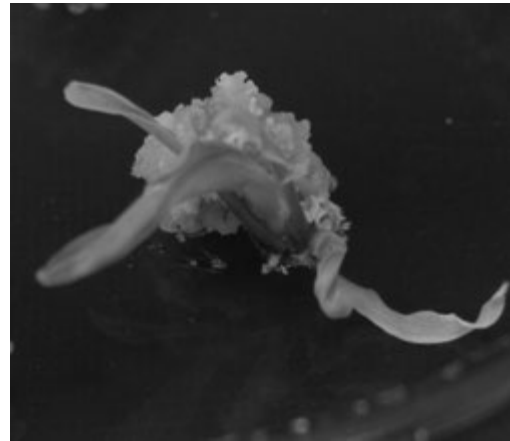
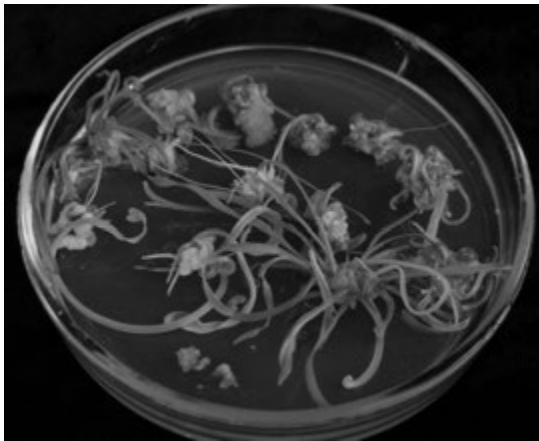


Рис. 1. Регенерація на селективному середовищі пагонів кукурудзи лінії PLS61 (ліворуч) та гібриду F₁ PLS61♀×ДК744♂ (праворуч)

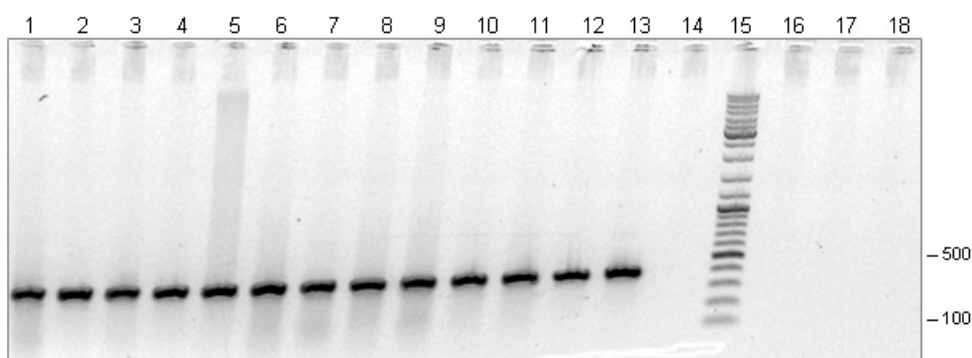


Рис. 2. ПЛР-аналіз на наявність гена *bar* в рослинному матеріалі кукурудзи за допомогою праймерів *bar1f1* та *bar1r2*. Доріжка 1 – ДК959♀×PLS61♂ (к., л. 3); 2 – PLS61♀×ДК959♂ (к., л. 6); 3 – ДК959♀×PLS61♂ (к., л. 1); 4 – PLS61 (р., л. 17); 5 – PLS61♀×ДК744♂ (р., л. 2); 6 – PLS61♀×ПРЖ5♂ (к., л. 1); 7 – PLS61 (р., л. 2); 8 – PLS61 (к., л. 3); 9 – PLS61 (к., л. 7); 10 – PLS61 (р., л. 1); 11 – PLS61♀×ДК304♂ (р., л. 7); 12 – PLS61♀×ДК304♂ (р., л. 6); 13 – позитивний контроль; 14 – без ДНК; 15 – маркер молекулярної маси DNA Ladder Mix; 16 – нетрансформована PLS61, негативний контроль; 17 – PLS61 (р., л. 8-1); 18 – PLS61♀×ДК744♂ (р., л. 3). Довжина очікуваного фрагменту – 411 п.н. Скорочення: к – калюс; р – рослина; л. – лінія

Висновки

В результаті проведених експериментів з біолистичної трансформації вектором рАНС25 були отримані стійкі до фосфінотрицину калюсні лінії і рослини-регенеранти, у яких виявляли активність фермента β-глюкуронідази. Аналіз методом ПЛР показав присутність гена *bar* у рослинній ДНК стійких до фосфінотрицину калюсних ліній та 6 ліній рослин-регенерантів. Наявність гена *bar* у рослинній ДНК свідчить про трансгенну природу одержаного рослинного матеріалу. Серед 21 генотипу кукурудзи, які створені та вирощу-

ються на території України, були відібрані 4 генотипи найбільш компетентні для біолистичної трансформації.

Робота проводилася в рамках науково-технічного проекту «Отримання та вивчення молекулярно-біологічних і генетичних особливостей стійких до гербіцидів сільськогосподарсько важливих культур» цільової комплексної міждисциплінарної програми наукових досліджень НАН України «Фундаментальні основи молекулярних та клітинних біотехнологій» номер держреєстрації 0110U006082.

Література

1. ISAAA Brief 46-2013: Executive Summary. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2013.
2. EU Register of Authorised GMOs [Електронний ресурс] // Regulation EC 1829/2003 – 2014. – Режим доступу: http://ec.europa.eu/food/dyna/gm_register/index_en.cfm
3. Sidorov V.A. Plant tissue culture in biotechnology: recent advances in transformation through somatic embryogenesis // Biochemistry and Biotechnology for Modern Medicine. Edited by S. Komisarenko. – K.: Publishing House Moskalenko O.M., NAS of Ukraine, Kyiv – 2013. – 704 p.
4. Shou H., Frame B., Whitham S., Wang K. Assessment of transgenic maize event produced by particle bombardment or *Agrobacterium*-mediated transformation // Mol. Breed. – 2004. – 13. – P. 201–208.
5. Нітовська І.О., Дуплій В.П., Рудас В.А., Абраїмова О.Є., Сатарова Т.М., Моргун Б.В. Оптимізація умов трансформації калюсних ліній кукурудзи за допомогою детекції транзйентної експресії гена бета-глюкуронідази // Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології: збірник наукових праць ІХ з'їзду УТГіС. – Київ: Логос. – 2012. – 4. – С. 587–592.
6. Christensen A.H., Quail P.H. Ubiquitin promoter-based vectors for high-level expression of selectable and/or screenable marker genes in monocotyledonous plants // Transgenic Research. – 1996. – 5. – P. 213–218.
7. Василенко М.Ю., Кучук М.М., Овчаренко О.О., Кучук М.В. Отримання транспластомних рослин *Nicotiana bethamiana* із генами мікобактерії (*Mycobacterium tuberculosis*) // Фактори експериментальної еволюції організмів. – 2010. – 9. – С. 224–229.
8. Murashige T., Skoog F.A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // Physiol. Plant. – 1962. – 15. – P. 473–497.
9. Jefferson R.A. Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system // Plant Mol. Biol. Rep. – 1987. – 5. – P. 387–405.
10. Генная инженерия растений. Лабораторное руководство / Под ред. Дрейпер Дж. и др. – М.: Мир, 1991. – 408 с.

NITOVSKA I.O.¹, **ABRAIMOVA O.YE.**², **SATAROVA T.M.**², **SHAKHOVSKY A.M.**¹, **MORGUN B.V.**¹

¹ Institute of Cell Biology and Genetics Engineering of Nat. Acad. Sci. of Ukraine, Ukraine, 03680, Kyiv, Akademika Zabolotnogo str., 148, e-mail: molgen@icbge.org.ua

² State Enterprise Institute of Agriculture of Steppe Zone of NAAS of Ukraine, Ukraine, 49600, Dnipropetrovsk, Dzerzhynskij str., 14

BIOLISTIC TRANSFORMATION OF IMMATURE MAIZE EMBRYOS

Aims. Maize (*Zea mays* L.) is one of the most economically important crops which were considerably improved by modern biotechnology. For efficient production of transgenic maize, immature embryos and two transformation techniques for transgenes delivery (*Agrobacterium*-mediated transformation and particle bombardment) were employed. However, genetic transformation is genotype dependent and is not routine procedure. Thus, the aim of the current studies was to carry out the biolistic transformation of immature maize embryos for commercial genotypes propagated in fields, and to prove their competence for genetic transformation. **Methods.** Particle bombardment of immature maize embryos for 21 commercial genotypes using рАНС25 vector was carried out. Histochemical analysis of the phosphinothricin resistant plant material for the presence of β-glucuronidase was performed. Plant DNA was analyzed for the presence of *bar* gene by PCR method. **Results.** Following particle bombardment, phosphinothricin resistant calli and

plant regenerants were obtained. Histochemical analysis showed the presence of β -glucuronidase in the obtained plant material. PCR analysis proved the presence of *bar* gene in plant DNA of the phosphinothricin resistant calli and 6 regenerant lines. Out of 21 maize genotypes, inbred line PLS61 and hybrids F₁ PLS61♀×ДК744♂, PLS61♀×ДК304♂, and ДК959♀×PLS61♂ were the most competent for biolistic transformation. **Conclusions.** After biolistic transformation of immature maize embryos with pAHC25 vector, phosphinothricin resistant calli and plant regenerant lines containing β -glucuronidase have been obtained. The presence of *bar* gene detected by PCR method indicated the transgenic nature of the obtained plant material. Four most responsive for the biolistic transformation genotypes were selected from 21 commercial lines and hybrids grown in Ukraine.

Key words: *Zea mays* L., particle bombardment, β -glucuronidase, *bar* gene, GMO.

УДК 668.52:668.53:61

ПАДАЛКО С.Ф., КАМЕНЧУК О.П., БОБИК Л.В.

Інститут фізіології рослин і генетики НАН України,

Україна, 03022, м. Київ, вул. Васильківська, 31/17, e-mail: kurchii@mail.ru

КОМПОНЕНТНИЙ СКЛАД І БІОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ ЕКСТРАКТІВ ГРИБА *ACREMONIUM SPP.*

Серед нових видів природних субстратів важливе місце займають препарати вермикомпости (біогумуси), які містять гумінові та фульвокислоти, макро- та мікро-елементи і позитивно впливають на ростові процеси сільськогосподарських культур [1]. До того ж макро- і мікро-елементи в біогумусах знаходяться в невеликих кількостях. Цей факт зумовлює недостатню ефективність використання вермикомпосту та перегною на збіднених ґрунтах, тому включення до складу препаратів мікроелементів має суттєво підвищити їх ефективність. Серед недоліків зареєстрованих в Україні препаратів, створених на основі вермикомпосту, можна назвати їх низькі експлуатаційні властивості, пов'язані із значними транспортними витратами та термінами зберігання, обумовленими високими нормами витрат на одиницю площі (12–15 л на 1 га), або маси насіння (15 л на 1 т), що обробляється [2].

Матеріал і методи

Проведено аналіз вмісту біологічно активних речовин в культуральних середовищах гриба *Acremonium spp.* Тест на цитокініни здійснено на сім'ядольних листках 8-денних проростків огірка сорту Ніжинський. Насіння огірка пророщували розділенням сім'ядолей. Сім'ядолі по 10 листків ставили в чашки з досліджуваним розчином на 24 години. Тест на ауксини здійснено на колеоптилях пшениці Альбатрос одеський 1,5 см довжиною, вирізали середину і ставили в розчин на 24 години. Тест на гібереліни проведено на проростках огірків

пророщували, відбирали гіпокотилі довжиною 0,5–1,0 см. По 10 рослин ставили в чашки з досліджуваним розчином в термостат при Т 22 °С на 24 години.

Гриб *Acremonium spp.* вирощували протягом 21 доби при кімнатній температурі в скляних флаконах (матрацах) при 12-ти годинному світловому режимі (4 люмінесцентні лампи по 40 Вт) в рідкому культуральному середовищі наступного складу (мг/л л середовища): K₂HPO₄ – 600, KH₂PO₄ – 1800, MgSO₄ – 400, K₂SO₄ – 200, FeSO₄ – 4, MnSO₄ – 4, Asparagin – 0,02, KJ – 0,02, Vitamin B₁ – 1, Vitamin B₆ – 2, Vitamin PP – 2, MES 2260 – 4520, D-inositol – 100, D-glucose – 16, Pectin – 2000, Gibberellic acid – 0,003, KOH, 5M – 3 краплі.

Екстракцію речовин із міцелію гриба (10 г сирої речовини) проводили трічі 80 %-ним етиловим спиртом і зберігали в холодильнику при 4 °С – (базовий екстракт із міцелію гриба *Acremonium spp.*, БЕА).

Результати та обговорення

Цитокінінову активність екстрактів міцелію гриба *Acremonium spp.*, яку визначили за допомогою тестів на сім'ядольних листках 8-денних проростків огірка сорту Ніжинський, представлено в таблиці 1.

Таким чином, найвищу ефективність проявив нерозведене середовище культивування міцелію гриба.

Проведено аналіз вмісту ауксинів в культуральних середовищах гриба *Acremonium spp.* (табл. 2).