

LUZHETSKYI T.B., SEMKIV M.V., KSHANOVSKA B.V., DMYTRUK K.V., SIBIRNY A.A.

Institute of Cell Biology, NAS of Ukraine,

Ukraine, 79005, Lviv, Drahomanova str., 14/16, e-mail: dmytruk@cellbiol.lviv.ua

ELEVATION OF THERMOTOLERANCE OF INDUSTRIAL ETHANOL PRODUCING YEASTS VIA DEREPRESSION OF THE GENES FOR TREHALOSE SYNTHESIS

Aims. The aim of this work is the elevation of the thermotolerance and improvement the efficiency of high temperature alcoholic fermentation of yeast *S. cerevisiae* by overexpression of the genes *TPS1* and *TPS2*.

Methods. For overexpression of trehalose-6-phosphate synthase and trehalose-6-phosphate phosphatase the vector for multicopy integration was constructed, where ORFs of *TPS1* and *TPS2* genes were placed under the control of strong constitutive promoter *ADHI*. The resulting vector was linearized and used for transformation of *S. cerevisiae* industrial strains. **Results.** Recombinant strains overexpressing genes for trehalose synthesis possessed increased intracellular concentration of trehalose. Thermotolerance and efficiency of high temperature alcoholic fermentation of the constructed strains were increased. **Conclusions.** Recombinant strains with higher intracellular trehalose concentration produce 17 % more ethanol during fermentation at 42 °C. Constructed strains are promising for industrial implementation.

Key words: alcoholic fermentation, *S. cerevisiae*, thermotolerance, trehalose.

УДК 581.1:582.475:2

ЛУКИНА А.В.¹, ТРЕТЬЯКОВА И.Н.²

¹ *Красноярская краевая станция юннатов,*

Россия, г. Красноярск, ул. ак. Куренского, 23, e-mail: yunnatu@gmail.com

² *Институт леса им. В.Н. Сукачева,*

Россия, 660036, г. Красноярск, Академгородк, стр. 50, e-mail: culture@ksk.krasn.ru

ФАКТОРЫ ИНДУКЦИИ СОМАТИЧЕСКОГО ЭМБРИОГЕНЕЗА *PINUS SIBIRICA* DU TOUR

Соматический эмбриогенез – стремительно набирающий силу метод биотехнологии, находящий широкое применение в современном лесоводстве. За рубежом созданы плантации из генетически тестированных деревьев, полученных методами клеточной культуры. Программы селекции, сочетающие традиционные подходы и клеточные биотехнологии особенно актуальны. Многочисленными исследованиями, проведенными на разных видах рода *Pinus*, показано, что частота индукции соматического эмбриогенеза остается очень низкой, что значительно ограничивает практическое применение данного метода. Определение условий, влияющих на индукцию соматического эмбриогенеза будет способствовать увеличению числа клеточных линий из которых могут быть получены массовые регенеранты. [1]

Целью нашей работы являлось: выявить факторы, влияющие на индукцию соматического эмбриогенеза у *Pinus sibirica* Du Tour.

Задачи: оценить значение гормонального состава и сахаров в индуцирующей среде на соматический эмбриогенез *P. sibirica*; выявить роль генотипа дерева-донора для индукции

соматического эмбриогенеза

Материалы и методы

В качестве эксплантов использовали зародыши семян, полученных в результате контролируемого (6 деревьев) и свободного опыления (22 дерева). Для стерилизации семена обрабатывали водным раствором перманганата калия в течении 15 минут, затем отмывали в проточной воде и очищали твердые покровы. Далее мегагаметофиты выдерживали в течении 10 минут в гипохлорите натрия, трижды промывали в стерильной дистиллированной воде и помещали на 5 минут в 10 % раствор перекиси водорода. Интактные мегагаметофиты с заключенными в них зародышами, находящимися на предсемядольной стадии развития помещали на питательные среды. Были протестированы 5 питательных сред, различающиеся гормональным составом и сахарами (таб.).

Во все среды добавляли: глутамин 1 г/л, гидролизат казеина 0,5 г/л, мезоинозит 1 г/л, агар 6 г/л.

Результаты введения в культуру фиксировали на 21 и 42 сутки (рис. 1–3). При этом определяли изменение массы эксплантов,

после чего осуществляли цитологический контроль на давленных препаратах, приготовленных по стандартной методике (Паушева, 1990). Об успешной индукции соматического эмбриогенеза судили по наличию клеточных конгломератов (соматических зародышей) после 9 недель культивирования.

Статистическая обработка проводилась с использованием пакета программ Excel 2007.

Результаты и обсуждение

Результаты исследования показали, что все исследованные среды пригодны для индукции и пролиферации каллусной культуры. Минимальное значение частоты каллусообразования $58 \pm 4,3 \%$ получено на среде 4, максимальное – $80 \pm 5,6 \%$ на среде 5 (рис. 1).

Цитологический анализ культуры показал, что на 21 сутки каллусная масса состоит из клеточных конгломератов, представленных меристематическими клетками, формирующими

глобулу и примыкающих к ним вытянутых трубкообразных клеток. На 42 сутки отмечалась утрата эмбриогенного потенциала для многих клеточных линий (рис. 2, 3). Частота формирования эмбрионально-суспензорной массы у разных генотипов варьирует от 0 до 3,9 % (в среднем 1,6 %). Низкий процент индукции соматического эмбриогенеза у представителей рода *Pinus* отмечается многими исследователями [4]. Корреляционный анализ выявил наличие умеренной связи (0,53) между генотипом материнского дерева и частотой инициации соматического эмбриогенеза. Генетическая обусловленность процессов соматического эмбриогенеза подтверждена многими исследователями. Предполагается, что отбором соответствующих родительских особей можно существенно повысить эффективность процессов регенерации *in vitro* [5].

Таблица. Среды, использованные для индукции соматического эмбриогенеза у *P. sibirica*

№ среды	Минеральный состав среды	Сахара	Гормоны
1	S LV [2]	30 г/л сахароза	2 мг/л 2,4 Д 1 мг/л 6-БАП
2	S LV	сахароза 10 г/л + 10 г/л глюкоза + 10 г/л мальтоза	1 мг/л бНУК + 1 мг/л 2,4 Д 1 мг/л кинетин
3	S LV	сахароза 15 г/л	2 мг/л 2,4 Д 1 мг/л 6-БАП
4	S LV	15 г/л глюкоза	1 мг/л 2,4 Д 0,5 мг/л 6-БАП
5	1043 [3]	15 г/л сахароза +15 г/л мальтоза	2 мг/л бНУК + 0,6 мг/л 6-БАП + 0,6 мг/л кинетин

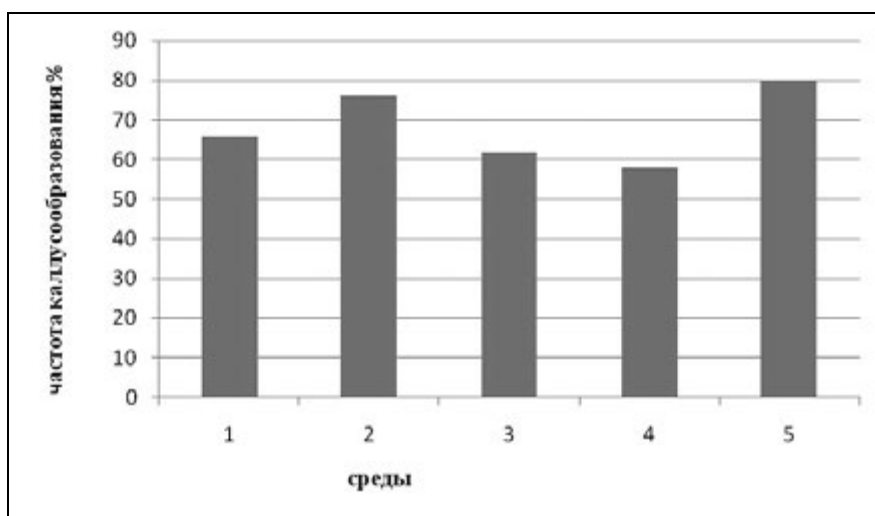


Рис. 1. Частота каллусообразования из незрелых мегагаметофитов *P. sibirica* на 21 сутки культивирования

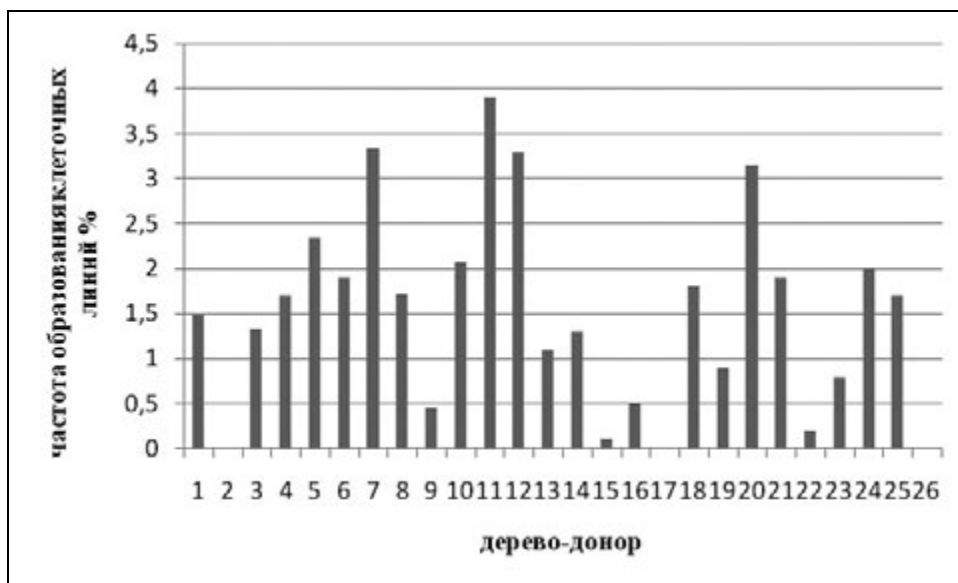


Рис. 2. Частота образования клеточных линий, сохраняющие эмбрионный потенциал на 42 сутки культивирования. 1–6 контролируемое опыление, 7–26 свободное опыление

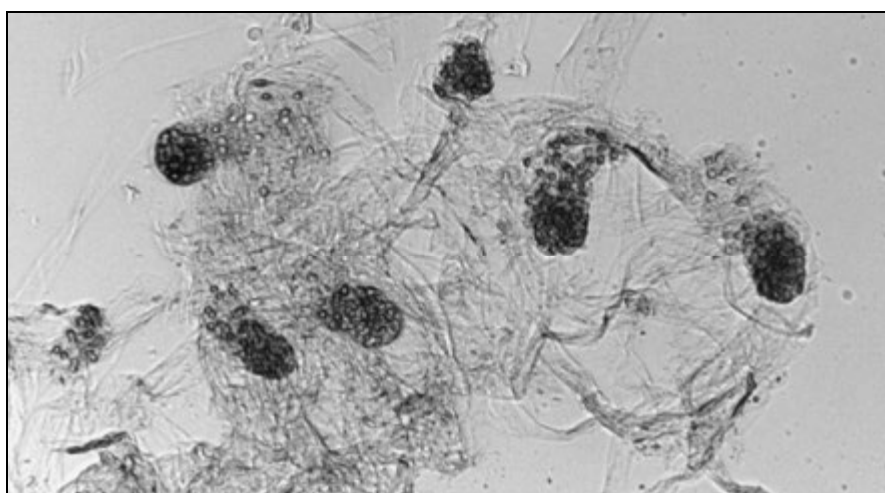


Рис. 3. Соматические зародыши на 42 сутки культивирования

Между эксплантами, полученными от свободноопыляемых деревьев и эксплантами, полученными в результате контролируемого опыления, достоверных различий не выявлено.

Выводы

Все исследованные среды способны поддерживать инициацию и пролиферацию калусных культур *P. sibirica*. Больше число

эмбрионных клеточных линий было получено на среде 5.

Способность к сохранению эмбрионного потенциала в культуре *in vitro* определяется генотипом дерева-донора эксплантов.

После 6 недель культивирования не более 1,5 % полученных клеточных линий сохраняли эмбрионный потенциал.

Литература

1. Stasolla C., Yeung E.C. Recent advances in conifer somatic embryogenesis: improving somatic embryo quality// Plant Cell Tissue and Organ Culture. – 2003. – 75. – P. 15–35.
2. Litvay J.D., Verma D.C., Johnson M.A. Influence of loblolly pine (*Pinus taeda*) culture medium and its components on growth and somatic embryogenesis of the wild carrot (*Daucus carota*) // Plant Cell Reports. – 1985. – 4. – P. 325–328.

- Pullman G.S., Johnson S.S., Van Tassel, Zang Y. Somatic embryogenesis in loblolly pine (*Pinus taeda*) and Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*): improving culture initiation and growth with MeS pH buffer, biotin and folic acid // Plant Cell Tissue and Organ Culture. – 2005. – 80. – P. 91–103.
- Bonga J.M., Klimaszewska K.K., von Anderkas P. Recalcitrance in clonal propagation, in particular of conifers // Plant Cell Tissue and Organ Culture. – 2010. – 100. – P. 241–254.
- MakKay J.J., Becwar M.R., Park Y-S., Corderro J.P., Pullman G.S. Genetic control of somatic embryogenesis initiation in loblolly pine and implication for breeding // Tree Genetic and genomics. – 2006. – 2. – P. 1–9.

LUKINA A.V.¹, TRETYAKOVA I.N.²

¹ Regional Centre for young naturalists,

Russia, 660100, Krasnoyarsk, Kirenskogo str., 23, email: yunnatu@gmail.com

² V.N. Sukachev Institute of Forest,

Russia, 660036, Krasnoyarsk, Akademgorodok, 50, email: culture@ksk.krasn.ru

FACTORS OF INDUCTION OF SOMATIC EMBRYOGENESIS IN *PINUS SIBIRICA* DU TOUR

Aims. *In vitro* clonal propagation has the potential for fast multiplication of superior genotypes, allowing the exploitation of maximum genetic gain achieved in the breeding program. To determine the proportion of immature zygotic embryos from each open pollinated (OP) and controlled pollinated (CP) family from which somatic embryogenesis could be initiated and the number of responding families using various initiation media. **Methods.** For initiation of embryogenic cultures five media differs of plant grow regulator and carbohydrates source and concentration were tested. 22 OP and 6 CP trees have been used as zygotic embryo donors. **Results.** All tested media were capable to support proliferation cells lines *P. sibirica*. Callus tissue was initiated on explants from all of the 22 trees tested. Great variation in the mean percentage of embryogenic line establishment was observed, depending on the family.

Key words: somatic embryogenesis, *Pinus sibirica*, plant grow regulator, family effect.

УДК 58.086+581.522.4

МАРТИНЮК В.О.¹, ГОЛУБЕНКО А.В.¹, ГУМЕНЮК Г.Б.²

¹ Київський національний університет імені Тараса Шевченка ННЦ «Інститут біології», Україна, 01032, м. Київ, вул. Симона Петлюри, 1, holubenko@yahoo.com

² Тернопільський національний педагогічний університет імені Володимира Гнатюка, Україна, 46027, м. Тернопіль, вул. М. Кривоноса, 2, e-mail: shumlyany@list.ru

УВЕДЕННЯ В АСЕПТИЧНУ КУЛЬТУРУ РІДКІСНОЇ ЕНДЕМІЧНОЇ РОСЛИНИ *ATOCION LITHUANICUM* (ZAPAL.) TZVEL.

Atocion lithuanicum (Zapal.) Tzvel. (до 2001 р. – *Silene lithuanica* Zapal.) [1] – сарматський, здебільшого поліський ендемік [2], занесений до Червоної книги України, хоча природоохоронний статус виду все ще залишається неоціненим [3]. Ареал виду охоплює Польщу, Литву, Україну та Білорусь, в Україні цей вид зустрічається лише на Поліссі, переважно Правобережному на своїй східній та південній межі поширення [3–5]. Зростає на освітлених ділянках із сухими, бідними, піщаними ґрунтами в соснових лісах по галявинах і узліссях, біля доріг, часто на протипожежних смугах [3, 4, 6]. Основними причинами змін чисельності є зривання рослин, витоптування та заліснення [3]. *A. lithuanicum* має протиерозійне (закріплення пісків) та

декоративне значення, рослини іноді висаджують на присадибних ділянках [3, 7].

Зважаючи на соцологічний статус *A. lithuanicum*, необхідно застосувати всі можливі заходи для збереження генофонду виду як у природі, так і *ex situ*. Метою нашої роботи було введення рослин *A. lithuanicum* в асептичну культуру для вивчення їх морфогенетичних особливостей та збереження у складі колекції рідкісних рослин *in vitro* Ботанічного саду ім. акад. О.В. Фоміна Київського національного університету імені Тараса Шевченка.

Матеріали і методи

Для отримання первинних експлантів – асептичних проростків *A. lithuanicum* – було використане зріле насіння, зібране з рослин, яке зростало на території загальновійськового