

ANOPRIYENKO O.V., VAGINA I.N., ZAKHARUK O.A., MOROZOVA L.M., STROKOVSKA L.I.
Institute of molecular biology and genetics NAS of Ukraine
Ukraine, 03680, Kyiv, ak. Zabolotnogo str., 150; e-mail: o.v.anoprienko@imbg.org.ua

EXPRESSION OF INTERFERON-SENSITIVE GENES IN COCULTURE OF MOUSE MELANOMA AND FETAL FIBROBLAST CELLS

Aims. On the model of triple system «potential vector cells C57Fb/ IFN- β / melanoma MM4 cells» we aimed to trace changes in expression of interferon-sensitive genes, and genes which expression may depend on stromal part of tumors and might play roles in enhancing of metastatic potential of tumorous cells. **Methods.** Mono cell cultures and cocultures of C57Fb fibroblasts and MM4 melanoma cells were used to investigate gene expression changes by PR-PCR. **Results.** On the set of 7 genes in the system «potential vector cells C57Fb/IFN- β /melanoma MM4 cells» we observe pattern of complicated changes in expression of genes, which activity is assigned towards the inhibition of motile and invasive properties of tumorous cells, and in the opposite direction. These changes may be mediated as by the vector fibroblasts or own tumor activated fibroblasts and by the action of interferon. **Conclusions.** We speculate the promise of finding factors enhancing the therapeutic effect of interferon directed toward stromal components of tumors.
Key words: cancer therapy, cancer-associated fibroblasts; melanoma, interferon, baculovirus.

БІЛИНСЬКА О.В.

Інститут рослинництва ім. В. Я. Юр'єва Національної академії аграрних наук України
61060, Харків, проспект Московський, 142, e-mail: bilinska@ukr.net

ВПЛИВ УМОВ ВИРОЩУВАННЯ ДОНОРНИХ РОСЛИН ТА СКЛАДУ ЖИВИЛЬНОГО СЕРЕДОВИЩА НА ЕФЕКТИВНІСТЬ ОТРИМАННЯ ГАПЛОЇДІВ РІПАКУ ЯРОГО В КУЛЬТУРІ ПИЛЯКІВ *IN VITRO*

Для ріпаку, як і для інших видів, встановлено чітку залежність індукції андрогенних структур та перебігу регенерації від умов вирощування рослин-донорів пиляків [1–3]. Зокрема, доведено, що оптимальним режимом для отримання високоякісного щодо індукції морфогенезу в культурі *in vitro* пиляків та ізольованих мікроспор матеріалу ріпаку є субоптимальна температура: 10 °C день/5 °C ніч [1, 4]. Однак такий температурний режим може бути підтриманий лише за наявності спеціальних камер штучного клімату з технічними можливостями для забезпечення істотного зниження температури при високому рівні освітленості, що неминуче призводить до значних витрат електроенергії. Менш енерговитратними є теплиці з комбінованим освітленням, але вони не забезпечують стабільного температурного режиму [5].

Слід зазначити, що з огляду на високу вартість вирощування рослин у камерах штучного клімату, польові умови при різних строках сівби нерідко залишаються єдиним засобом отримання вихідного матеріалу для біотехнологічних досліджень. Більш того, як показали наші експерименти, проведені на ячмені ярого, пожнивна сівба (липень–серпень) за штучного поливу дозволяє вирощувати матеріал, який не лише не

поступається рослинам оптимального весняного строку сівби за здатністю до андрогенезу *in vitro*, але й перевищує їх [6]. Практика поживної сівби, за рахунок якої проведення робіт переноситься на менш спекотні вересень і жовтень, на нашу думку, є особливо актуальною на тлі глобальних змін клімату.

Не менш важливим чинником для реалізації морфогенетичного потенціалу в культурі *in vitro* будь-яких експлантатів, включаючи пиляки [7–9], є склад живильного середовища. Для культивування пиляків ріпаку застосовуються середовища на основі композиції солей макро- та мікроелементів B5 [10] та MS [11]. Ізольовані мікроспори культивують також на середовищі NLN-13 [12], яке відрізняється зменшеним вдвічі вмістом нітратного азоту.

Характерною особливістю цих середовищ є високий вміст сахарози та низький вміст стимуляторів росту ауксинової дії. Разом з тим відомо, що за стресових умов, які можуть мати місце в період вирощування матеріалу для експериментів у галузі андрогенезу *in vitro*, підвищення концентрації ауксинів чи застосування у живильному середовищі їх більш активних за фізіологічним ефектом аналогів дозволяє отримати стабільніші результати [13].

Зважаючи на викладене вище, метою досліджень було визначення можливості вирощування рослин-донорів пиляків ріпаку яркого за поживної сівби та удосконалення складу сере-

Матеріали і методи

Як модельний генотип використано сорт ріпаку яркого (*Brassica napus* L.), у якого за результатами попередніх досліджень виявлено високу здатність до андрогенезу *in vitro* [14].

Сівбу проводили у третій декаді березня на дослідній ділянці по чорному пару ручною саджалкою широкорядним способом з шириною міжрядь від 45 см та відстанню в рядку між рослинами 15 см, на глибину 3 см. Норма висіву: 120 насінин на 1 м². Оптимальну густоту – 80 рослин на 1 м² – було сформовано шляхом проривки в фазі другої пари справжніх листків. З огляду на несприятливий гідротермічний режим у період вегетації застосовували штучний полив.

Поживну сівбу проводили у другій декаді серпня з дорощуванням рослин у теплиці в осінньо-зимовий період при температурі від 24 °С до 27 °С, освітленні лампами Махус 105 Вт і ДРВ-750 Вт. Частину рослин залишали на ділянці для перезимівлі, вкривши їх при зниженні температури до мінус 5 °С шаром листя.

Суцвіття або бутони для маніпуляцій *in vitro* добирали, починаючи з першої декади травня. При цьому керувалися рекомендаціями з літературних джерел щодо розміру бутонів з оптимальною фазою розвитку пиляків і деяких фенотипових маркерних ознак пиляків, пелюсток, мікроспор, пилку [4, 5, 15].

Суцвіття та бутони вміщували у зволожені пакети з фільтрувального паперу, які зберігали у чашках Петрі або металевих контейнерах у холо-

Результати та обговорення

Спроби отримати матеріал для маніпуляцій *in vitro* в осінньо-зимовий період з насіння, висіяного у вегетаційні посудини з ґрунтовою сумішшю у світловій кімнаті чи теплиці, незважаючи на досить високу освітленість (лампи ДРВ-750 Вт), не дали позитивного результату через значне підвищення температури (до 35 °С), викликане нагріванням ламп. Рослини після появи справжніх листків мали тонкі видовжені стебла і вилягали. Використання ламп Махус 150 Вт дозволило знизити температуру на рівні рослин до 27 °С, але вилягання спостерігалося у фазі проростків з сім'ядолями. Цікаво, що рослини, отримані з насіння *in vitro* і пересажені у вегетаційні посудини у фазі чотирьох справжніх листків з добре розвинутою кореневою

довища для культивування пиляків на основі зміни якісного та кількісного складу ауксинів, а також збільшення вмісту сахарози.

дильнику в темряві впродовж трьох діб при температурі 4 °С, потім висаджені пиляки – впродовж трьох діб при 35 °С, як рекомендовано [1, 15].

Стерилізацію бутонів проводили комерційним препаратом “Domestos” (концентрація 50,0 %, тривалість обробки від 20 хв до 25 хв) з подальшим відмиванням у трьох змінах стерильної дистильованої води.

Пиляки культивували в термостаті при температурі 26 °С на середовищі [6], яке містило солі макро- та мікроелементів В₅ [10], вітаміни В₁ – 10,0 мг/л; В₆ – 1,0 мг/л; РР – 1,0 мг/л; міоїнозитол – 100,0 мг/л; глютамін – 800,0 мг/л; НУК – 0,1 мг/л; 2,4-Д – 0,1 мг/л ; сахарозу – 100,0 г/л; агар-агар “Difco” – 0,8 %; рН 5,6–5,7. У дослідних варіантах було використано живильні середовища, які містили солі макро- та мікроелементів NLN-13 [12] (KN), сахарозу в збільшеній до 150,0 г/л концентрації (KS); 0,2 мг/л 2,4-Д (K₂); 0,5 мг/л 2,4-Д (K₅). Отримані ембріоїди пересаджували на середовище MS [11] без фітогормонів із зниженим до 10,0 г/л вмістом сахарози.

Ефективність ембріоїдогенезу у культурі пиляків *in vitro* оцінювали за такими показниками: кількість ембріоїдів і кількість рослин у відсотках від загального числа культивованих пиляків. Результати експериментів піддавали статистичній обробці за використання загальновідомих статистичних методів [16].

системою, були менш чутливими до температурно-світлового режиму.

Сівба в оптимальні для ріпаку яркого строки за достатньої кількості вологи в ґрунті дозволила отримати добре розвинуті рослини. Але підвищення температури повітря до 30 °С вже у третій декаді квітня і першій декаді травня, на які припадають фаза бутонізації і добір суцвіття для культури пиляків *in vitro*, призвело до істотного погіршення стану посівів.

Спостереження за ростом і розвитком рослин поживної сівби (третьа декада серпня) свідчать, що застосування штучного поливу в умовах літньої посухи дозволило одержати дружні сходи і зберегти посіви, а опади та помірна температура впродовж вересня–жовтня сприяли

формуванню рослин, які перевищили за площею листової поверхні рослини весняного строку сівби. При зниженні температури до 3 °С ці рослини були пересаджені у вегетаційні посудини і перенесені для дорошування у теплицю та використані у фазі бутонізації як матеріал для

досліджень (рис. 1). Слід зазначити, що за рахунок пересадки рослин більш пізніх фаз розвитку і скорочення тривалості вегетації в умовах штучного клімату було значно зменшено енерговитрати.



Рис. 1. Вирощування рослин сорту ріпаку ярого Аріон в умовах штучного клімату

Дослідження показали (рис. 2), що саме за використання високоякісного тепличного матеріалу у сорту Аріон було досягнуто високих показників гаплопродукції. Зокрема, частоти прямого ембріодогенезу та регенерації рослин становили відповідно 69,8 % і 53,8 %. За використання рослин весняного строку сівби було отримано майже вдвічі нижчі показники ембріодогенезу і регенерації рослин, що, безперечно, пов'язано з високою температурою (до 50 °С на

поверхні ґрунту і на рівні суцвіть) у момент досягнення оптимальної для добору бутонів фази розвитку.

Поодинокі рослини поживної сівби у відкритому ґрунті відновили вегетацію навесні одночасно з ріпаком озимим. Але вони значно поступалися матеріалу весняного строку сівби за якістю та за ефективністю морфогенезу в культурі пиляків *in vitro* (рис. 2).

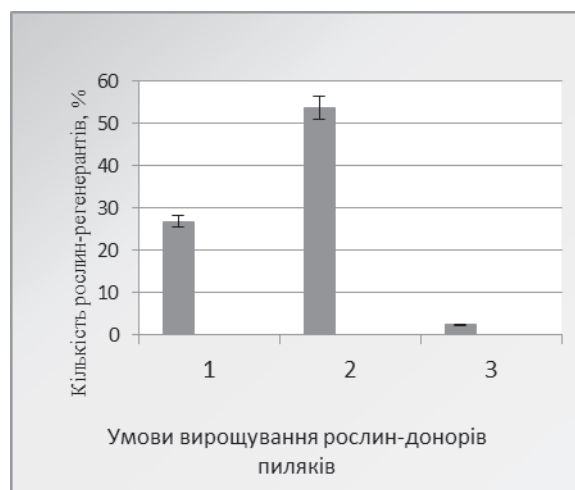
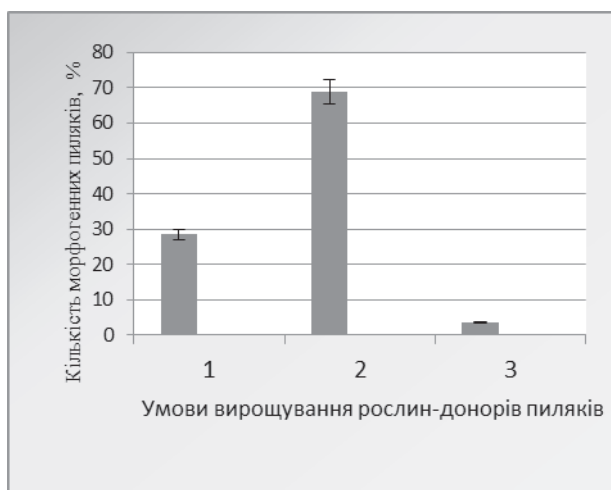


Рис. 2. Здатність до андрогенезу *in vitro* сорту ріпаку ярого Аріон за різних умов вирощування донорних рослин: 1 – поле, оптимальний строк сівби; 2 – поживна сівба, дорошування в теплиці; 3 – поживна сівба, перезимівля

Культивування пиляків на живильних середовищах, які різнилися за мінеральною основою, вмістом фітогормонів та сахарози, показало, що базове середовище [1] було більш ефек-

тивним, ніж інші варіанти (рис. 3). Зокрема, культура виявилася чутливою до зростання вмісту 2,4-Д навіть на 0,1 мг/л (середовище K₂).

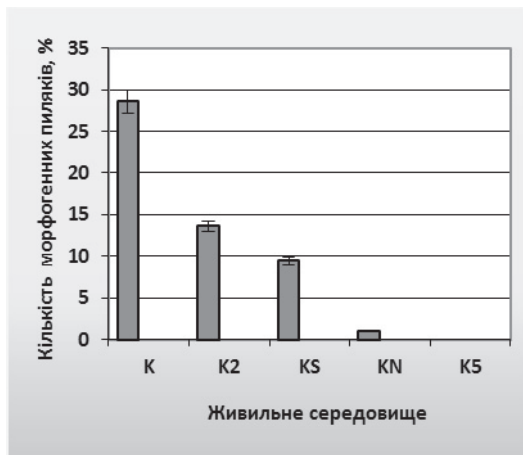


Рис. 3. Здатність до андрогенезу *in vitro* сорту ріпаку ярого Аріон в залежності від складу живильного середовища: К – солі макро- та мікроелементів В₅ (Gamborg, et al., 1968), по 0,1 мг/л 2,4-Д та НОК, 100,0 г/л сахарози; К₂ – 0,2 мг/л 2,4-Д, 100,0 г/л сахарози; KN – солі макро- і мікроелементів (Lichter, 1981), по 0,1 мг/л 2,4-Д та НОК, 100,0 г/л сахарози; К₅ – 0,5 мг/л 2,4-Д, 100,0 г/л сахарози; KS – по 0,1 мг/л 2,4-Д та НОК, 150 г/л сахарози.

Дещо несподіваним виявився результат, отриманий на середовищі з мінеральною основою NLN-13 (середовище KN). Це ефективне для культури ізольованих мікроспор середовище [13] містить підвищену до 130 г/л концентрацію

сахарази, що необхідно для підтримання високого осмотичного потенціалу. Але для культури пиляків *in vitro* підвищення вмісту сахарози мало негативний ефект.

Висновки

Агротемпературні умови Східного Лісостепу України дозволяють вирощувати високоякісний рослинний матеріал ріпаку ярого для біотехнологічних досліджень за комбінування поживної сівби з дорощуванням рослин в умовах штучного клімату. З огляду на те, що основним лімітуючим фактором у період літньої вегетації є недостатня кількість опадів доцільним є розміщення посівів на дослідних ділянках, забезпечених можливістю штучного поливу. Най-

більший вихід ембріодів і рослин-регенерантів у культурі пиляків *in vitro* сорту Аріон було отримано за використання як донорів пиляків рослин поживного строку сівби. Заміна композиції солей макро- та мікроелементів В₅ на NLN-13, а також підвищення концентрації 2,4-Д і сахарози призвели до зменшення частоти ембріодогенезу та регенерації рослин у культурі пиляків *in vitro* ріпаку ярого.

Література

1. Keller W.A., Armstrong K.C. High frequency production of microspore-derived plants from *Brassica napus* anther culture // *Z. Pflanzenzucht.* – 1978. – Vol. 80. – P. 100–108.
2. La K.-H., Pauls P.K. Plant growth environment effects on rapeseed microspore development and culture // *Plant Physiology.* – 1992. – Vol. 99. – P. 468–472.
3. Prakash J., Giles K.L. Induction and growth of Androgenic haploids // *Intern. Rev. Cytol.* – 1987. – Vol. 107. – P. 273–292.
4. Custers J.B. M. Microspore culture in rapeseed (*Brassica napus* L.) // *Doubled haploid production in crop plants.* – Dordrecht: Kluwer academic publishers, 2003. – P. 185–193.
5. Smýkalová I., Větrovcová M., Klíma M., Mářčáková I., Griba M. Efficiency of microspore culture for double haploid production in breeding project “Czech Winter Rape” // *Czech Journal of Genetics and plant breeding.* – 2006. – Vol. 42, №2. – P. 58–71.
6. Білинська О.В. Генотипові особливості індукції гаплоїдів ячменю (*H. vulgare* L.) методом культури пиляків *in vitro*: Автореф. дис. канд. біол. наук. – Харків, 1997. – 19 с.
7. Митрофанова И.В. Микрклональное размножение субтропических и тропических плодовых культур (обзор литературы) // *Тр. Никит. Бот. сада.* – 1997. – Т. 119. – С. 63–95.
8. Эмбриологические основы андроклинии пшеницы: атлас / Круглова Н.Н., Батыгина Т.Б., Горбунова В.Ю. и др.; отв. ред И.И. Шамров. – М.: Наука, 2005. – 99 с.
9. Wan G.L., Naeem M.S., Geng X.X., Xu L., Li B., Jilani G., Zhou W.J. Optimization of microspore embryogenesis

- and plant regeneration protocols for *Brassica napus* // International Journal of agriculture & Biology. – 2011. – Vol. 13. – P. 83–88.
10. Gamborg O. L., Miller R. A., Ojima K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells // Experimental Cell Research. – Vol. 50. – P. 151–158.
 11. Murashige T., Skoog F. A revised medium for growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. – 1962. – Vol. 15. – P. 473–497.
 12. Lichter R. Anther culture of *Brassica napus* L. in a liquid culture medium // Z. Pflanzenphysiol. – 1981. – Vol. 103. – P. 229–237.
 13. Kasha K.J., Simion E., Oro R., Yao Q.A., Hu T.C., Carlson A.R. An improved in vitro technique for microspore culture of barley // Euphytica. – 2000. – Vol. 120, №3. – P. 319–385.
 14. Білінська О.В., Сокольнікова Я.М. Особливості морфогенезу сорту ріпаку ярого (*Brassica napus* L.) Аріон у культурі *in vitro* пиляків і сім'ядольних експлантатів // Генетичні ресурси рослин для стабільного задоволення різноманітних потреб людей: матеріали Міжнародної наукової конференції. – Велика Бакта, 2012. – 26–27 вересня 2012. – С. 105–107.
 15. Абадовская Т.В. Особенности андрогенеза *in vitro* в процессе создания дигиплоидных линий рапса: Автореф. дис. канд. биол. наук. – Минск, 1994. – 18 с.
 16. Плохинский Н.А. Биометрия. – М.: Изд. Московского ун-та, 1964. – 367 с.

BILYNSKA O.V.

*Yurjev Plant Production Institute of National Academy of Agricultural Sciences of Ukraine
Ukraine, 61060, Kharkiv, Moskovsky av. 142, e-mail: bilinska@ukr.net*

EFFECT OF DONOR PLANT GROWTH CONDITIONS AND NUTRIENT MEDIUM COMPOSITION ON THE EFFICIENCY OF SPRING RAPESEED HAPLOID PRODUCTION IN ANTHER CULTURE *IN VITRO*

Aims. Donor plant growth conditions and nutrient medium composition together with genotype are known to be the decisive factors for determination of anther culture *in vitro* responsibility of different species. Investigations aimed to study a possibility of donor plant growth in summer/autumn period instead of traditional for spring rapeseed spring/summer one and to improve an induction medium for anther culture *in vitro*. **Methods.** Plants of spring rapeseed cv. Arion were grown in a plot (two sowing dates) and in a greenhouse. Aseptic anther culture was obtained according to standard procedure with some modifications. Isolated anthers were cultivated on five media differed by mineral salt, auxin and sugar content. **Results.** It was revealed that anthers isolated from plants growing during summer/autumn period in a field and then transferred to a greenhouse had the highest level of direct embryogenesis and plant regeneration. Nutrient medium containing B₅ macro- and micronutrients, 0,1 mg/l 2,4-D, 0,1 mg/l NAA, 100 g/L sucrose was appeared to be the best for spring rapeseed cv. Arion anther culture *in vitro*. **Conclusions.** The data indicate the advantages of donor plants growing in a moderate temperature regime in comparison with a high temperature one and a medium with a low level of auxins.

Key words: *Brassica napus* L., anther culture *in vitro*, plant growth conditions, nutrient media.

БУЛКО О.В., ЛЁШИНА Л.Г.

*Институт биоорганической химии и нефтехимии НАН Украины
Украина, 02160, Киев, Харьковское ш., 50, e-mail: obulko@mail.ru*

СОМАТИЧЕСКИЙ ЭМБРИОГЕНЕЗ ИЗ ЗИГОТИЧЕСКИХ ЗАРОДЫШЕЙ И КАЛЛУСА ГИНГГО ДВУЛОПАСТНОГО *GINKGO BILOBA* L.

Гингго двулопастное (*Ginkgo biloba* L.) – реликтовое растение и единственный представитель класса Гинкговых (*Ginkgoaceae*) из отдела гинкговидные (*Ginkgophyta*) надотдела голосеменных растений [1]. Гингго издавна использовали в восточной медицине, а с 60-х годов XX столетия начались научные исследования с кли-

ническими испытаниями препаратов из листьев гингго двулопастного. В химический состав листьев входят флавоноловые гликозиды - производные кемпферола и кверцетина, мирицетин; бифлавоноиды и их гликозиды (бисмозиды): сиядопитизин, билобетин, гинкгетин, изогинкгетин, аментофлавонол, а также антоцианидин, нон-