

- 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 ГИНКГО ДВУЛОПАСТНОГО *GINKGO BILOBA* L.

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

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

акозан, гексакозанол, пинит; шикимовая, линолевая, хинная и гидрогинголовая кислоты; лактоны, терпены (гинкголиды А, В, С и J, аллонтонны, тимол, бисаболол и билобалиды), катехины, воск, крахмал, маннан, пентозан, β -ситостерин, жирные и эфирные масла [2]. На основе субстанций листьев гинкго двулопастного фармакологические предприятия Франции, Германии, США, Канады, Швеции, Словении, Индии, Вьетнама производят большое количество препаратов, из которых в Украине разрешены для применения такие, как танакан, билобил, мемоплант, гинкор форт, гинкор гель [3]. Препараты гинкго билоба улучшают кровообращение, повышают снабжение кислородом сердца, головного мозга и других органов, имеют антиоксидантное действие, снижают уровень артериального давления. В настоящее время гинкго билоба – одно из пяти наиболее продаваемых в мире лекарственных растений. Разработка биотехнологии получения и клонального размножения высокопродуктивных, устойчивых к заболеваниям чистых линий с помощью соматического эмбриогенеза является перспективным и активно изучаемым направлением.

Материалы и методы

Плоды и листовые экспланты были собраны в ноябре 2012г. в НБС им. Н.Н.Гришко НАН Украины. Семязачатки, освобожденные от саркотесты, промывали в проточной воде, высушивали и хранили в темноте при 4°C в течение 2-х месяцев.

Методики стерилизации эксплантов гинкго подбирали экспериментально для каждого типа исходного материала. Листья и черешки для каллусогенеза нарезали фрагментами по 1 см², промывали в проточной воде 30 мин, выдерживали в 70% этиловом спирте 1 мин и погружали на 4-5 мин в 0,1% HgCl₂. Затем отмывали стерильной дистиллированной водой и помещали на агаризованную среду МС [7] или LM [8] с различным содержанием гормонов.

Семена гинкго четыре раза обжигали пламенем, снимали жесткую оболочку (склеротесту), выдерживали в 70% этаноле (1 мин) и 0,1% сулеме (6-9 мин). Зародыши, отделенные от эн-

Результаты и обсуждения

Стерилизация эксплантов *G. biloba* вызвала значительные трудности, что отмечалось ранее другими авторами [9]. Нами было опробовано много вариантов обеззараживания исходного материала, используя в качестве основного дезинфектанта 0,1% HgCl₂ или 0,1-0,3% AgNO₃, а

Соматический эмбриогенез подробно изучен у самых распространенных представителей голосеменных - хвойных [4]. У гинкго двулопастного прямой и непрямой соматический эмбриогенез были получены из зрелых и незрелых зиготических зародышей при добавлении к культуральной среде разных комбинаций экзогенных гормонов [5]. Причем наиболее эффективным считается введение достаточно высокой концентрации цитокинина (10 μ M БАП) [6]. Однако еще не отработано получение растений-регенерантов из соматических зародышей, культивируемых на средах для развития и укоренения с различными комбинациями экзогенных гормонов, которые, очевидно, накапливаясь в большинстве случаев, приводят к остановке роста и последующей гибели зародыша.

Целью данной работы является разработка биотехнологии получения соматических зародышей гинкго двулопастного из зиготических зародышей на безгормональных средах и из каллусной культуры на различных модификациях сред, а также цитоморфологическая характеристика полученных эмбриокультур.

досперма, размещали на агаризованной среде МС и МС ½ макросолей с модификациями (1%, 2% глюкоза; pH5,0, pH5,6; аквариумная вода). Для каждого варианта сред использовали по три вида зиготических зародышей разной степени созревания: незрелый глобулярный, незрелый в стадии позднего эмбриогенеза и зрелый зародыш. Опыты проводили в трех повторностях.

Условия инкубирования: темный термостат, температура 26°C \pm 1°, световой блок, 24°C \pm 2°C.

Цитоморфологический анализ проводили на стереоскопическом микроскопе МБС-9 (ЛЮМО) и на временных неокрашенных влажных препаратах на световом тринокулярном микроскопе KONUS BIOREX-3 со встроенной фотокамерой при 400 \times увеличении. Морфологические изменения фиксировались цифровой фотокамерой Nikon Coolpix P100 (Япония).

как вспомогательные – 70% и 96% этанол, раствор KMnO₄, детергент (моющее средство Gala), стерильную дистиллированную воду. В целом, при обеззараживании сегментов молодой листовой пластинки и черешков листьев гинкго наилучшие результаты мы получили при их обра-

ботке 70% этиловым спиртом (1,5мин) и 0,1% раствором сулемы (4-5мин). При стерилизации семян гинкго наиболее эффективным оказался метод с применением обжига пламенем (семена на 30-40с окунали в 96% этанол, после чего проносили над пламенем, которое гасили через 3-5с, чтобы не повредить семенную оболочку [10]). Такую процедуру повторяли четырёхкратно, затем с семян снимали верхний плотный слой (склеротесту) и эндотесту и проводили их последующую стерилизацию 70% этанолом (1 мин) и 0,1% сулемой (6-9 мин). Затем зиготические зародыши отделяли от гаметофитных тканей и размещали на агаризованной среде различного состава. Применение этих методик стерилизации позволило получить 65-70% обеззараженных эксплантов гинкго.

После размещения эксплантов листьев и черешков на среде МС или LM с экзогенными гормонами (варианты комбинаций гормонов: 2 мг/л 2,4-Д; 1 мг/л 2,4-Д + 1 мг/л кинетин; 0,5 мг/л НУК+0,2 мг/л 2,4-Д + 0,9мг/л БАП; 0,1 мг/л НУК + 0,1мг/ л кинетин) рост каллусных клеток наблюдался через 14-17 дней на всех вариантах. На фрагментах листовой пластины и отрезках черешков каллус нарастал вдоль линий надреза. Дедифференцированные клетки были рыхлые, легко распадающиеся и имели светло-желтую окраску. На среде МС с добавлением 0,1 мг/ л НУК + 0,1мг/ л кинетина наблюдался сильно оводненный каллус.

Активнее всего каллус образовывался на листовых эксплантах на среде LM+1мг/л НУК + 0,1мг/л кинетина (с частотой 94%). Средняя частота каллусогенеза составляла 88,4%. Субкультивирование активно пролиферирующего каллуса проводили на среде МС с добавлением 2мг/л БАП, 0,5 мг/л НУК, 0,5 мг/л ИУК и

0,2мг/л кинетина (среда VB). Периодичность пассирования составляла 25-30 суток.

Какие-либо модификации сред не приводили к образованию эмбрионного каллуса. Поэтому для инициации морфогенеза мы использовали среду МС со следующими комбинациями фитогормонов: 0,5 мг/л БАП + 0,5 мг/л кинетина; 0,75 мг/л БАП + 0,75 мг/л кинетина; 1,5 мг/л БАП + 1,5 мг/л кинетина; 1 мг/л БАП+ 0,05 мг/л НУК; 1 мг/л кинетина+ 0,05 мг/л НУК; 2мг/л БАП+ 0,1 мг/л НУК; 2мг/л кинетина+ 0,1 мг/л НУК; 1 мг/л НУК; 0,1 мг/л НУК; 1мг/л ИМК; 0,1мг/л ИМК. После трех недель культивирования на всех средах наблюдалось подсыхание каллуса и остановка роста. После переноса со сред с 1 мг/л БАП+ 0,05 мг/л НУК и 1мг/л кинетина+ 0,05 мг/л НУК на среду без гормонов, при инкубации культуры на свету каллус приобретал способность к хлорофиллообразованию. Отдельные участки приобретали темно-зеленый цвет и на них появлялись морфогенные образования (на стадии глобулы и сердца). Однако дальнейшего развития зародышей не наблюдалось. На МС $\frac{1}{2}$ с добавлением 1 мг/л НУК и 0,1мг/л ИМК появлялись короткие утолщенные корешки. Добавление высокой концентрации цитокинина (до 3 мг/л) и повышение содержания сахарозы до 5 г/л с целью стимуляции морфогенеза не оправдало себя. Наблюдалось потемнение каллуса, замедление роста и постепенное его засыхание.

Для соматического эмбриогенеза из зиготических зародышей использовали зрелые и незрелые зародыши (рис.1), отделенные от гаметофита (эндосперма).

Следует отметить, что 50±1,3% из исследуемых семязачатков гинкго не содержали зародыша.

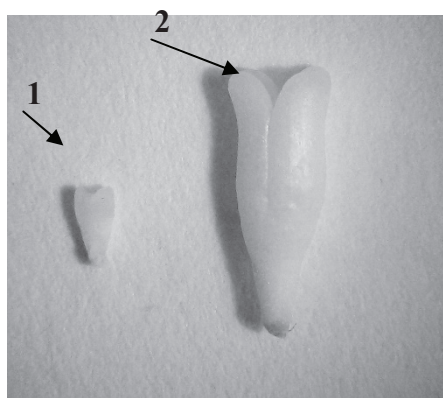


Рис. 1. Зиготические зародыши: незрелый (1), зрелый (2)

После стерилизации по описанной выше методике зародыши высаживали на следующие варианты сред (таблица 1):

Зародыши инкубировали в темноте (5 дней – при 10 °С, затем 1 сутки – при комнатной температуре, потом – 7 дней в термостате

при 26 °С), а в дальнейшем переносили на световой блок с температурой 22-24 °С, причем продолжительность освещения постепенно увеличивали с 3-5 часов (первые 5 дней) до 16 часов в сутки (с 19-го дня инкубации).

Признаки роста появились на 8-14-й день после высадки на всех вариантах сред. У 90% зрелых зиготических зародышей первичные боковые органы – семядоли раскрылись и появилась почечка (плюмула), а на гипокотиле появился зародышевый корешок. Незрелые зародыши вели себя по-разному. На вариантах сред №№ 2, 4, 6 и 7 проявилась тенденция к образованию неэмбриогенного каллуса, из чего можно сде-

лать вывод о том, что понижение рН среды до 5,0 стимулирует каллусогенез, как и приготовление питательной среды на основе воды из аквариума. На 18-й день на МС с половинным содержанием макроэлементов (№№ 5 и 6) на зародышах в стадии позднего эмбриогенеза появились зародышевые корешки. Эффективность роста клеток зависела от размера исходного зародыша. Маленькие глобулярные зародыши на всех вариантах сред лишь немного подрастали, а зародыш в стадии позднего эмбриогенеза активно формировал эмбриогенный и неэмбриогенный каллус, что согласуется с данными, представленными [6].

Таблица 1. Варианты сред для проращивания *G. biloba*

№№ вариантов среды	рН	Содержание глюкозы, (%)	Содержание макроэлементов МС, (%)	Основа
1(К)	5,6	2	100	H ₂ Odist
2	5,0	2	100	H ₂ Odist
3	5,6	1	100	H ₂ Odist
4	5,0	1	100	H ₂ Odist
5	5,6	2	50	H ₂ Odist
6	5,6	2	50	аквариумная вода
7	5,6	2	100	аквариумная вода

Дальнейшее культивирование на свету привело к позеленению отдельных групп клеток и образованию очагов эмбриогенного каллуса. На средах №№3 и 5 на зеленых участках появи-

лись зачатки соматических эмбрионов (рис. 2). На эмбрио генном каллусе размером 1-2 мм наблюдалось появление 2-3-х зародышей.

Цитологический анализ показал, что паренхимные клетки неэмбриогенного каллуса, исследуемые в фазе стационарного роста, имеют вытянутую форму, с четко визуализируемыми ядрами и включениями (рис. 3а).

Клетки расположены хаотично по отношению друг к другу. В эмбриогенном каллусе клетки более растянуты, структурированы и образуют эмбриональные трубки с примыкающими к ним кластерами эмбриональных глобул (рис. 3, б).

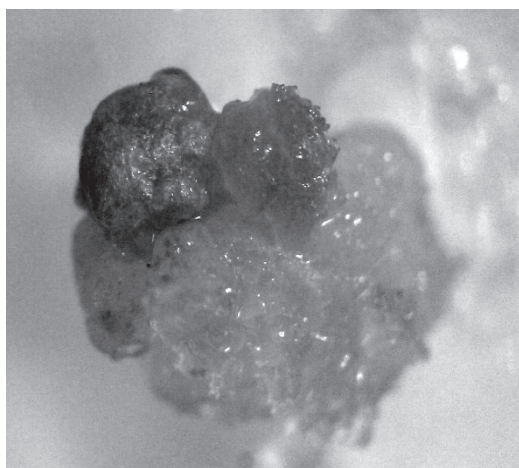
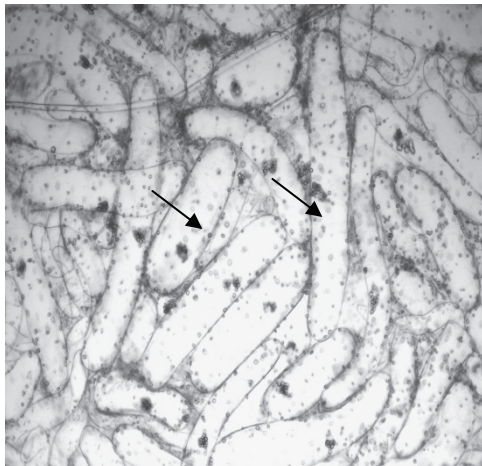
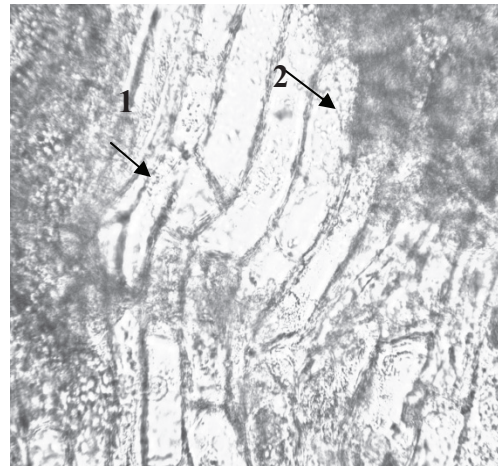


Рис. 2. Эмбриогенный каллус *Ginkgo biloba* через 30 суток культивирования. Стрелочками показаны пролиферирующий эмбриогенный каллус соматические зародыши распался на фрагменты, которые после пересадки продолжали активно расти



а



б

Рис. 3. Клетки неэмбриогенного (а) и эмбриогенного (б) каллуса гинкго двулопастного. 1 – эмбриональные трубки; 2 – эмбриональные глобулы

Выводы

Показано, что из незрелых зародышей гинкго двулопастного путем варьирования минерального состава и концентрации углеводного компонента культуральной среды можно получить соматические эмбрионы без использования экзогенных фитогормонов. Изменение содержания глюкозы с 2% на 1% и снижение концентрации макросолей в два раза инициирует образование соматических зародышей, которые в дальнейшем можно культивировать на среде для развития, содержащей фитогормоны. Использование безгормональной среды на стадии инициации эмбриогенеза уменьшает негативное дейст-

вие накапливающихся экзогенных фитогормонов, что позволит в дальнейшем повысить процент выживаемости полученных соматических эмбрионов.

Рыхлый каллус гинкго имеет очень низкий морфогенный потенциал, поэтому он образует морфогенные структуры только в результате культивирования на среде с добавлением гормонов. Внесение 1 мг/л БАП+ 0,05 мг/л НУК и 1 мг/л кинетина+ 0,05 мг/л НУК при инкубации на свету стимулирует появление соматических зародышей, а 1 мг/л НУК и 0,1мг/л ИМК инициирует появление ризогенных образований.

Литература

1. Рейвн П., Эверт Р., Айкхорн С. Современная ботаника. – М.: Мир., 1990. – Т.1. – 348 с.
2. Зузук Б. М., Куцик Р.В., Томчук Ю., Дармограй Р. Е. Гинкго билоба (*Ginkgo biloba L.*) (Аналитический обзор) // Провизор. – 2001. – № 19, 21-23.
3. Державний реєстр лікарських засобів України. <http://www.drlz.kiev.ua>.
4. Tautorus T.E., Fowke L.C., Dunstan D.I. Somatic embryogenesis in conifers // Can. J. Bot. – 1991. – Vol. 69. – P. 1873-1899.
5. Choi P.-S., Cho D.-Y., Soh W.-Y. Shoot Organogenesis from Immature Zygotic Embryo Cultures of *Ginkgo biloba* // Biol. Plantarum. – 2003. – Vol. 47, №2. – P. 309-312.
6. Laurain D., Chenieux J.-C., Tremouillaux-Guiller J. Somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of *Ginkgo biloba* // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. – 1996. – Vol. 44. – P. 19-24.
7. Murashige I., Scoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plantarum. – 1962. – Vol. 15, №3. – P. 473-497.
8. Litvay J.D., Johnson M.A., Verma D., Einspahr D., Weyrauch K. Conifer suspension culture medium development using analytical data from developing needles // IPG Technical paper series. – 1981. – №115. – IPC, Appleton, Wisconsin.
9. Гузь М.М., Остудімов А.О. Особливості розмноження гінкго дволопатевого in vitro // Науковий вісник НЛТУ України. – 2008. – Вип. 18.7. – С. 7-16.
10. Черевченко Т.М., Лаврентьева А.Н., Иванников Р.В. Биотехнология тропических растений in vitro. – К.: Наук. Думка, 2008. – 560 с.

BULKO O.V., LIOSHINA L.G.

*Institute of Bioorganic Chemistry and Petrochemistry NAS of Ukraine
Ukraine, 02160, Kyiv, Kharkivske hwy, 50, e-mail: obulko@mail.ru*

SOMATIC EMBRYOGENESIS FROM ZYGOTIC EMBRYOS AND CALLUS *GINKGO BILOBA* L.

Aims. Development of biotechnology *Ginkgo biloba* L. somatic embryos from zygotic embryos on hormone-free media and from callus culture on different modifications of media. **Methods.** Immature zygotic embryos and callus were cultured on different media modifications (pH, glucose content makrosalt) in the light at 24±2°C for one month to induce embryogenesis. At various stages of development the cytological analysis was carried. **Results.** We have shown that by choosing the media (the glucose reduction to 1% and a decrease makrosalt twice) from immature embryos of somatic embryos can be obtained without the use of exogenous phytohormones. Adding to the callus culture 1 mg/l BA +0.05 mg/l NAA and 1 mg/l kinetin+0.05 mg/l NAA, incubated in the light can stimulate the formation of somatic embryos, and 1mg/l NAA and 0,1mg/l IBA initiates rhizogenesis. **Conclusions.** From immature embryos of *Ginkgo biloba* can be obtained somatic embryos without the exogenous phytohormones using different media compounds. Formation somatic embryos in callus ginkgo is possible only on the media with hormones.

Key words: *Ginkgo biloba* L., somatic embryogenesis, zygotic embryos, callus.

ГЕРАСИМЕНКО И.М., ШЕЛУДЬКО Ю.В.

*Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины
Украина, 03680, Киев, ул. Заболотного 148, e-mail: ysheludko@ukr.net*

ГЕТЕРОЛОГИЧЕСКИЕ ТРАНЗИТНЫЕ ПЕПТИДЫ ОБЕСПЕЧИВАЮТ ИМПОРТ РЕПОРТЕРНОГО БЕЛКА В ХЛОРОПЛАСТЫ С РАЗНОЙ ЭФФЕКТИВНОСТЬЮ

Использование растений в качестве систем для синтеза гетерологических белков имеет ряд важных преимуществ. Прежде всего это возможность пост-трансляционных модификаций эукариотического типа, относительно низкая вероятность загрязнения готового продукта патогенами и токсинами, опасными для человека, а также сравнительно низкая себестоимость производства [1]. Основным недостатком генетически-модифицированных растений с точки зрения биотехнологии является обычно низкое содержание целевого белка в результате невысокого уровня экспрессии трансгена и/или действия растительных протеаз. Разработаны подходы, позволяющие увеличить количество накапливающегося белка за счет оптимизации разных процессов: трансформации растений и интеграции трансгена, его транскрипции, трансляции и обеспечения стабильности конечного продукта [2]. Подбирая компартмент растительной клетки, оптимальный для накопления гетерологического белка, часто удается значительно повысить стабильность и, следовательно, содержание целевого продукта [2, 3].

Белки, которые кодируются ядерными генами и функционируют в хлоропластах, синтезируются в виде предшественников, имеющих

на N-конце так называемый транзитный пептид, который удаляется в ходе транспорта. Транзитные пептиды после фосфорилирования цитоплазматическими протеинкиназами в комплексе с шаперонами взаимодействуют с системами транслокации через мембраны хлоропластов, которые обеспечивают энергозависимый транспорт внутрь органеллы [4]. Присоединение к N-концу белка гетерологического транзитного пептида приводит к накоплению целевого продукта внутри хлоропластов [5], однако есть данные о том, что использование аналогичных сигналов внутриклеточного транспорта из разных видов может значительно влиять на уровень накопления рекомбинантного белка [3, 6].

Для накопления рекомбинантных белков в хлоропластах нами были выбраны два транзитных пептида (предшественников малой субъединицы рибулозобисфосфаткарбоксилазы *Nicotiana tabacum* и активазы рубиско *Spinacia oleracea*). Была подтверждена их способность обеспечивать транспорт репортерного зеленого флуоресцентного белка в хлоропласты *N. excelsior* и показана различная эффективность этого процесса при помощи исследованных транзитных пептидов.