

10. Дрейнер Дж., Скотт Р. Выделение нуклеиновых кислот из клеток растений // Генная инженерия растений. - М., 1991. - С. 241 - 245.
11. Harsh Pal Bais, R. T. Venkatesh, Arun Chandrashekar, G. A. Ravishankar Agrobacterium rhizogenes-mediated transformation of Witloof chicory –In vitro shoot regeneration and induction of flowering // Current Sci. – 2001. - Vol. 80, № 1. - P. 83-87.
12. Vermeulen A., Vaucheret H., Pautot V., Chupeau Y. Agrobacterium mediated transfer of a mutant Arabidopsis acetolactate synthase gene confers resistance to chlorsulfuron in chicory (*Cichorium intybus* L.) // Plant Cell Rep. - 1992, Vol. 11, № 5-6. - P. 243-247.
13. Vijn I., van Dijken A., Sprenger N., van Dun K., Weisbeek P., Wiemken A., Smeekens S. Fructan of the inulin neoseris is synthesized in transgenic chicory plants (*Cichorium intybus* L.) harbouring onion (*Allium cepa* L.) fructan:fructan 6G-fructosyltransferase // The Plant J. – 1997. – Vol. 11, № 3. - P. 387 – 398.
14. Матвеева Н.А., Василенко М.Ю., Шаховский А.М., Кучук Н.В. Агробактериальная трансформация салата (*Lactuca sativa* L.) конструкциями, несущими гены бактериальных антигенов из *Mycobacterium tuberculosis* // Цитология и генетика. – 2009. – Т.44, № 2. – С. 27-32.

### Резюме

Методом агробактеріальної трансформації отримані генетично модифіковані рослини цикорію сорту Пала росса з геном синтезу інтерферону *ifn-α2b* та з геном, що кодує синтез туберкульозного антигену ESAT6 з частотою трансформації експлантів 7,7 – 26,9%. Проведені дослідження показують, що цикорій є перспективним об'єктом генетичної трансформації, зокрема, може стати основою створення так званих біовакцин.

Методом агробактериальной трансформации получены трансгенные растения цикория сорта Пала росса с геном синтеза интерферона *ifn-α2b* и геном, кодирующим синтез туберкулезного антигена ESAT6. Цикорий может быть перспективным объектом генетической трансформации, в частности, может стать основой создания так называемых биовакцин.

Transgenic chicory plants cv. Pala rossa with gene coding synthesis of tubercular antigene ESAT6 and *ifn-α2b* genes have been resieved via Agrobacterium-mediated transformation with frequencies 7,7 – 26,9%. Chicory can be perspective object of genetic transformation, in particular, can become a basis of creation of so-called biovaccines.

### МИХАЛЬСЬКА С.І., СЕРГЄЄВА Л.Є., ТИЩЕНКО О.М.

Інститут фізіології рослин та генетики НАН України, Україна, 03022, Київ, вул. Васильківська 31/1, e-mail: oltyko@gmail.com

### МІНЛИВІСТЬ ГЕНОМУ КЛІТИННОЇ ЛІНІЇ СОЇ, СТІЙКОЇ ДО ОКСІАНІОНІВ ВОЛЬФРАМУ

Ускладнення генетико-селекційних програм потребує пошуку нетрадиційних підходів та методів, які дозволяють виявити та використати всі потенційні можливості рослинного організму для підвищення їх стійкості до несприятливих факторів довкілля. Практичне використання культури тканин рослин стимулюється високим рівнем генетичних змін, які з одного боку, можуть бути обумовлені гетерогенністю вихідного експланту, з іншого – умовами культивування *in vitro*. Генетична гетерогенність калюсних ліній може служити основою для технології створення генотипів з новими ознаками і подальшого отримання рослин – регенерантів або клітинних штамів з бажаними якостями [1-6].

Для гарантованого відбору цінних мутацій, що виникають на рівні інтактної рослини *in vivo* або при культивуванні *in vitro* рослинних тканин, запропоновано напрямок клітинної селекції, який полягає у створенні селективних систем з використанням летальних концентрацій іонів важких металів [7]. Теоретично висунуто

припущення про можливість відбору клітинних ліній з перехресною стійкістю до абіотичних стресів та іонів важких металів, які не є фізіологічно необхідними для рослинного організму та здатні в мікрокількостях чинити багатofакторний негативний вплив на функціонування клітин дикого штаму. Очевидно, що пріоритет будуть мати ті токсичні елементи, які не здатні індукувати суттєвих порушень і перебудов у структурній організації геному [7]. Одними із таких токсичних елементів можуть бути оксіаніони вольфраму, які чинять багатовекторний вплив на фізіолого-генетичні процеси, в тому числі на експресію генів, що реалізується на рівні транскрипції та трансляції.

Нами отримані клітинні лінії сої (*Glycine max* L., Merr), стійкі до токсичних концентрацій вольфрамат оксіаніонів (WR), які крім того, мають перехресну стійкість до модельованих іонних, осмотичних стресів та іонів ванадію. Методом RAPD- аналізу був показаний низький рівень мінливості ДНК WR-лінії [8]. Ці властивості WR- ліній роблять їх адекватною модельною системою для вивчення на клітинному рівні молекулярно-генетичних та цитогенетичних аспектів комплексної стійкості рослин.

Метою даної роботи було цитологічне дослідження вихідного калюсу та тривало культивованої клітинної лінії сої, стійкої до летальних концентрацій вольфраму.

#### **Матеріали і методи**

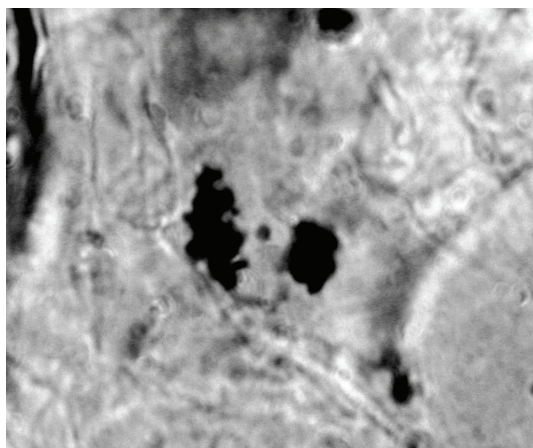
Об'єктом дослідження служили: калюс, індукований із листкової пластинки сої сорту Київська -27 на середовищі B5 Гамборга, та WR- лінія, яка була отримана методом „плейтингу” на модифікованому селективному середовищі B5, що замість молібдену містило вольфрамат-оксіаніони в концентрації 1мМ, яка є летальною для клітинних культур дикого типу, крім того, азот був присутній тільки в нітратній формі.

Цитогенетичне дослідження проводили в період найбільшої мітотичної активності клітин, на сьому добу пасажу. Матеріал фіксували в суміші етилового спирту та льодяної оцтової кислоти (3:1) протягом доби за температури 4°C і переносили в 70 % етиловий спирт. Для аналізу зразки відмивали декілька разів у дистильованій воді і переносили для мацерації у 5N HCl кімнатної температури на 20 хвилин. Калюсні тканини фарбували 2 %-ним розчином ацетоорсеїну за кімнатної температури протягом 2-3 діб. Тимчасові давлені препарати готували в 45% оцтовій кислоті за методикою Паушевої [9].

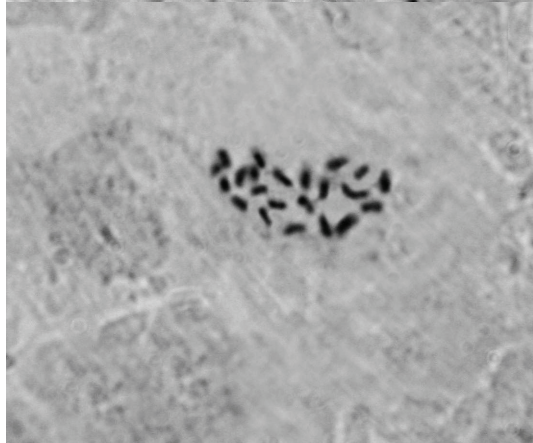
#### **Результати та обговорення**

Клітини інтактних рослин сої (*Glycine max* L., Merr) мають 40 хромосом ( $2n=4x=40$ ). Припущено, що походження цього виду пов'язане з ало- або автополіплоїдизацією [10].

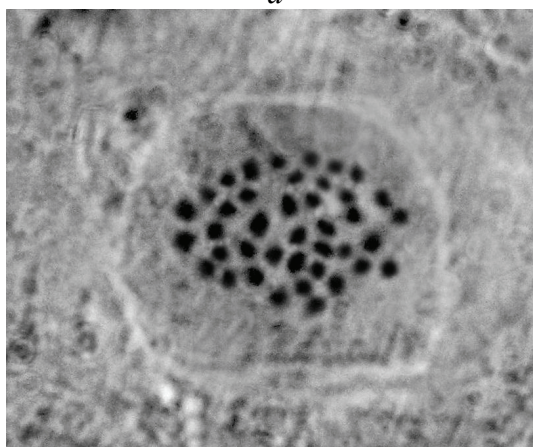
Цитологічний аналіз клітин вихідного калюсу (1 пасаж), показав широке варіювання числа хромосом від 10 до 60 із двома чітко вираженими модальними класами 2x та 4x, які складають 42,8% та 35,7% відповідно. У 14,2% клітин відмічено редукцію числа хромосом – їх кількість не перевищувала 10 (1x). Приблизно з однаковою частотою (у сумі близько 7%) спостерігалась поява анеуплоїдних та поліплоїдних клітин. Поряд з цим були виявлені структурні перебудови хромосом, які представлені у вигляді одиничних фрагментів, однак такі порушення зустрічалися досить рідко з частотою близько 1 % (рис.1.а.).



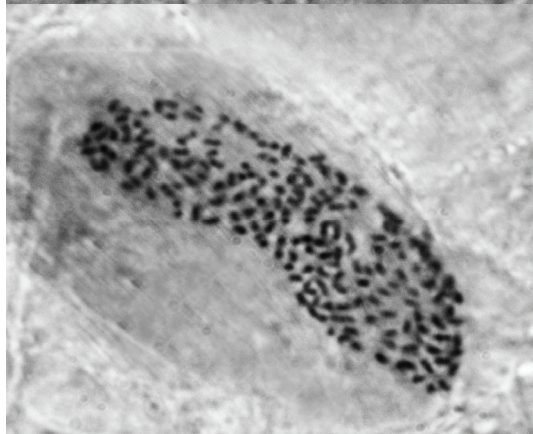
*a*



*б*



*в*



*г*

Рис. 1. Мітотичні клітини вихідного калюсу та WR- лінії сої  
*a* – одиничний фрагмент вихідного калюсу; *б* – гаплоїда клітина ( $n=2x=20$ ); *в* –  
диплоїдна клітина ( $2n=4x=40$ ); *г* – поліплоїдна клітина ( $2n=12x=120$ ) WR- лінії.

При культивуванні вихідного калюсу на середовищі із селективною дозою іонів вольфраму (1мМ) клітин на стадії мітозу знайти не вдалося. Крім того, за летальної дози цього стресору здійснювалася фрагментація ДНК клітин із формуванням безперервного спектру фрагментів широкого діапазону молекулярних мас. Це свідчить про загибель клітин шляхом некрозу за дії токсичних концентрацій оксіаніонів вольфраму.

Вольфрам-стійка клітинна лінія восьмого пасажу представляє собою гетерогенну популяцію, в якій зустрічаються клітини різного рівня плоідності з розмахом мінливості числа хромосом від 7 до 90. Модальний клас складала клітини з кількістю хромосом біля 4x (60%), тоді як число хромосом біля 2x було виявлено у 10%, а 3x - у 20% клітин. Кількість анеуплоїдних та поліплоїдних клітини складала близько 3% та 7%, відповідно. У тривало культивованій вольфрам-стійкій лінії 43 пасажу модальний клас становили клітини з числом хромосом біля 4x (57,8 %). При цьому спостерігався більший спектр за числом хромосом - від 20 до 120 на клітину, тобто не зустрічалися метафази з кількістю хромосом 1x. Клітини з числом хромосом 2x та 6x зустрічалися з частотою - 11,5%, 3x – виявлені у 3,8% клітин, а 8x та 12x становили приблизно 15,5 % загальної кількості всіх мітотичних клітин. Серед близько 300 проаналізованих мітозів стійкої клітинної лінії різного терміну культивування анафазних аберацій не спостерігалось. На рис. 1(б, в, г) представлені приклади типових метафаз WR-лінії.

Отримані дані свідчать, що на відміну від вихідного калюсу у вольфрам-стійкій клітинній лінії 8-го та 43-го пасажів в присутності летальних доз стресора спостерігається один модальний клас з числом хромосом - біля 4x. Крім того, відмічається тенденція до підвищення рівня плоідності від тривалості культивування, про що свідчить збільшення клітин з числом хромосом більшим 4x.

Відомо, що при культивуванні в умовах *in vitro* тільки деякі культури можуть мати стабільне число хромосом, тоді як інші зазнають швидких змін геному. Численні дані стосовно генетичних змін в культурі *in vitro* дають підставу вважати, що збереження клітинами генетичної стабільності може розглядатися лише як виключення, а культивовані клітини вищих рослин є штучно створеними популяціями, головною особливістю яких є висока гетерогенність та мінливість [3]. Міксоплоїдія - поширене явище не тільки при культивуванні *in vitro*, а й досить часто зустрічається в нормі у клітинних популяціях меристем. Тому гетерогенність клітин за числом хромосом вже на перших етапах культивування контрольного калюсу може обумовлюватися як варіабельністю вихідних клітин експланта, так і компонентами живильного середовища [11,12].

Відносну стабільність модального класу хромосом (біля 4x) клітин WR-лінії можна пояснити тим, що скоріш за все вона утворилася в результаті розмноження мутантної клітини, відібраної при селекції на стійкість до летальної концентрації оксіаніонів вольфраму. В наших дослідах такі клітини зустрічаються з частотою  $10^{-6}$ .

Взагалі, отримані дані свідчать про відносно низький рівень цитологічної та молекулярно-генетичної мінливості геному вольфрам-стійкої лінії сої.

#### Література

1. Breiman A., Felsenburg T., Galun E. Is *Nor* region variability in wheat invariably caused by tissue culture? // Theor. Appl. Genet. — 1989. — Vol. 77. — P. 809-814.
2. Кунах В.А. Геномная изменчивость соматических клеток растений. 1. Изменчивость в онтогенезе // Биополимеры и клетка. — 1994. — Т. 10, № 6. — С. 5-35.
3. Кунах В.А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. — К.: Логос, 2005. — 730 с.
4. Сидоров В.А. Биотехнология растений. Клеточная селекция // Киев: Наукова думка. —

1990. – 280с.;
5. *Maliga P.* Isolation and characterization of mutants in plant cell cultures // *Ann.Rev.Plant Physiol.* – 1984. – 35. – P. 519-542
  6. *Сергеева Л.Е.* Изменения культуры клеток под действием стресса. – К.: Логос, 2001. – 100 С.
  7. Сергеева Л.Е. Новая среда с ионами бария – альтернативная система для отбора солеустойчивых клеточных линий // *Біотехнологія.* – 2002. - 2. – С.47-52.
  8. *Тищенко Е.Н., Сергеева Л.Е., Михальская С.И., Данильченко О.А.* RAPD- анализ вольфрамустойчивой клеточной линии сои с комплексной толерантностью к осмотикам // *Физиология и биохимия культ. растений.* - 2008. – Т.40. - №4. – С.329-337.
  9. *Паушева З. П.* Практикум по цитологии растений. М.1988. – 280 с.
  10. *Roth E. J, Frazier B L., Aruya N. R. Lark K G.* Genetic variation in an inbred plant: Variation in tissue cultures of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] // *Genetic* - 121 – 1989 - P.359-368.
  11. *Бублик Е.Н., Адонин В.И., Кунах В.А.* Цитогенетическая изменчивость клеточных линий *Ungernia victoris* при выращивании на питательных средах различного состава // *Цитология и генетика.* – 2008. - №1. С.29 -36.
  12. *Чугункова Т.В., Дубровная О.В.* Цитогенетический анализ каллусных культур и растений – регенерантов, полученных из эксплантов сахарной свеклы различной плоидности // *Цитология и генетика.* – 1998. – Т.32, №4. – С.9-15.

#### **Резюме**

Показано, що на відміну від вихідного калюсу, в якому виявлено два модальних класи числа хромосом (біля 2x та 4x), у вольфрам-стійкої клітинної лінії спостерігається один модальний клас (біля 4x). Крім того, відмічається тенденція до підвищення рівня плоїдності вольфрамстійкої лінії із збільшенням терміну культивування в умовах *in vitro*.

Показано, что в отличии от исходного каллуса, у которого определено два модальных класса числа хромосом (около 2x и 4x), у вольфрамустойчивой клеточной линии наблюдается один модальный класс числа хромосом (около 4x). Кроме того, отмечается тенденция к увеличению уровня плоидности у вольфрамустойчивой клеточной линии с повышением срока культивирования в условиях *in vitro*.

There were shown that unlike the initial callus with two modal chromosome classes (near 2x and 4x) the tungsten resistant cell line is characterized by single modal chromosome class (near 4x). Besides that tendency towards polyploidy in tungsten resistant cell line with the increasing of cultivation tern in vivo is exhibited.

**РУДАС В. А., ШАХОВСЬКИЙ А. М., МОРГУН Б. В., МАТВЄЄВА Н. А., КУЧУК М. В.**

*Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України*

*Україна, 03680, Київ, вул. Академіка Заболотного, 148, e-mail: [rudasv@gmail.com](mailto:rudasv@gmail.com)*

#### **ОТРИМАННЯ ТРАНСГЕННИХ РОСЛИН КАРТОПЛІ СТІЙКИХ ДО ГЕРБИЦИДУ БАСТА, ЩО МІСТЯТЬ ГЕН *cup11A1* ЦИТОХРОМУ P450sc**

Створення сортів культурних рослин з підвищеною продуктивністю та стійкістю до гербіцидів є нагальною вимогою нашого часу. Використання сучасних біотехнологічних методів і, зокрема, генетичної трансформації рослин дозволяє значно скоротити час отримання рослин з бажаними характеристиками.

Метою нашого дослідження було отримання методами генної інженерії рослин картоплі з підвищеною біологічною продуктивністю та стійкістю до гербіцидів. Вибір