

величины экспланта; использование сегментов длиной 7-10 мм позволяет получать наибольшее количество регенерантов.

#### **Литература**

1. Pretova A., Obert B., Bartosova Z. Haploid formation in maize, barley, flax, and potato // *Protoplasma*.- 2006.- Vol. 228, № 1.- P. 107-114.
2. Поляков А. В. Биотехнология в селекции льна. – Тверь.- 2000.- 180 с.
3. Larkin P., Scowcroft W.R. Somaclonal variation – a novel source of variability from cell culture for plant improvement // *Theor. Appl. Genet.*- 1981.- V. 60, №4.- P. 197-214.
4. Nichterlein K., Friedt W. Plaht regeneration from isolated microspores of linseed (*Linum usitatissimum* L.) // *Plant Cell Rep.*- 1993.- V.12, №3.- P. 426-430.
5. Steiss R., Schuster A., Freidt W. Development of linseed for industrial purposes via pedigree-selection and haploid technique // *Industrial Crops Products*- 1998.- V.7, №3.- P. 303-309.
6. Murashige T., Scoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant.*- 1962.- V. 15, №4.- P. 473-497.
7. Rutkowska-Krause I., Mankowska G., Lukaszewicz M., Szopa J. Regeneration of flax (*Linum usitatissimum* L.) plants from anther culture and somatic tissue with increased resistance to *Fusarium oxysporum* // *Plant Cell Rep.*- 2003.- V.22, №2.- P.110-116.
8. Орловская О.А., Сакович В.И., Лемеш В.А., Хотылева Л.В. Особенности каллусогенеза и органогенеза межсортовых гибридов льна F<sub>1</sub> (*Linum usitatissimum* L.) // Доклады НАН Беларуси.- 2008.- Т.52, №1.- С. 88-91.

#### **Резюме**

Изучено влияния генотипа и величины гипокотильного сегмента на процессы каллусогенеза и регенерации растений льна в культуре *in vitro*, для разработки ускоренных методов вегетативного размножения ценных генотипов льна. Установлена зависимость регенерационной способности побегов из гипокотильных сегментов от генотипа и величины экспланта; использование сегментов длиной 7-10 мм позволяет получать наибольшее количество регенерантов.

Вивчено вплив генотипу величини гіпокотильного сегменту на процеси калусогенеза регенерації мі жсортових гібридів льону в культурі *in vitro*, для розробки прискорених метод в вегетативного розмноження цінних генотип в льону. Встановлена залежність регенераційної здатності пагонів з гіпокотильних сегментів від генотипу величини експланту; використання сегмент в довжиною 7-10мм дозволя отримувати найбільшу кількість регенерантів

The influence of genotype and size of a hypocotyl segment on callusing and regeneration processes was studied in flax plants in the *in vitro* culture for developing rapid methods of vegetative propagation of valuable flax genotypes. The relationship between regenerative ability of shoots from hypocotyls segments and explant genotype and size was established. Use of segments 7-10 mm in length allows production of the highest number of regenerants.

#### **ОСТАПОВЕЦЬ Л.І.**

*Институт розведення і генетики тварин УААН*

*Україна, 08321, Київська обл., Бориспільський р-н., с. Чубинське, вул. Погребняка, 1,*

*e-mail: ost\_lara@mail.univ.kiev.ua*

#### **ПАРТЕНОГЕНЕТИЧНЕ АКТИВУВАННЯ *IN VITRO* ЯЙЦЕКЛІТИН СВИНЕЙ**

Значні успіхи досягнуті за останні десятиліття в розробці та впровадженні нових біотехнологічних методів, які є великою потенційною базою для подальших досліджень з репродуктивної біотехнології тварин. До таких напрямків можна віднести клонування методом пересадки ядер, внутрішньоцитоплазматичне запліднення, що разом з трансгенними технологіями відкриває перспективи з використання нетрадиційних методів відтворення тварин. Реалізація цих підходів пов'язана з використанням методу штучного активування яйцеклітин *in vitro*.

Розробці методичних підходів вивчення процесу активування яйцеклітин сприяло відкриття О.О.Тихомировим у 1886 році явище штучного партеногенезу. В 40-х роках минулого сторіччя Б.Л.Астауров підтвердив можливість одержання партеногенетичних нащадків при застосуванні термічного активування яєць шовковичного шовкопряда на стадії метафази I та II мейозу. Застосування цього методу в наукових роботах із шовкопрядом сприяло вирішенню питань регуляції статі, одержання гомозиготних особин.

Перші спроби з партеногенетичного активування яйцеклітин ссавців зроблені Пінкусом в 30-х роках ХХ ст. З того часу метод штучного активування знайшов своє застосування не тільки для одержання *in vitro* партеногенонів ссавців. Визначення оптимальних умов активування ооцитів є необхідним для успішного проведення таких репродуктивних технологій, як інтрацитоплазматична ін'єкція сперматозоїду, клонування тварин методом пересадки ядер [4, 7]. Соматичне клонування у свиней здатне забезпечити як копіювання генетично високоцінних тварин, так і одержання трансгенних організмів з наступним використанням їх клітин, тканин та органів для ксенотрансплантації [3, 5, 8].

В останні десятиліття привертають увагу дослідження з формування *in vitro* партеногенетичних ембріонів ссавців. Через недостатньо вивчений механізм геномного імпринтингу проблемним є одержання повноцінних життєздатних партеногенетичних особин. Проте, дослідження ембріонального розвитку партеногенонів ссавців важливе для розкриття механізмів ініціації ембріогенезу, епігенетичного контролю функціонування геному, аналізу ролі певних генів у процесі розвитку, моделювання і коректування спадкових хвороб людини. Крім того, одержання партеногенетичних стовбурових клітин перспективне в плані вивчення механізмів реалізації генетичної інформації протягом процесу морфогенезу і клітинної диференціації, у вирішенні проблем трансплантації, зокрема розробці методу терапевтичного клонування [2, 10]. Великі перспективи відкриває використання партеногенонів при формуванні химерних тварин, вивченні їх участі у формуванні нового організму [9].

Розробка ефективного методу одержання *in vitro* ембріонів свиней має певні труднощі, порівняно із іншими видами сільськогосподарських тварин. Вони пов'язані з неповноцінністю цитоплазматичного дозрівання, високим рівнем поліспермного запліднення, редукції кількості клітин у бластоцисті та їх низькою життєздатністю після трансплантації реципієнтам [6]. Застосування методу партеногенетичного активування яйцеклітин свиней створює передумови до нейтралізації негативного впливу поліспермії. Це дозволить розробити підходи щодо визначення оптимальних критеріїв біологічної повноцінності незрілих ооцитів свиней, удосконалення системи дозрівання *in vitro* ооцитів та культивування ембріонів.

Узагальнення основних досягнень з партеногенетичного активування *in vitro* яйцеклітин ссавців свідчить про його перспективність для вирішення проблем біології розвитку, біотехнології, клітинної та молекулярної біології. До таких фундаментальних проблем відноситься: диференціація та морфогенез у період ембріонального розвитку, генетична регуляція розвитку, механізми канцерогенезу.

Наші дослідження були спрямовані на вивчення генетичних закономірностей партеногенетичного активування яйцеклітин свиней *in vitro*. Етапи цих досліджень включали розробку та вдосконалення методу дозрівання *in vitro* ооцитів свиней, їх

партеногенетичне активування та культивування одержаних партеногенетичних ембріонів до доімплантаційних стадій розвитку поза організмом.

### **Матеріал і методи**

Вилучення ооцит-кумулясних комплексів (ОКК) із яєчників забитих на бойні свиней великої білої породи проводили шляхом розрізання фолікулів у середовищі 199 з 25 мМ Нерес, яке містило 10% сироватки крові корів. Відібрані ООК для дозрівання переносили в середовище 199 на розчині Ерла, яке містило 20% еструсної сироватки корів і співкультивували протягом 44- 46 годин у присутності клітин гранульози ( $3-5 \times 10^6$  клітин/мл), при температурі  $+38,8^\circ\text{C}$ , 4%  $\text{CO}_2$  у повітрі. Активування до партеногенетичного розвитку здійснювали 7%-ним розчином етилового спирту протягом 7 хвилин. Активовані гамети переносили в середовище для подальшого культивування при температурі  $+38,8^\circ\text{C}$ , 4%  $\text{CO}_2$  у повітрі. За модифікованим нами методом Тарковського [11] готували сухоповітряні препарати гамет, забарвлювали 2%-ним розчином Гімза, проводили їх цитогенетичний аналіз під мікроскопом МБД-15.

### **Результати та обговорення**

Застосування нами морфологічної оцінки ооцитів за станом кумулюсу та ооплазми, проведення цитогенетичного аналізу ядерного хроматину таких гамет дозволило встановити, що ооцити оточені клітинами кумулюсу без ознак дегенерації та із однорідною ооплазмою є найбільш біологічно повноцінними для постановки на дозрівання в умовах *in vitro*.

Наступним етапом нашої роботи було визначення оптимального періоду дозрівання найбільшої кількості гамет до стадії метафази II і впливу часу активування яйцеклітин на рівень дроблення партеногенонів. Результати морфологічного аналізу ооцитів (за наявністю полярного тільця) та цитогенетичного аналізу препаратів таких яйцеклітин виявили, що враховуючи показник дегенерації хромосом, найбільш оптимальним часом дозрівання є 44-46 годин, порівняно із 48 год. дозрівання, де рівень дегенерації вірогідно був вищим і складав 41,7%. За результатами досліджень із партеногенетичного активування *in vitro* яйцеклітин свиней за вищенаведеними часовими параметрами встановлено, що активування яйцеклітин через 44 год. дозрівання дозволило одержати суттєво більшу кількість партеногенетичних ембріонів на 2-4-клітинних стадіях розвитку, порівняно із 48 год. культивування (45,7% проти 15,1%), що підтверджує негативний вплив високого рівня дегенерації хромосом на цей час на рівень формування партеногенетичних ембріонів. Проте слід відмітити, що «перезрівання» ооцитів корів має позитивний вплив як на рівень активування так і на рівень дроблення, тобто цей параметр є видоспецифічним [1].

З урахуванням оптимальних умов для партеногенетичного активування гамет і застосування 7%-ого розчину етанолу провели порівняльну характеристику середовищ для культивування ембріонів. Встановлено, що культивування у середовище NCSU-23 дозволяє одержати 69,9% партеногенетичних ембріонів, що на 44,1% більше порівняно із середовищем 199 ( $P < 0,001$ ) і на 34,6% - відносно середовища NCSU-37 ( $P < 0,05$ ). Крім того, культивування активованих гамет у середовищі NCSU-23 дозволило одержати 7,5% ембріонів, які подолали «блок дроблення» і розвивались до 16-клітинної стадії розвитку.

### **Висновки.**

Доведена ефективність використання етанолу для активування дозрілих *in vitro* ооцитів свиней до партеногенезу. Удосконалена система культивування *in vitro* партеногенетичних ембріонів забезпечує стабільне одержання партеногенонів свиней на доімплантаційних стадіях розвитку.

### **Література**

1. Кузнєцова І.Б., Кузнєцов В.Є., Лукашенко О.О. Активація ооцитів корів до партеногенетичного розвитку етанолом //Цитология и генетика. – 2000. – т. 34, №1. – С. 57–64

2. Cibelli J.B., Grant, K. A., Chapman, K. B., Cunniff, K., Worst, T., Green, H. L., Walker, S. J., Gutin, P. H., Vilner, L., Tabar, V., et al. Parthenogenetic stem cells in nonhuman primates // Science.- 2002. – vol. 295. – P. 819.
3. Lunney J.K. *Advances in Swine Biomedical Model Genomics* // Int. J. Biol. Sci. – 2007. – vol. 3, № 3. – P. 179–184.
4. Miyoshi K, Rzucidlo SJ, Pratt SL, Stice SL. Utility of rapidly matured oocytes as recipients for production of cloned embryos from somatic cells in the pig. Biol Reprod 2002. – vol. 67, №2. – P. 540–545.
5. Nagashima H., Fujimura T., Takahagi Y., Kurome M., Wako N., Ochiai T., Esaki R., Kano K., Saito S., Okabe M., Murakami H. Development of efficient strategies for the production of genetically modified pigs // Theriogenology. – 2003. – vol. 59, № 1. – P. 95–106.
6. Niemann H., Rath D. Progress in reproductive biotechnology in swine // Theriogenology. – 2001.— vol. 56, №8. – P. 1291–1304.
7. Onishi A, Iwamoto M, Akita T, Mikawa S, Takeda K, Awata T, Hanada H, Perry ACF: Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei // Science. – 2000. – vol. 289. - P. 1188–1190.
8. Prather R.S., Hawley R.J., Carter D.B., Lai L., Greenstein J.L. Transgenic swine for biomedicine and agriculture // Theriogenology. – 2003. – vol. 59, №1. – P. 115–123.
9. Sağırkaya H. Production of chimeric cattle embryos by reaggregation of blastomeres obtained from day 4 bovine embryos // Turk. J. Vet. Anim. Sci. – 2004. – vol. 28. – P.623–631
10. Surani M.A. Influence of genome imprinting on gene expression, phenotypic variations and development //Hum.Reprod. – 1991. – vol. 6, №1. – P.45–51.
11. Tarkowski A.K. An air-drying method for chromosome preparation from mouse eggs // Cytogenetics.— 1966. – vol. 5, №3. – P.394–400.

#### **Резюме**

Изложены результаты исследований вопроса получения партеногенетических эмбрионов свиней *in vitro*. Показана возможность партеногенетического развития созревших *in vitro* ооцитов свиней после обработки этанолом до 16-клеточной стадии.

The results of investigations of reception parthenogenetic pig embryos *in vitro* are given in account. The possibility of parthenogenetic development of *in vitro* matured porcine oocytes after treatment with ethanol to 16-cell stage embryos has been showed.

#### **ПИРАЛОВ Г.Р., АБРАИМОВА О.Е.**

*Институт зернового хозяйства УААН,*

*Украина, 49600, Днепрпетровск, ул. Дзержинского, 14, e-mail: inst\_zerna@mail.ru*

#### **КУЛЬТУРА ТКАНИ НЕКОТОРЫХ ГЕНОТИПОВ КУКУРУЗЫ ЗАРУБЕЖНОЙ СЕЛЕКЦИИ**

К настоящему времени в культуре ткани кукурузы исследованы многие её генотипы: линии, их стерильные аналоги, гибриды, мутанты и т. д. Установлено, что кукуруза в биотехнологических исследованиях является объектом сложным, что выражается в дифференциации и поляризации её генотипов в способности к каллусогенезу и регенерации. Поэтому одной из практических задач в этой области является поиск путей расширения круга отзывчивых генотипов кукурузы и усиления реакции низкоотзывчивых образцов, выявление и оптимизация всех факторов, влияющих на процессы выращивания растительного материала в культуре *in vitro*. В таком поиске определенный интерес приобретают генотипы кукурузы, обладающие диаметрально противоположной реакцией в культуре *in vitro*: как высокоотзывчивые,