

14. Штарк О.Ю., Данилова Т.Н., Наумкина Т.С. и др. // Экол. генет., 2006. Т.4, №2.— С. 22–28.
15. Василюк Г.В., Клебанович Н.В., Пехота А.П. Почвенные исследования и применение удобрений / Беларусь. Минск. 1995. Вып.23.— С. 92–100.
16. Джувеликян Х.А. Экология и человек. Воронеж. ВГУ, 1999.— 264 с.
17. Василюк Г.В., Богдевич И.М., Клебанович Н.В., Германович Т.М. Метод. реком. Института почвоведения и агрохимии НАН Беларуси. Минск. 2004.— 20 с.
18. Altschul S. F., Gish W., Miller W. [et al.] // J. mol. biol. 1990. 215: 403–410.
19. Карасев С.Г. Актинобактерии из многолетнемерзлых отложений Сибири. Автореферат диссертации на соискание ученой степени к.б.н. Пушино. 2007.
20. Никашина А.А., и др. // Известия СНЦ РАН. 2009. Т.11, №1(6).— С. 1355–1358.
21. Filippi C., Bagnoli G., Citernes A.S., Giovannetti M. // Symbiosis. 1998. 24: 1–12.
22. Tokala R.K., Strap J.L., Jung C.M. et al. // Appl. Environ. Microbiol. 2002. 68: 2161–2171.
23. Markmann K., Giczey G., Parniske M. // PLoS Biology, 2008. 6(3): 68.

### Резюме

Показана возможность создания многокомпонентных микробных препаратов на основе отходов сахарного производства (фильтрационно-моющих осадков, ФМО) для адаптивного сельского хозяйства. Установлено, что отвалы ФМО с различных сахарных заводов в 10-ти годам складирования также имеют высокие показатели по содержанию собственной полезной почвенной микрофлоры.

Possibility of production of multi-component microbial bio-preparations for sustainable agriculture on the base of filtration washing pellet (FWP) of sugar industry was demonstrated. The 10-years dumps of FWP from different sugar factories have also been shown to contain high amounts of diverse own beneficial soil microbes.

**БЛИНСЬКА О.В.<sup>1</sup>, ТИМЧУК С.М.<sup>1</sup>, ДУЛЬНЄВ П.Г.<sup>2</sup>, ДЕРЕБІЗОВА О.Ю.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Інститут рослинництва ім. В. Я. Юр'єва Української академії аграрних наук  
Україна, 61060, Харків, проспект Московський, 142, e-mail: bilinska@ukr.net

<sup>2</sup>Науково-інженерний центр "АКСО" Інституту біоорганічної хімії і нафтохімії  
Національної академії наук України 02160, Київ, Харківське шосе, 50,  
e-mail: selit@ua.fm

## **ОЦІНКА МОРФОГЕНЕТИЧНОГО ЕФЕКТУ ПРИРОДНИХ І ХІМІЧНО МОДИФІКОВАНИХ КРОХМАЛІВ У СКЛАДІ СЕРЕДОВИЩ ДЛЯ ОТРИМАННЯ ГАПЛОЇДІВ ЯРОГО ЯЧМЕНЮ МЕТОДОМ КУЛЬТУРИ ПИЛЯКІВ *IN VITRO***

Удосконалення складу штучних живильних середовищ для культивування *in vitro* рослинних клітин, тканин та органів насамперед полягає у встановленні дослідним шляхом оптимальних концентрацій стимуляторів росту і інших фізіологічно активних речовин як компонентів з найбільшим

морфогенетичним ефектом. Рідше об'єктом спеціальних досліджень є композиція солей макро- і мікроелементів, вуглеводів з трофічною функцією, гелеутворювачів тощо.

Разом з тим, відомо, що від хімічної природи та структурно-механічних властивостей гелевої основи твердого середовища може значною мірою залежати повнота реалізації програми морфогенезу *in vitro* і життєздатність отриманих рослин-регенерантів [1]. З огляду на це було запропоновано заміну агар-агару — найбільш розповсюдженого гелеутворювача — на ряд речовин різної хімічної будови, серед яких чільне місце посіли природні та хімічно модифіковані крохмалі [2, 3].

Зокрема, встановлено позитивний ефект на регенерацію рослин у культурі пиляків *in vitro* ярого ячменю хімічно модифікованих крохмалів ДККмод і Д-2 [4, 5].

У зв'язку із значним генетичним різноманіттям кукурудзи за генами структури ендосперму, які детермінують співвідношення у крохмалі його сополімерів амілози і амілопектину [6], певні перспективи має використання крохмалів різних типів як гелеутворювачів штучних живильних середовищ.

Мета досліджень полягала у вивчення можливості заміни агар-агару у штучному живильному середовищі для культивування *in vitro* пиляків ярого ячменю на нові препарати хімічно модифікованих крохмалів і природні крохмалі з зерна ліній кукурудзи, які різняться за алейним станом генів структури ендосперму.

#### **Матеріали та методи**

Дослідження проведено за використання в якості модельних генотипів сортів ярого ячменю (*Hordeum vulgare* L.) Екзотик, Фенікс та лінії андрогеноного походження ДГ00-126, які характеризувалися контрастною здатністю до андрогенезу *in vitro*.

Вирощування рослин-донорів пиляків, добір колосся, попередню обробку і отримання асептичної культури пиляків здійснювали за власними методичними розробками [7, 8]. Склад базового індукційного середовища, яке слугувало контролем, і середовищ для отримання рослин-регенерантів опубліковано раніше [8]. Ці середовища містили 0,76% агар-агару "Difco" (США).

У дослідних варіантах індукційного середовища агар-агар було замінено на природні кукурудзяні крохмалі, виділені з зерна ліній Ae 392, Ac-11, ВК-69, які є відповідно носіями мутантних генів структури ендосперму  $ae$ ,  $su_2$  і  $wx$ , та хімічно модифіковані крохмалі Д-2, Д-5а, Д-5в і Д-4г, отримані у Науково-інженерному центрі "АКСО" Інституту біоорганічної хімії та нафтохімії НАНУ. Ефективність експериментального андрогенезу *in vitro* оцінювали за кількістю морфогенних пиляків і зелених рослин-регенерантів у відсотках від загального числа культивованих пиляків.

#### **Результати і обговорення**

Дослідження гелеутворюючих властивостей крохмалів, отриманих із зерна ліній кукурудзи, які є носіями мутантних генів структури ендосперму  $ae$ ,  $su_2$  і  $wx$ , та крохмалю нормального типу, показали, що придатними для

використання в якості заміниа агар-агару у складі штучних живильних середовищ є високоамілозні крохмалі ае та  $su_2$ , які значно перевищили крохмаль wx-типу з підвищеним вмістом амілопектину і крохмаль звичайної кукурудзи за якістю гелю. Препарати хімічно модифікованих крохмалів Д-5а, Д-5в і Д-4г утворили гелі, які за своїми структурно-механічними властивостями були тотожними раніше дослідженим препаратам ДККмод і Д-2 [4, 5]. Оптимальною концентрацією для природних крохмалів є 6,0–6,5%, для хімічно модифікованих — 12,0%.

У експерименті з вивчення впливу крохмалів на ефективність перебігу процесів індукції андрогенних структур і регенерації рослин було встановлено переваги високоамілозних крохмалів і нових препаратів хімічно модифікованих крохмалів у порівнянні з агар-агаром. Як видно з рис. 1, на середовищах, які містили замість агар-агару крохмалі типу ае і  $su_2$ , у всіх генотипів кількість морфогенних пиляків і зелених рослин-регенерантів була істотно вищою порівняно з контролем (агар-агар) і середовищем з хімічно модифікованим крохмалем Д-2

При цьому кукурудзяні крохмалі, виділені з зерна ліній-носіїв мутантних генів структури ендосперму, на відміну від хімічно модифікованого крохмалу не чинили негативного впливу на утворення калюсу та ембріоїдів і динаміку їх росту. Серед андрогенних структур переважали ембріоїди, які формувалися шляхом прямого ембріодогенезу або на поверхні ембріогенного калюсу. Слід зазначити, що мала місце однакова динаміка формування андрогенних структур і рослин-регенерантів на середовищі з агар-агаром і кукурудзяними крохмалями, у тому числі проростання ембріоїдів на індукційному середовищі.

На особливу увагу заслуговують показники гаплопродукції, отримані на середовищах з крохмалем у сорту Фенікс, якому притаманна низька здатність до андрогенезу *in vitro*. Так, на середовищі з крохмалем ае кількість ембріогенних пиляків зросла у цього генотипу до 21,64%, а на середовищі

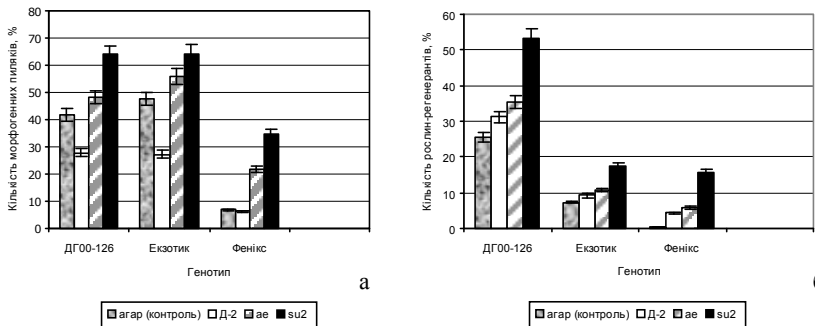


Рис. 1. Індукція морфогенних структур (а) і регенерація зелених рослин (б) у культурі пиляків *in vitro* ярого ячменю в залежності від гелетворюючого компонента штучного живильного середовища

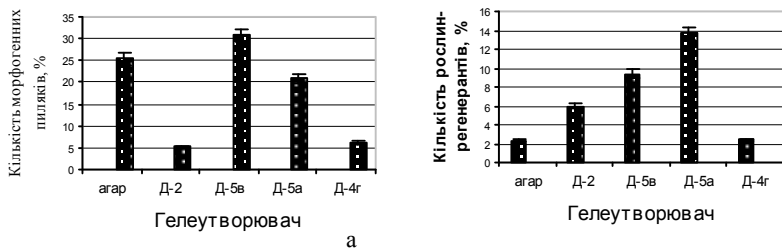


Рис. 2. Індукція морфогенних структур (а) і регенерація зелених рослин (б) у культурі піляків *in vitro* лінії ярого ячменю ДГ00-126 в залежності від гелеутворюючого компонента штучного живильного середовища

з крохмалем іншої мутантної форми — до 34,95%, в той час як у контролі (середовище з агар-агаром) цей показник був на рівні 7,00%. Істотне зростання відмічене і щодо частоти регенерації зелених рослин. Зокрема, за рахунок заміни агар-агару на крохмаль типу  $su_2$  було досягнуто збільшення частоти зелених рослин з 0,56 до 15,80%.

Кращі за результатами тестування гелеутворюючих властивостей крохмалі Д-5а, Д-5в і Д-4г було залучено до експерименту з оцінки їхнього морфогенетичного ефекту у культурі піляків *in vitro* ярого ячменю. Як контроль було використано середовище NMS мод. 1, яке містило 9,0% сахарози і 0,76% агар-агару. Порівняння ефективності нових гелеутворювачів проводилося також з дослідженим раніше модифікованим крохмалем Д-2.

Як свідчать дані, наведені на рис. 2, досліджувані препарати по-різному впливали на процеси індукції морфогенних структур і регенерації рослин. Зокрема, підтвердився встановлений раніше ефект зниження інтенсивності утворення морфогенних структур на середовищі, яке містить модифікований крохмаль Д-2. Але переважання серед новоутворень ембріодів, дозволило на цьому середовищі отримати істотно вищий, ніж у контролі вихід зелених рослин-регенерантів.

На відміну від Д-2, крохмалі Д-5а і Д-5в не чинили негативного впливу на початкові етапи морфогенезу *in vitro*. Більш того, на останньому середовищі було одержано значно вищий вихід піляків з морфогенними структурами, ніж на агаровому середовищі. Застосування заміників агар-агару Д-5а і Д-5в сприяло зростанню регенерації зелених рослин.

Невисокий вихід андрогенних структур і зелених рослин-регенерантів у контрольному варіанті та досліді в цілому, безумовно, пов'язаний з тим, що в якості трофічного фактора замість мальтози, яка має досить високу вартість, було використано сахарозу. Разом з тим, зважаючи на відносно високий рівень індукції андрогенних структур і регенерації в окремих варіантах крохмалевмісних середовищ, можна зробити висновок щодо зменшення негативного впливу сахарози на перебіг процесів морфогенезу у культурі піляків *in vitro* ярого ячменю за її введення до складу живильного середовища з крохмалями-гелеутворювачами, імовірно, за рахунок додаткових

трофічних факторів, джерелом яких є гідроліз крохмалів і поліпшення осмотичних властивостей середовища.

### **Висновки**

Вперше встановлено позитивний ефект хімічно модифікованих крохмалів Д-5а та Д-5в на процеси індукції андрогенних структур і регенерації рослин у культурі пиляків *in vitro* ярого ячменю. За використання високоамілозних крохмалів типу ае і  $su_2$  досягнуто істотного зростання показників гаплопродукції у генотипів з контрастною андрогенною здатністю, що дозволяє рекомендувати використання цих препаратів для отримання гаплоїдів у культурі пиляків *in vitro*.

### **Література**

1. Kohlenbach H.W., Wernike W. Investigation on the inhibitory effect of agar and the function of active carbon in anther culture // Ztsch. Pflanzenphysiol.— 1978.— V.86, N5.— P. 463–472.

2. Sorvari S. The effect of starch gelatinized nutrient media in barley anther culture // Annals Agr. Finnie.— 1986a.— V.25.— P. 127–133.

3. Деклараційний патент на винахід 52031 Україна, МПК 7, C08B31/02, A01N57/00, A01N59/00, A01C1/06. Спосіб отримання полімерних матеріалів / П.Г. Дульнев, С.І. Кондратенко, Т.В. Чернишенко, В.П. Мірошниченко, Т.В. Івченко, С.А. Гончарова; заявник і патентовласник Інститут біорганічної хімії і нафтохімії НАНУ.— u2002010237; заявл. 09.0.2002.— Опубл.17.01.2005.12.02, Бюл. №12.

4. Белинская Е.В., Дульнев П.Г. Модифицированный крахмал как компонент питательной среды для получения гаплоидов ячменя в культуре пыльников *in vitro* // Физиология и биохимия культурных растений.— 2007.— Т.39, №2.— С. 136–143.

5. Білинська О.В., Дульнев П.Г. Використання модифікованого крохмалю як гелеутворюючого компоненту штучних живильних середовищ для індукції новоутворень і регенерації рослин у культурі пиляків *in vitro* ярого ячменю // Вісник Харківського національного аграрного університету .Серія Біологія.— 2008.— Вип.2(14).— С. 83–89.

6. Coe E., Polacco M. Maize gene list and working maps // Maize Genet. Newslett.— 1994.— V.68.— P. 156–191.

7. Білинська О.В. Генотипові особливості індукції гаплоїдів ячменю (*H. vulgare* L.) методом культури пиляків *in vitro*: Автореферат дис. ... канд. біол. наук.— Харків: 1997.— 19 с.

8. Білинська О.В., Весна С.В., Манзюк В.Т. Застосування культури пиляків *in vitro* для створення вихідного матеріалу в селекції голозерного ячменю // Селекція і насінництво.— 2002.— Вип.86.— С. 164–172.

### **Резюме**

Досліджено гелеутворюючі властивості та морфогенетичний ефект у культурі *in vitro* пиляків ярого ячменю природних і хімічно модифікованих крохмалів. Встановлено позитивний вплив кукурудзяних крохмалів з підвищеним вмістом амілози, отриманих з зерна ліній-носіїв мутантних генів структури ендосперму ае і  $su_2$ , на процеси індукції калусу, ембріодів і регенерації рослин. Дібрано перспективні для подальших досліджень препарати хімічно модифікованих крохмалів Д-5а і Д-5в.

Изучены гелеобразующие свойства и морфогенетический эффект в культуре *in vitro* пыльников ярового ячменя природных и химически модифицированных

крахмалов. Установлено положительное влияние кукурузных крахмалов с повышенным содержанием амилозы, выделенных из зерна линий-носителей мутантных генов структуры эндосперма *ae 1 su<sub>2</sub>*, на процессы индукции каллуса, эмбриоидов и регенерации растений. Отобраны перспективные для дальнейших исследований препараты химически модифицированных крахмалов Д-5а і Д-5в.

Gelling capacity and morphogenetic effect in spring barley anther culture *in vitro* of natural and chemically modified starches was investigated. Positive influence of corn starches with high amilose content, obtained from seeds of corn lines, which were the carriers of natural mutations of endosperm structure genes *ae* and *su<sub>2</sub>*, on the embryogenesis and green plant regeneration was revealed. Perspective for further investigations preparations of chemically modified starches D-5a and D-5b were selected.

**ВАГИНА И.Н., АНОПРИЕНКО О.В., ЗАХАРУК Е.А., СТРОКОВСКАЯ Л.И.**

*Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины  
Украина; 03143 Киев, ул. Заболотного, 150; e-mail: ira\_vag@ukr.net*

### **ПЕРЕНОС ГЕНА $\beta$ -ИНТЕРФЕРОНА В КЛЕТКИ МЛЕКОПИТАЮЩИХ РЕКОМБИНАНТНЫМ БАКУЛОВИРУСНЫМ ВЕКТОРОМ**

Интерферон  $\beta$  (IFN- $\beta$ ) является одним из членов семейства полипотентных цитокинов — интерферонов, играющих важную роль в системе врожденного иммунитета. Интерфероны подавляют репликацию и распространение вирусных, бактериальных и паразитарных патогенов, модулируют иммунный ответ и оказывают антипролиферативное воздействие на некоторые типы клеток. В клинике интерфероны используют для лечения ряда вирусных инфекций, аутоиммунных заболеваний — рассеянного склероза и ревматоидного артрита, а также в противоопухолевой терапии. IFN- $\beta$  усиливает апоптоз опухолевых клеток, осуществляет торможение ангиогенеза в опухолевых тканях, снижает частоту метастазирования [1]. При этом более чувствительными к IFN- $\beta$  (по сравнению с IFN- $\alpha$ ) являются клетки простаты, меланомы и некоторых других типов опухолей [2]. Однако, результаты многочисленных испытаний IFN- $\beta$  в клинической практике показали, что он проявляет незначительную активность против опухолей человека, вероятно, вследствие невозможности достижения высокой концентрации интерферона в сыворотке крови пациентов из-за его токсичности, а также достаточно короткого периода “жизни” в организме [3].

Обеспечить высокую локальную продукцию цитокина можно с помощью стратегии, сочетающей клеточную и генную терапию — системы “клеточных векторов”. Предполагается, что такая система должна состоять из трех компонентов — модифицируемых *ex vivo* клеток, характеризующихся определенным тропизмом к месту терапии, рекомбинантного вектора и собственно гена, кодирующего терапевтический агент [3].