PAPUGA A.YE., SAMCHENKO YU.M., ULBERG Z.R., RUBAN T.A., KOZINETS G.P., LUKASH L.L.
[1] *Institute of Molecular Biology and Genetics of Natl. Acad. Sci. of Ukraine,*
Ukraine, 03680, Kyiv, Akad. Zabolotnogo str., 150, e-mail: alexander.papuga@gmail.com.
[2] *F.D. Ovcharenko Institute of Biocolloids Chemistry of Natl. Acad. Sci. of Ukraine,*
Ukraine, 03142, Kyiv, Acad. Vernadsky boulevard, 42
[3] *Centre of thermal injuries and plastic surgery in Kiev City Clinical Hospital № 2,*
Ukraine, 02094, Kyiv, Cracow str., 13

THE ARTIFICAL SKIN EQUIVALENT BASED ON ACRYLIC HYDROGEL WITH IMMOBILIZED SILVER NANOPARTICLES AND HUMAN CELLS

Aims. The purpose of this work was to create new and improved dermal equivalents which could be used for therapy of massive burns. ***Methods***. As the scaffolds we used polyacrylamide hydrogels. Additional components (nanoparticles or metal ions) were added into the hydrogels. Biocompatibility of obtained specimens and their influence on cell survival was investigated by using microscopic examinations and cytochemical staining. As a cell component of the dermal equivalents we used: 1) original cell line 4BL; 2) primary human skin fibroblasts. ***Results***. I was obtained maximum stimulation of cell proliferation at the presence in scaffold of colloid silver at the concentration of 25 ug/g dry weight. ***Conclusions***. A positive effect of silver nanoparticles in the composition of hydrogels on cell survival and proliferation was demonstrated.
Key words: scaffold, dermal equivalents, human cells, hydrogel, burn.

УДК 575.127
РАТУШНЯК Я.І., ДУПЛІЙ В.П.
Інститут клітинної біології і генетичної інженерії НАН України,
Україна, 03680, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 148, e-mail: yakivr@yahoo.com

ДЕЯКІ ОСОБЛИВОСТІ РИЗОГЕНЕЗУ *LYCOPERSICON ESCULENTUM* MILL., *LYCOPERSICON PERUVIANUM* VAR. *DENTATUM* DUN. ТА ЇХ ЦИБРИДІВ

Ризогенез як процес коренеутворення *in vitro* відбувається в два етапи. Спочатку на експлантах формуються ризоїдні горбики, а потім з них розвиваються корені. Цей процес можна індукувати практично для кожного органу, тканини чи калюсу за допомогою додавання ауксинів. Спонтанний ризогенез є більш вибірковим щодо типу експланта і, як правило, можливий лише для тих органів рослин, які здатні укорінюватися *in vivo*. Це стосується в першу чергу стеблових пагонів, що можуть укорінюватись без присутності відповідних фітогормонів. Проблемі ризогенезу *in vitro* як одному з видів морфогенезу вищих рослин присвячено чимало досліджень, проте вона залишається актуальною до останнього часу. Особливо це стосується декоративних та лікарських рослин, які є комерційно привабливими для розробки технологій їх мікроклонального розмноження [1–3]. Ще більш гостро стоїть питання щодо створення ефективних протоколів укорінення деревних видів рослин, зокрема лісових, плодово-ягідних та горіхових культур, що мають значну господарську та харчову цінність [4–7].

Генетичний контроль ризогенезу здійснюється чималою кількістю ядерних генів. Останнім часом ідентифіковано більше 10 генів, які кодують протеїни відповідальні за певні етапи розвитку кореневої системи, зокрема за ініціацію та ріст у довжину головного, бокових коренів чи кореневих волосків або ж, навпаки, за їх редукцію [8]. Один з таких протеїнів, що індукує елонгацію корончатих та бокових коренів *Oryza sativa*, має постійну мітохондріальну локалізацію [9]. Зважаючи на цивілізаційне прагнення людства до перманентного збільшення продуктивності агрономічно важливих видів рослин, зокрема зернових культур, інтерес до системного генетичного аналізу ознак, пов'язаних з розвитком їх кореневої системи, буде лише зростати [10].

У даній роботі ми вивчали особливості індукованого та спонтанного ризогенезу *Lycopersicon esculentum, L. peruvianum* var.

dentatum і їх цибридів із реципрокною пластом-геномною організацією та зі зворотно перенесеними хлоропластами в залежності від віку і порядку ізольованих пагонів. Враховували відсоток укорінення на 6-й та 12-й день культивування пагонів, середньою добою укорінення і здатністю до поодинокого та множинного ризогенезу.

Матеріали і методи

Рослинний матеріал. 1. Перуанський томат *Lycopersicon peruvianum* var. *dentatum* Dun. лінії 3767. 2. Культурний томат *L. esculentum* Mill. сортів Quedlinburger Frьhe Liebe (QFL) і Frьhe Liebe (FL). 3. Цитоплазматичний гібрид культурного томата *L.* e*sculentum* (+ *L. peruvianum* var. *dentatum*) клону 1C, який володіє ядром *L. esculentum* Mill. сорту Frьhe Liebe, пластидами *L. peruvianum* var. *dentatum* лінії 3767 та гібридними мітохондріями. Цибридним рослинам притаманні морфологія культурного томата, а також ряд аномальних фенотипічних ознак плазмон-геномної несумісності [11]. 4. Цибрид перуанського томата *L. peruvianum* var. *dentatum* (+ *L. esculentum*) клону B1A, який володіє ядром *L. peruvianum* var. *dentatum* лінії 3767, пластидами *L. esculentum* сорту Quedlinburger Frьhe Liebe та гібридними мітохондріями. Цибридним рослинам притаманні морфологія перуанського томата без будь-яких фенотипічних ознак плазмон-геномної несумісності [12]. 5. Цибриди перуанського томата *L. peruvianum* var. *dentatum* (+ *L. esculentum* (+ *L. peruvianum* var. *dentatum*)) клонів K1C, K1S, L5O і L1H, який володіють ядром і пластидами *L. peruvianum* var. *dentatum* лінії 3767 (природа мітохондрій невідома) [13]. Цибридним рослинам притаманна морфологія перуанського томата з деякими новими індивідуальними або універсальними ознаками, які можуть свідчити про хондріом-геномну несумісність.

Вирощування асептичних рослин. Стерилізацію насіння і розмноження асептичних рослин проводили згідно Ratushnyak et al. [14]. Рослини всіх 9 генотипів вирощували на середовищі MC/2 [15] (Duchefa, the Natherlands), яке містило в двічі зменшену концентрацію вітамінів, мікро- і макросолей, 20 г/л сахарози та 7 г/л агару (pH 5,7).

Укорінення пагонів. Пагони 1-, 2- і 3-го порядку асептичних рослин 20-, 30- і 40-денного віку використовували для експериментів по індукованому та спонтанному ризогенезу. В кожному експерименті, який повторювали тричі, використовували по 8 пагонів (наприклад, 8 пагонів цибриду B1A 1-го порядку 20-денного віку для спонтанного укорінення). Для спонтанного ризогенезу використовували середовище MC/2 без фітогормонів, тоді як для індукованого ризогенезу додавали 0,15 мг/л 1-нафтилоцтової кислоти. В усіх експериментах дотримувались таких критеріїв індентичності: умов вирощування (фотоперіод, освітлення, температура); розміру посуду (200 мл); об'єму поживного середовища MC/2 (20 мл); розміру пагонів; часу посадки пагонів на укорінення та фіксації утворення корінців. Кожний пагін оцінювали на здатність до поодинокого чи множинного укорінення (регенерація 1–2 чи 3 і більше корінців, відповідно).

Статистичний аналіз. Дані приводили до нормального розподілу за допомогою функції арксинуса. Для перевірки розподілів на нормальність тестом Шапіро-Уілка [16], багатофакторного дисперсійного аналізу [17] та побудови діаграм використовувався інтерпретатор мови програмування R [18] версії 3.0.2.

Результати та обговорення

В експериментах використовували рослини 20-, 30- і 40-денного віку та пагони 1-, 2- і 3-го порядку. Головним обмежуючим фактором по встановленню саме таких кількісних критеріїв по віку і порядку пагонів були рослини сортів культурного томата та цибриду *L. esculentum* (+ *L. peruvianum* var. *dentatum*), оскільки *in vitro* вони є низькорослими, особливо цибрид. Тому ці генотипи мали дуже короткі міжвузля, а це робило вкрай скрутною ізоляцію пагонів вже навіть 3-го порядку. З іншого боку, у 1,5-місячних рослин жовтіли і опадали листки, а це робило неможливим отримувати однотипні пагони 50-денного віку. Одночасно в кожну з трьох 0,2 л банок з 20 мл середовища MC/2 висаджували по 8 пагонів одної вікової категорії відповідно 1-го, 2-го і 3-го порядку. Враховуючи наявність 9 генотипів, три вікових категорії пагонів та їх тестування за відсутно-сті/присутності 1-нафтилоцтової кислоти, ми поставили 486 незалежних експериментів, в яких висадили 3888 пагонів. Таким чином, нам вдалося заповнити усі клітинки по зазначеним генотипам в 6 таблицях з дослідження тривалості як індукованого, так і спонтанного ризигенезу (по 3 таблиці, відповідно).

Корінці, що досягали розміру 1–2 мм, регенерували в нічний час. 77 пагонів (2,1 %) взагалі не були здатними укорінюватись, причому найбільша кількість таких пагонів

зафіксована при дослідженні спонтанного ризогенезу (70). Множинна регенерація корінців при індукованому ризогенезі зустрічалась в 1,8–4 рази частіше, ніж поодинока, тоді як при спонтанному ризогенезі спостерігається зворотна тенденція: за 2 винятками поодиноке утворення корінців переважає множинне в 1,7–4 рази. Тривалість регенерації корінців при індукованому ризогенезі в основному становила 6-9 днів, тоді як при спонтанному ризогенезі часто перевищувала 10 і навіть 20 днів.

Методом дисперсійного аналізу підтверджено вплив всіх чотирьох факторів (генотип, порядок пагона, вік рослини та наявність/відсутність НОК) на відсоток укорінення на 6-ту добу щонайменше на рівні $p < 0,05$. На 12-ту добу вік рослин уже не мав значення. Слід відмітити також взаємодію факторів. Так на 6-й день статистично незначним можна визнати тільки комбінацію віку рослини та порядку пагона, а на 12-й до неї додається ще й вік рослини та генотип. Спільний вплив генотипу, порядку та вікової категорії пагона на коренеутворення відзначався, як на 6-й, так і на 12-й день. Також на 6-ту добу до спільного впливу трьох зазначених факторів додається ще й тип ризогенезу.

Як видно з діаграм за відсотком укорінення на 6-й і 12-й день культивування пагонів достовірна різниця спостерігається між усіма генотипами, типом ризогенезу, віком та порядком пагонів (рис. 1 і 2). Подібна залежність по частоті укорінення спостерігається для цих генотипів і по середній добі укорінення. В цій роботі наводяться лише перші результати із отриманого масиву даних, обробка яких ще триває.

Висновки

За здатністю до укорінення підтверджена відмінність двох споріднених генотипів (сортів QFL і FL) культурного томата та незалежне походження 4 клонів цибридів перуанського томата зі зворотно перенесеним пластомом. Низька здатність до укорінення цибриду культурного томата клону 1С є ще одним підтвердженням несумісності пластому *L. peruvianum* var. *dentatum* і ядерного геному *L. esculentum*. Для цибриду перуанського томата клону B1A показана як позитивна, так і негативна кореляція по швидкості укорінення в порівнянні з вихідним батьківським видом *L. peruvianum* var. *dentatum*, що може свідчити про контроль ризогенезу не тільки ядерним геномом, а й плазмоном. Реципрокні цибриди культурного та перуанського томатів та цибриди перуанського томата зі зворотно перенесеним пластомом можуть служити не тільки чудовою генетичною моделлю для вивчення плазмон-геномних взаємодій загалом, і несумісностей зокрема, що викликають появу нових якісних ознак, а й зручним інструментом для вивчення природи морфогенетичних процесів (тотипотентності) вищих рослин за кількісними ознаками.

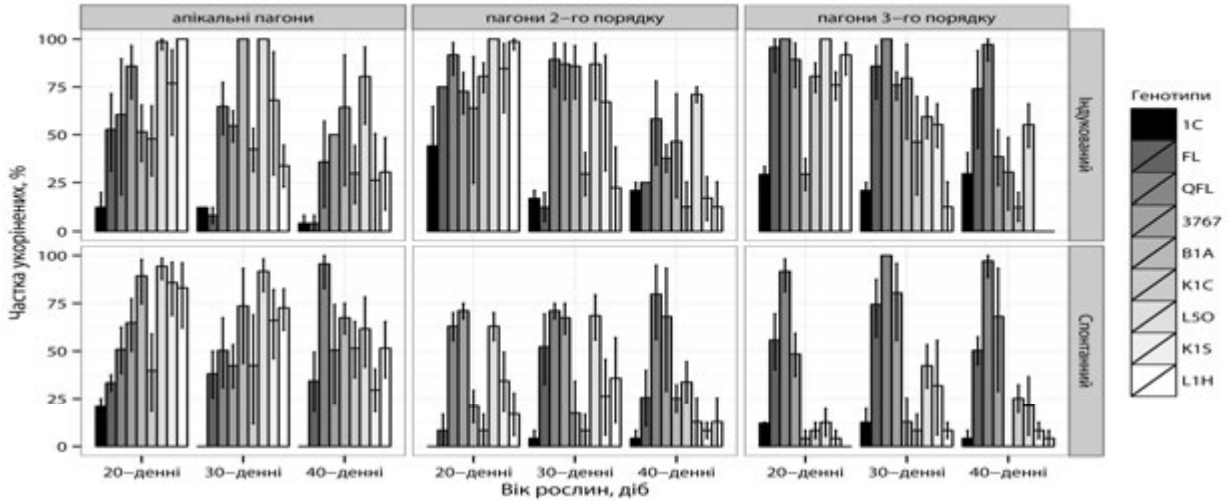

Рис. 1. Ефективність укорінення на 6-й день культивування пагонів *Lycopersicon esculentum* (сорти QFL і FL), *L. peruvianum* var. *dentatum* (лінія 3767), реципрокних цибридів культурного та перуанського томатів (клонів 1С і B1A, відповідно) та цибридів перуанського томата зі зворотно перенесеними хлоропластами (клони K1C, L5O, K1S і L1H), що відрізнялись за віком, порядком та типом ризогенезу

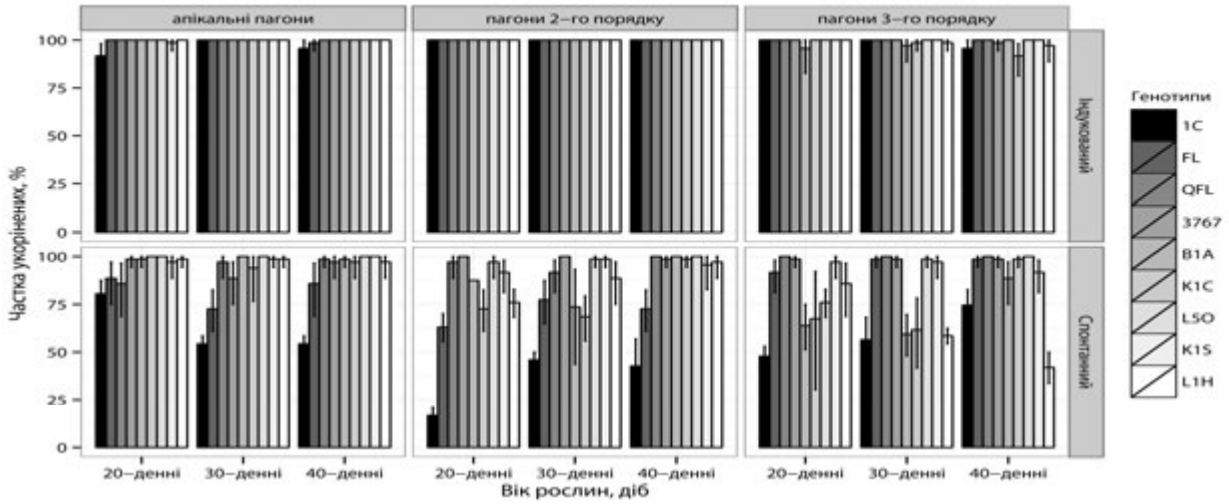

Рис. 2. Ефективність укорінення на 12-й день культивування пагонів *Lycopersicon esculentum* (сорти QFL і FL), *L. peruvianum* var. *dentatum* (лінія 3767), реципрокних цибридів культурного та перуанського томатів (клонів 1C і B1A, відповідно) та цибридів перуанського томата зі зворотно перенесеними хлоропластами (клони K1C, L5O, K1S і L1H), що відрізнялись за віком, порядком та типом ризогенезу

Література

1. Marks T.R, Simpson S.E. Rhizogenesis in *Forsythia × intermedia* and *Syringa vulgaris*; application of a simple internode experimental system // Plant Cell Rep. – 2000 – 19, N 12. – P. 1171–1176.
2. Caroline V.J.E.; Mallaiah B. High frequency *in vitro* rhizogenesis in *Bryonopsis laciniosa* (L.) Naud. a highly valuable medicinal cucurbit // International J. Pharma Bio Sci. – 2011. – 2, N 1. – pB 216.
3. Zaker A., Abrishamchi P., Asili J., Hadi Mousavi S., Rezaee A. Induction of callogenesis and rhizogenesis in *Perovskia abrotanoides* Karel. a little known medicinal plant // J. Medicinal Plants Res. – 2013 – 7, N 46. – P. 3385–3392.
4. Akram M., Aftab F. *In vitro* micropropagation and rhizogenesis of teak (*Tectona grandis* L.). // Pak. J. Biochem. Mol. Biol. – 2007. – 40, N 3. – P. 125–128.
5. Gueye B., Sanɑd-Ahmed H., Morcillo F., Borgel A., Sanй D., Hilbert J.L., Verdeil J.L., Blervacq A.S. Callogenesis and rhizogenesis in date palm leaf segments: are there similarities between the two auxin-induced pathways? // Plant Cell Tissue Organ Cult. – 2009. – 98, N 1. – P. 47–58.
6. Santelices R., Palfner G. Controlled rhizogenesis and mycorrhization of hazelnut (*Corylus avellana* L.) cuttings with black truffle (*Tuber melanosporum* Vitt.) // Chil. J. Agricult. Res. – 2010. – 70, N 2. – P. 204–212.
7. Millбn-Orozco L., Corredoira E., del Carmen San Josй M. In vitro rhizogenesis: histoanatomy of *Cedrela odorata* (Meliaceae) microcuttings // Rev. Biol. Trop. – 2011. – 59, N 1. – P. 447–453.
8. Marcon C., Paschold A., Hochholdinger F. Genetic Control of Root Organogenesis in Cereals. Ive De Smet (ed.), Plant Organogenesis: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology. – N.Y.: Springer, 2013. – 959. – P. 69–81.
9. Jia L., Wu Z., Hao X., Carrie C., Zheng L., Whelan J., Wu Y., Wang S., Wu P., Mao C. Identification of a novel mitochondrial protein, short postembryonic roots 1 (SPR1), involved in root development and iron homeostasis in *Oryza sativa* // New Phytol. – 2011. – 189, N 3. – P. 843–855.
10. Hochholdinger F., Park W.J., Sauer M., Woll K. From weeds to crops: genetic analysis of root development in cereals. Trends Plant Sci. – 2004 – 9, N1. – P. 42–48.
11. Ратушняк Я.И., Кочевенко А.С., Череп Н.Н., Завгородняя А.В., Латыпов А.С., Глеба Ю.Ю. Аллоплазматическая несовместимость у цибридных растений, обладающих геномом *Lycopersicon esculentum* Mill. и плазмагенами *Lycopersicon peruvianum* var. *dentatum* Dun. // Генетика. – 1995. – 31, № 5. – С. 660–667.
12. Kochevenko A., Ratushnyak Y., Kornyeyev D., Stasik O., Porublyova L., Kochubey S., Suprunova T., Gleba Y. Functional cybrid plants of *Lycopersicon peruvianum* var *'dentatum'* with chloroplasts of *Lycopersicon esculentum* // Plant Cell Rep. – 2000. – 19, N 6. – P. 588–597.
13. Кочевенко А.С., Кучук Н.В., Ратушняк Я.И. Обратный перенос хлоропластов как доказательство пластом-геномной несовместимости цибридных растений томата *Lycopersicon esculentum* (+ *L. peruvianum* var. *dentatum*) // Вісник УТГіС. – 2009. – 7, № 1. – С. 46–57.

14. Ratushnyak Y.I., Latypov S.A., Samoylov A.M., Piven N.M., Gleba Y.Y. Introgressive hybridization of tomatoes by ‘gamma-fusion’ of *Lycopersicon esculentum* Mill. and *Lycopersicon peruvianum* var. *dentatum* Dun. Protoplasts // Plant Sci. – 1991. – 73, N 1. – P. 65–78.
15. Murashige T., Skoog F.A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // Physiol. Plant. – 1962. – 15, N 3. – P. 473–497.
16. Shapiro S.S.; Wilk, M.B. An analysis of variance test for normality (complete samples) // Biometrika. – 1965 – 52, N 3–4. – P. 591–611.
17. Fisher R.A. The correlation between relatives on the supposition of Mendelian inheritance // Philosophical Transactions Royal Society Edinburgh. – 1918. – 52. – P. 399–433.
18. Ihaka R., Gentleman R.R: A language for data analysis and graphics // J. Computational Graphical Statistics. – 1996 – 5. – P. 299–314.

RATUSHNYAK Y.I., DUPLIJ V.P.
Institute of Cell Biology and Genetic Engineering of Natl. Acad. Sci. of Ukraine,
Ukraine, 03680, Kyiv, Akad. Zabolotnogo str., 148, e-mail: yakivr@yahoo.com

CERTAIN CHARACTERISTICS OF RHYZOGENESIS IN *LYCOPERSICON ESCULENTUM* MILL., *LYCOPERSICON PERUVIANUM* VAR. *DENTATUM* DUN. AND THEIR CYBRIDS

Aims. Capability for rooting of the peruvian and cultivated parental forms of the tomatoes (*Lycopersicon peruvianum* var. *dentatum* Dun. and *Lycopersicon esculentum* Mill.) and their cybrids with reciprocal plastom-genome organization as well as with back transferred chloroplasts was investigated. ***Methods***. Shoots of the three different age and order groups of the nine tomato genotypes were grown on MS/2 medium with and without 1-naphtylacetic acid and their capability to multiple or single rhizogenesis estimated. Validity of the results obtained was calculated by variance analysis. ***Results***. Among 3888 shoots only 2.1 % were uncapable for rooting. One must point out that majority of such shoots was revealed when studying spontaneous rhizogenesis. Multiple regeneration of rootlets was encountered 1.8–4 times often in induced rhizogenesis than single one whereas in spontaneous rhizogenesis single rootlets formation encountered 1.7–4 times often compared to multiple one. In general regeneration of rootlets continues for six-nine days in induced rhizogenesis whereas in spontaneous rhizogenesis it exceeded 10 and even 20 days. ***Conclusions***. Diversity of the two related genotypes (Quedlinburger Frühe Liebe i Frühe Liebe cultivars) was supported based on their ability for rooting as well as for four peruvian tomato cybrids clones with backward plastom transferred. Low ability for rooting of 1C clone of the cultivated tomato cybrid serves one more evidence for incompatibility of *L. peruvianum* var. *dentatum* plastom and *L. esculentum* nuclear genome. Both positive and negative correlation of rooting velocity was shown for clone B1A of peruvian tomato cybrid compared with parental species *L. peruvianum* var. *dentatum* what can evidence that rhizogenesis is controlled not only by nuclear genome but plastom as well.
Key words: *Lycopersicon esculentum* Mill., *Lycopersicon peruvianum* var. *dentatum* Dun., cytoplasmic hybrids, rhizogenesis, variance analysis.

УДК 577.218:577.29
СЕКАН А.С., ІСАЄНКОВ С.В., БЛЮМ Я.Б.
ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки» НАН України,
Україна, 04123, м. Київ 123, вул. Осиповського, 2а, e-mail: ehirta3@gmail.com

ВИКОРИСТАННЯ САЙТ-СПЕЦИФІЧНОЇ РЕКОМБІНАЗНОЇ СИСТЕМИ CRE/*lox*P ДЛЯ ОТРИМАННЯ ТРАНСФОРМАНТІВ *ARABIDOPSIS THALIANA*, ВІЛЬНИХ ВІД МАРКЕРНИХ ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

Одним із головних напрямків біотехнології рослин є створення генетично модифікованих (ГМ) сортів рослин, використання яких дозволило б покращити якість продуктів харчування [1]. На сьогоднішній день технології створення ГМ рослин дозволяють привносити в їх геном велику кількість генів інтересу. При цьому під час процесу трансформації разом з геном інтересу привносяться й самі різноманітні маркерні гени (селективні маркерні гени, СМГ), котрих налічується більше, ніж 50 [2]. До них