

Національна академія наук України
Інститут молекулярної біології і генетики
Українське товариство генетиків і селекціонерів
ім. М.І. Вавилова

ФАКТОРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ЕВОЛЮЦІЇ ОРГАНІЗМІВ

**ФАКТОРЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ
ЭВОЛЮЦИИ ОРГАНИЗМОВ**

**FACTORS IN EXPERIMENTAL
EVOLUTION OF ORGANISMS**

Збірник наукових праць

Видається з 2003 р.

ТОМ 15

Присвячено

100-річчю від дня народження Нормана Ернеста Борлоуга

Київ – 2014

УДК 575.8+631.52+60](082)

Фактори експериментальної еволюції організмів: зб. наук. пр. / Національна академія наук України, Інститут молекулярної біології і генетики, Укр. т-во генетиків і селекціонерів ім. М.І. Вавилова; редкол.: В.А. Кунах (голов. ред.) [та ін.]. – К.: Укр. т-во генетиків і селекціонерів ім. М.І. Вавилова, 2014. – Т. 15. – 275 с. – ISSN 2219-3782

Редакційна колегія

Головний редактор **В.А. Кунах**

Заступник головного редактора **Н.М. Дробик**

Я.Б. Блюм, Р.А. Волков, Т.К. Горова, Н.Г. Горovenko, Д.М. Гродзинський, О.В. Дубровна, Г.В. Єльська, І.С. Карпова, І.А. Козерецька, В.А. Кордюм, М.В. Кучук, Л.Л. Лукаш, С.С. Малюта, В.Г. Михайлов, В.В. Моргун, М.А. Пілінська, В.Г. Радченко, С.Ю. Рубан, Ю.М. Сиволап, А.А. Сибірний, В.А. Сідоров, О.О. Созінов, Т.К. Терновська, О.М. Тищенко

Відповідальний секретар – **М.З. Мосула**

Адреса редакції:

Інститут молекулярної біології і генетики НАНУ, вул. Акад. Заболотного, 150, Київ 03680
e-mail: kunakh@imbg.org.ua <http://www.utgis.org.ua>

Editorial board

Editor-in-Chief **V.A. Kunakh**

Deputy editor **N.M. Drobyk**

Ya.B. Blum, R.A. Volkov, T.K. Gorova, N.G. Gorovenko, D.M. Grodzynskyy, O.V. Dubrovna, A.V. El'ska, I.S. Karpova, I.A. Kozeretska, V.A. Kordium, N.V. Kuchuk, L.L. Lukash, S.S. Maliuta, V.G. Mykhailov, V.V. Morgun, M.A. Pilinska, V.G. Radchenko, S.Yu. Ruban, Yu.M. Syvolap, A.A. Sybirniy, V.A. Sidorov, O.O. Sozinov, T.K. Ternovska, O.M. Tyshchenko

Responsible secretary – **M.Z. Mosula**

Editorial office address:

Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine, 150, Zabolotnogo str., Kyiv, 03680
e-mail: kunakh@imbg.org.ua <http://www.utgis.org.ua>

Затверджено до друку рішенням вченої ради Інституту молекулярної біології і генетики НАН України (протокол № 8 від 3 червня 2014 р)

Свідоцтво про державну реєстрацію друкованого засобу масової інформації
серія КВ № 20100-9900Р від 08.07.2013

©Українське товариство генетиків і селекціонерів ім. М.І. Вавилова

ФАКТОРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ
ЕВОЛЮЦІЇ ОРГАНІЗМІВ

ТОМ 15

2014

ФАКТОРЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ЭВОЛЮЦИИ ОРГАНИЗМОВ
FACTORS IN EXPERIMENTAL EVOLUTION OF ORGANISMS

ЗМІСТ

Опалко А.І. Батько «зеленої революції» (до 100-річчя зо дня народження лауреата Нобелівської премії миру Нормана Борлоуга)

КЛІТИННІ, ГЕННІ ТА
МОЛЕКУЛЯРНІ БІОТЕХНОЛОГІЇ

Бавол А.В., Дубровна О.В., Гончарук О.М., Воронова С.С. *Agrobacterium*-опосередкована трансформація м'якої пшениці з використанням калюсних культур

Білінська О.В., Дульнев П.Г. Вплив гелеутворюючого компонента живильного середовища на ефективність отримання гаплоїдів ячменю ярого (*Hordeum vulgare* L.) у культурі пиляків *in vitro*

Венгер А.М., Волкова Н.Е. Ідентифікація типу сорту хмелю звичайного за молекулярними маркерами генів, що кодують халконсинтази

Галаєва М.В., Файт В.І., Галаєв А.В., Федорова В.Р., Сиволап Ю.М. Морозостійкість рекомбінантно-інбредних ліній пшениці и ее связь с аллелями микросателлитных локусов

Горбаль Л.О., Ющук О.С., Забуранний Н., Кобилянський А.М., Остап Б.О., Марінеллі Ф., Лужецький А.М., Федоренко В.О. Генетичний інструментарій для конструювання штамів *Actinoplanes teichomyceticus* із підвищенням рівнем продукції тейкопланіну

Горбатюк І.Р., Бавол А.В., Моргун Б.В. Агробактеріальна трансформація *in planta* пшениці озимого сорту Подольнка та ярого сорту Bobwhite

CONTENTS

Opalko A.I. Ather of the “green revolution” (the 100th anniversary of the birth of Nobel Peace Prize laureate Norman Borlaug)

CELL, GENE AND MOLECULAR
BIOTECHNOLOGIES

Bavol A.V., Dubrovna O.V., Goncharuk O.M., Voronova S.S. *Agrobacterium*-mediated transformation of wheat using calli culture

20 *Bilynska O.V., Dulnyev P.G.* Effect of medium gelatinized component on the efficiency of spring barley (*Hordeum vulgare* L.) haploid production in anther culture *in vitro*

24 *Venger A.M., Volkova N.E.* Identification of hop type by molecular marker of chalcone synthase encoded genes

27 *Galaeva M.V., Fayt V.I., Galaev A.V., Fedorova V.R., Sivolap Yu.M.* Frost resistance of wheat recombinant-inbred lines and its relation with microsatellite loci alleles

31 *Horbal L.O., Yushchuk O.S., Zaburannyi N., Kobylyansky A.M., Ostash B.O., Marinelli F., Luzhetsky A.M., Fedorenko V.O.* Gene engineering methods for the construction of the *Actinoplanes teichomyceticus* strains with increased level of teicoplanin production

35 *Gorbatyuk I.R., Bavol A.V., Morgun B.V.* *Agrobacterium*-mediated *in planta* transformation of winter wheat cv. Podolyanka and spring wheat cv. Bobwhite

- Гулько Т.П., Драгулян М.В., Дерябина Е.Г., Кордюм В.А., Левкив М.Ю., Бубнов Р.В. Морфологическая характеристика процессов повреждения, компенсации и приспособления в патологически измененной печени при воздействии CCl_4
- Гур'янов Д.С., Лисецька Т.Ю., Антоненко С.В., Кравчук І.В., Телегеев Г.Д. Роль домену PH білка BCR у клітинних процесах, що визначають фенотип ph⁺-позитивних мієлопроліферативних захворюваннях
- Дибкова С.М., Грузіна Т.Г., Резніченко Л.С., Ульберг З.Р. Взаємодія наночастинок золота та срібла з плазмідною ДНК
- Дикун М.О., Сірант Л.В., Починок В.М., Завальна Г.В. Порівняльна ефективність використання методів оцінки пивоварних сортів ячменю за спектром гордеїнів
- Дмитрук О.В., Сибірний А.А. Катаболітна деградація фруктозо-1,6-бісфосфатази у метилотрофних дріжджів *Pichia pastoris* і *Hansenula polymorpha*
- Дробот К.О., Матвєєва Н.А., Кваско О.Ю., Шаховський А.М. Створення культури «бородатих» коренів рослин алтеї лікарської *Althaea officinalis* L. з використанням різних векторних конструкцій з геном ifn- $\alpha 2b$ людини
- Егорова Н.А., Ставцева І.В., Якімова О.В., Каменек Л.І., Кривохатко А.Г. Роль некоторых факторов в процессе индукции каллусогенеза *in vitro* у ефіромасличних рослин
- Жук І.В., Дмитрієв О.П. Участь щавлевої кислоти в індукції системної стійкості пшениці до збудника септоріозу
- Замбріборщ І.С., Доброва Г.О., Шестопал О.Л., Паламарчук А.І. Вплив індукційного живильного середовища на формування новоутворень в культурі пиляків *in vitro* пшениці твердої
- Ковальчук М.В., Гулько Т.П., Драгулян М.В., Шувалова Н.С., Дерябина Е.Г., Кордюм В.А. Изменения в популяциях лейкоцитов периферической крови животных с индуцированным остеоартритом после внутрисуставного введения МСК
- 39 Gulko T.P., Dragulyan M.V., Deryabina E.G., Kordyum V.A., Levkiv M.U., Bubnov R.V. Morphological characteristics of processes injury compensation and devices in pathological changes liver CCl_4
- 44 Gurianov D.S., Lysetska T.YU., Antonenko S.V., Kravchuk I.V., Telegeev G.D. Role of PH domain of BCR protein in cellular processes that determine the phenotype of Ph⁺-positive myeloproliferative disorders
- 48 Dybkova S.M., Gruzina T.G., Rieznichenko L.S., Ulberg Z.R. Interaction of gold and silver nanoparticles with plasmids DNA
- 52 Dykun M.O., Sirant L.V., Pochinok V.M., Zavalna G.V. The comparative effectiveness of two electrophoresis procedures of barley hordeins for detection of brewing variants
- 55 Dmytruk O.V., Sibirny A.A. Catabolite degradation of fructose-1,6-bisphosphatase in methylotrophic yeasts *Pichia pastoris* and *Hansenula polymorpha*
- 59 Drobot K.O., Matvieieva N.A., Kvasko O.Yu., Shachovsky A.M. Construction of *Althaea officinalis* L. «hairy» roots with human interferon alpha 2b gene using different transformation vectors
- 63 Yegorova N.A., Stavtzeva I.V., Yakimova O.V., Kamenyok L.I., Krivochatko A.G. Role of some factors in the process of callusogenesis induction *in vitro* in essential oil plants
- 67 Zhuk I.V., Dmitriev A.P. The effect of oxalic acid on of wheat defense responses against septoria tritici agent
- 72 Zambriborsh I.S., Dobrova H.O., Shestopal O.L., Palamarchuk A.I. Culture media influence on the induction of new formation creation in *in vitro* durum wheat anther culture
- 76 Kovalchuk M.V., Gylko T.P., Draguljan M.V., Shuvalova N.S., Deryabina O.G., Kordum V.A. Changes in circulating leukocyte popylatings following intraarticular injection hMSC in animal osteoarthritis model

- Комісаренко А.Г., Михальська С.І., Сергеева Л.Є., Курчій В.М., Тищенко О.М. Вміст вільного проліну при реалізації морфогенетичного потенціалу соняшника за *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації
- 80 *Komisarenko A.G., Mykhalska S.I., Sergeeva L.E., Kurchii V.M., Tishchenko E.N.* The free proline contents via the morphogenesis sunflower *Agrobacterium*-mediated transformation
- Кособрюхов А.А., Креславский В.Д., Ширишкова Г.Н. Роль фитохрома b в регуляції метаболічних реакцій фотосинтетического апарата арабидопсиса дикого типу и мутанта *hy2*
- 84 *Kosobryukhov A.A., Kreslavski V.D., Shirshikova G.N.* Role of phytochrom b in regulation of metabolic reaction of wild tipe and mutant *hy2* arabidopsis photosynthetic apparatus
- Лёшина Л.Г., Булко О.В., Рогальский С.П., Тарасюк О.П., Егоров О.А. Влияние клатратных комплексов β-циклодекстрина с регуляторами роста на морфологические и биохимические показатели барвинка малого *Vinca minor* L.
- 87 *Liozhina L.G., Bulko O.V., Rogalskiy S.P., Tarasyuk O.P., Iegorov O.A.* The influence of clathrate complex of β-cyclodextrin with rowth regulators on morphological and biochemical parameters of periwinkle *Vinca minor* L.
- Лихачева Л.И., Шпилева С.П., Рубан Т.А., Гулько Т.П., Кордюм В.А. Клеточная экструзия ДНК лейкоцитами млекопитающих
- 91 *Likhachova L.I., Shpylova S.P., Gulko T.P., Ruban T.A., Kordium V.A.* Cellular extrusion of DNA by mammalian leukocytes
- Луژهцький Т.Б., Семків М.В., Киановська Б.В., Дмитрук К.В., Сибірний А.А. Підвищення термотолерантності промислових спиртових дріжджів шляхом дерепресії генів синтезу трегалози
- 95 *Luzhetskyi T.B., Semkiv M.V., Kshanovska B.V., Dmytruk K.V., Sibirny A.A.* Elevation of thermotolerance of industrial ethanol producing yeasts via derepression of the genes for trehalose synthesis
- Лукина А.В., Третьякова И.Н. Факторы индукции соматического эмбриогенеза *Pinus sibirica* du tour
- 99 *Lukina A.V., Tretyakova I.N.* Factors of induction of somatic embryogenesis in *Pinus sibirica* du tour
- Мартинюк В.О., Голубенко А.В., Гуменюк Г.Б. Уведення в асептичну культуру рідкісної ендемічної рослини *Atocion lithuanicum* (Zapal.) Tzvel.
- 102 *Martyniuk V.O., Golubenko A.V., Humenyuk H.B.* Initiation to aseptic culture of rare endemic plant *Atocion lithuanicum* (Zapal.) Tzvel.
- Метлицька О.І., Щербак О.В., Ковтун С.І., Троцький П.А., Зюзюн А.Б., Осипчук О.С. Оптимізація біотехнологічних підходів у системі збереження генофонду свиней миргородської породи
- 107 *Metlitska O.I., Shcherbak O.V., Kovtun S.I., Trotskiy P.A., Zyuzyn A.B., Osypchuk O.S.* Optimization biotechnological methods in the system of mirgorodska breed pigs gene pool preservation
- Нітовська І.О., Абраїмова О.Є., Сатарова Т.М., Шаховський А.М., Моргун Б.В. Біолістична трансформація незрілих зародків кукурудзи
- 112 *Nitovska I.O., Abraimova O.YE., Satarova T.M., Shakhovsky A.M, Morgun B.V.* Biolistic transformation of immature maize embryos
- Падалко С.Ф., Каменчук О.П., Бобик Л.В. Компонентний склад і біологічна активність екстрактів гриба *Acremonium* spp.
- 117 *Padalko S.F., Kamenchuk O.P., Bobyk L.V.* Component composition and biological activity of extracts from *Acremonium* spp. fungi

- Папуга А.Е., Самченко Ю.М., Ульберг З.Р., Рубан Т.А., Козинец Г.П., Лукаш Л.Л. Искусственный эквивалент кожи на основе акриловых гидрогелей с иммобилизованными наночастицами серебра и клетками человека 121 *Papuga A.Ye., Samchenko Yu.M., Ulberg Z.R., Ruban T.A., Kozinets G.P., Lukash L.L.* The artificial skin equivalent based on acrylic hydrogel with immobilized silver nanoparticles and human cells
- Ратушняк Я.І., Дуплій В.П. Деякі особливості ризогенезу *Lycopersicon esculentum* Mill., *Lycopersicon peruvianum* var. *dentatum* Dun. та їх цибридів 124 *Ratushnyak Y.I., Duplij V.P.* Certain Characteristics of rhyzogenesis in *Lycopersicon esculentum* Mill., *Lycopersicon peruvianum* var. *dentatum* Dun. and their cybrids
- Секан А.С., Ісаєнков С.В., Блюм Я.Б. Використання сайт-специфічної рекомбінаційної системи Cre/loxP для отримання трансформантів *Arabidopsis thaliana*, вільних від маркерних послідовностей 128 *Sekan A.S., Isaenkov S.V., Blume Ya.B.* Development of site-specific recombinase system Cre/loxP for the production of marker-free transgenic *Arabidopsis thaliana* plants
- Сергеева Л.Е., Михальская С.И., Курчий В.М., Тищенко Е.Н. Изменения в содержании свободного пролина в побегах и корнях проростков кукурузы на начальной стадии действия летальных осмотических стрессов 133 *Sergeeva L.E., Mykhalska S.I., Kurchii V.M., Tishchenko E.N.* The changes of the free proline contents in the differential tissues of corn shoots under initial stages of osmotic stresses
- Сирчін С.О., Харкевич О.С., Павличенко А.К., Юр'єва О.М., Наконечна Л.Т., Пасік Ю.С., Курченко І.М. Особливості біосинтезу позаклітинних целюлаз і ксиланази у *Fennellia flavipes* B.J. Wiley et E.G. Simmons 137 *Syrchin S.O., Kharkevich O.S., Pavlychenko A.K., Yurieva O.M., Nakonechna L.T., Pasik Yu.S., Kurchenko I.M.* Biosynthesis peculiarities of extracellular cellulases and xylanase by *Fennellia flavipes* B.J. Wiley et E.G. Simmons
- Тараненко А.М., Банникова М.О., Моргун Б.В. Сортозалежні ростові показники та регенераційна здатність різних експлантів капусти в культурі *in vitro* 141 *Taranenko A.M., Bannikova M.O., Morgun B.V.* Variety-dependent growth data and regeneration ability of different cabbage explants *in vitro*
- Шестопал О.Л., Замбрїборщ І.С., Ігнатова С.О., Шпак Д.В. Вплив попередньої обробки волотей на морфогенез в культурі пиляків *Oryza sativa* L. 144 *Shestopal O.L., Zambriborshch I.S., Ignatova S.O., Shpak D.V.* Effect of panicle pretreatment on morphogenesis in anther culture *Oryza sativa* L.
- Sakhno L.O.* Seed interferon imbibition leads seedling growth enhancement accompanying by increase in superoxide dismutase activity 148 *Sakhno L.O.* Seed interferon imbibition leads seedling growth enhancement accompanying by increase in superoxide dismutase activity

ПРИКЛАДНА ГЕНЕТИКА І СЕЛЕКЦІЯ

- Бугайов В.Д., Мамалига В.С., Горенський В.М., Максимов А.М. Оцінка та створення вихідного матеріалу для селекції люцерни посівної в умовах підвищеної кислотності ґрунтів 153 *Bugayov V.D., Mamalyga V.S., Gorenskiy V.M., Maksimov A.M.* Initial material for alfalfa breeding on the condition of high acidity

- Букреева Н.І., Доменюк В.П., Белоусов А.О., Соколов В.М., Сиволап Ю.М.* Молекулярні маркери в прогнозуванні гетерозису у кукурудзи 156 *Bukreyeva N.I., Domenyuk V.P., Belousov A.A., Sokolov V.M., Sivolap Yu.M.* Molecular markers based prediction of heterosis in maize
- Вировець В.Г., Лайко І.М., Горшкова Л.М.* Пути нейтрализации наркотической опасности дикой конопли 160 *Vyrovets V.G., Layko I.M., Gorshkova L.M.* Ways of neutralization of drug danger of wild hemp
- Васильев В.С., Хохлов А.М.* Филогенетические особенности половых клеток и процесс оплодотворения у свиней 165 *Vasilev V., Khohlov A.M.* The phylogenetic peculiarity of sexual male cells and process of conception in swine
- Власенко В.А., Бакуменко О.М., Осъмачко О.М.* Характеристика комерційних сортів пшениці м'якої озимої з пшенично-житніми транслокаціями за елементами продуктивності 169 *Vlasenko V.A., Bakumenko O.M., Os'machko O.M.* Description of commercial cultivars of winter bread wheat with wheat-rye translocations on the elements of the productivity
- Гарт О.Ю., Кондратенко С.І., Куракса Н.П.* Мінливість кількісних ознак селекційно-цінних зразків перцю солодкого за умов апоміктичного розмноження 174 *Gart O.U., Kondratenko S.I., Kuraksa N.P.* Variability of quantitative trait of breeding sweet pepper samples under apomictic reproduction
- Драгулян М.В., Костенко С.А., Сидоренко Е.В.* Комплексное исследование свиней по цито- и молекулярно-генетическим маркерам 177 *Drahulyan M., Kostenko S.O., Sidorenko O.V.* Integrated research pigs by cyto- and molecular-genetic markers
- Делеган І.І.* Морфологічні особливості формування крон бука лісового в молодому віці 181 *Delegan I.I.* Morphological features formation crown european beech at a young age
- Козаченко М.Р., Важеніна О.Є., Васько Н.І., Солонечний П.М., Наумов О.Г.* Генетичні та адаптивні аспекти селекції ячменю ярого 186 *Kozachenko M.R., Vazhenina O.E., Vasko N.I., Solonechnyi P.M., Naumov O.G.* Genetical and adaptival aspects of spring barley breeding
- Корнеева М.О., Ненька М.М.* Реакція простих стерильних гібридів цукрових буряків за збором цукру на регульовані фактори середовища 191 *Korneeva M.O., Nenka M.M.* Reaction of simple sterile sugar beet hybrids to regulated environmental factors for sugar yield
- Коршиков І.І., Мильчевская Я.Г., Ткачева Ю.А., Лаптева Е.В.* Ядерно-ядрышковая изменчивость семенного потомства сосны меловой урожаяев разных лет в заповеднике «Меловая флора» 196 *Korshikov I.I., Milchevska Ya.H., Tkachova Yu.A., Lapteva H.V.* The nucleus-nucleolus variation in seed progeny of *Pinus sylvestris* L. var. *cretacea kalenicz. ex kom.* among seed yield of different years from "Melovaya flora" natural reserve
- Лавриненко Ю.О., Вожегова Р.А., Балашова Г.С., Котова О.І.* Вплив світлового режиму та ріверму на індукцію утворення мікротубуль картоплі в культурі меристем *in vitro* 200 *Lavrynenko U.O., Vozhegova R.A., Balashova G.S., Kotova H.I.* Influence of light regime and riverm on the induction of potato microtubers production in meristem *in vitro* culture
- Малецкая Е.И.* Репродуктивная биология и методы селекции сахарной свеклы в XX веке 205 *Maletskaaya E.I.* Reproduction biology of sugar beet and methods of its selection twentieth century

- Мамедова А.Д., Алиев Р.Т. Изучение активности синтеза генетического материала в клетке гетерозисных гибридов томата и хлопчатника 210 *Mammadova A.D., Aliyev R.T.* Intensity of synthesis of the nucleic acids in cell heterotic hybrids tomato and cotton
- Маменко А.М., Емец З.В., Антоненко С.Ф. 215 *Mamenko A.M., Yemets Z.V., Antonenko S.F.* Наследуемость и изменчивость уровня содержания и выхода молочного жира как селекционных признаков в стадах черно-пестрого скота Heredity and variability to the content and output of milk fat as signs of breeding herds of black-and-white cattle
- Моргун Б.В., Чугункова Т.В., Лялько І.І., Великожон Л.Г., Степаненко А.І. 220 *Morgun B.V., Chugunkova T.V., Lyalko I.I., Velykozhon L.G., Stepanenko A.I.* Молекулярно-генетична ідентифікація та цитологічні особливості сортів озимої м'якої пшениці з пшенично-житньою транслокацією The molecular-genetic identification and cytology peculiarities of varieties of winter wheat with wheat-rye translocation
- Поляков В.А., Лях В.А. 223 *Poliakov V.A., Lyakh V.A.* Наследование признаков коробочки межвидовыми гибридами F₁ льна Inheritance of boll traits in F₁ interspecific flax hybrids
- Полякова І.А. 227 *Poliakova I.A.* Использование межвидовой гибридизации при создании ценного исходного материала льна масличного Using interspecific hybridization in establishing valuable oil flax source material
- Самчук В.А., Стекленъов Є.П. 231 *Samchuk V.A., Steklenyov Ye.P.* Мінливість будови шлунка й кишечника у гібридів бантенга і бізона з домашньою коровою Mutability of stomach and bowel structure in hybrids of banteng, bison and domestic cow
- Сидорчук В.І., Васильківський С.П., Гладких Є.Ю. 234 *Sidorchuk V.I., Vasilkivsky S.P., Gladkyh E.Y.* Роль природного добору в сучасній селекції Role of natural selection in modern selection
- Степаненко А.І., Моргун Б.В., Трояновська А.В., Рибалка О.І., Великожон Л.Г. 238 *Stepanenko A.I., Morgun B.V., Troyanovska A.V., Rybalka O.I., Velykozhon L.G.* Алельні варіанти генів поліфенолоксидази PPO-A1 та PPO-D1 у сортів озимої пшениці української селекції Polyphenol oxidase genes P.O-A1 and P.O-D1 variation among ukrainian winter wheat (*T. aestivum* L.) cultivars
- Супрун С.М., Донченко Г.В., Пархоменко Ю.М., Харкевич Е.С., Курченко І.Н., Аретинская Т.Б., Степаненко С.П., Кравченко О.А. 242 *Suprun S.M., Donchenko G.V., Parkhomenko J.M., Kharkevich E.S., Kurchenko I.N., Aretinskaya T.B., Stepanenko S.P., Kravchenko E.B.* Лечебно-профилактические свойства цинксодержащей витаминно-протеиновой добавки Medicinal-prevention properties of vitamin-protein zinc containing product
- Танасієнко І.В., Бузіашвілі Н., Ємец А.І., Блюм Я.Б. 246 *Tanasienko I., Buziashvili N., Yemets A.I., Blume Ya.* Агробактеріальна трансформація томатів (*Solanum lycopersicon*) геном лактоферину людини Agrobacterium-mediated tomato (*Solanum lycopersicum*) transformation with human lactoferrin gene
- Хохлов А.М. 250 *Khohlov A.M.* Эволюция зубной и костной системы у представителей рода *Sus* Evolution of tooth and bone systems in *Sus* gender representatives

- Черчель В.Ю., Сатарова Т.М., 255 *Cherchel V.Ju., Satarova T.M.,*
Борисова В.В., Абраїмова О.Є., *Borysova V.V., Abraimova O.E., Fedko M.M.,*
Федько М.М., Степневська Я.В. *Stepnevska Ya.V.* Application of SNP-analysis
Використання SNP-аналізу для for the characterization of genetic structure of
характеристики генетичної структури breeding material in maize and sorghum
селекційного матеріалу кукурудзи і сорго
- Macewicz L.L., Lylo V.V., Karpova I.S., 260 Macewicz L.L., Lylo V.V., Karpova I.S.,*
Kotsarenko K.V., Ruban T.A., Lukash L.L. Plant and animal lectines as modulators of
Plant and animal lectines as modulators of mgmt and marp gene expression *in vitro*
Motsny I.I., Sudarchuk L.V., Galaev A.V., 264 Motsny I.I., Sudarchuk L.V., Galaev A.V.,
Chebotar S.V. Application of PCR markers for detecting 1BL.1RS wheat-rye
Application of PCR markers for detecting 1BL.1RS wheat-rye chromosome translocations and (1B)1R
chromosome translocations and (1B)1R substitutions
substitutions
Palamarchuk A.I. Increasing grain yield 269 *Palamarchuk A.I.* Increasing grain yield
potential and stability in durum winter wheat potential and stability in durum winter wheat
in Ukraine in Ukraine

УДК 631.527:575(092)

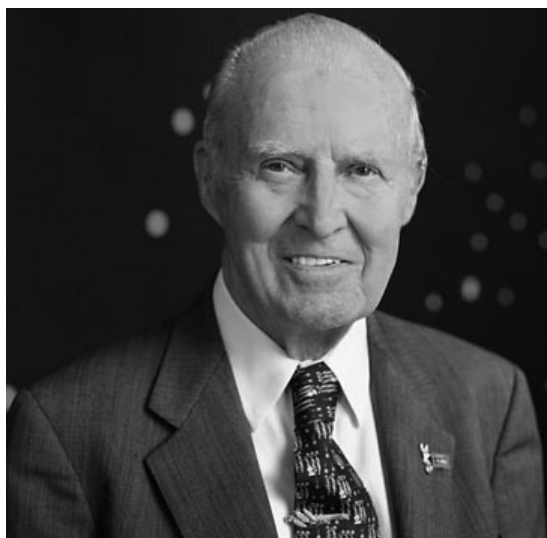
ОПАЛКО А.І.

Національний дендрологічний парк «Софіївка» НАН України, Уманський національний університет садівництва,

Україна, 20300, м. Умань, Черкаської обл., вул. Київська, 12А, e-mail: opalko_a@ukr.net

БАТЬКО «ЗЕЛЕНОЇ РЕВОЛЮЦІЇ»

(до 100-річчя зо дня народження лауреата Нобелівської премії миру Нормана Борлоуга)



Ім'я Нормана Борлоуга (Norman E. Borlaug) вже понад півстоліття пов'язується з радикальними змінами, що відбулися у 40–70 роках минулого сторіччя у сільському господарстві країн, що розвиваються. Підкреслюючи надзвичайне значення цих змін для світової економіки взагалі, та для розв'язання продовольчої проблеми зокрема, тодішній керівник агентства з міжнародного розвитку США Вільям Гауд (William Gaud, 1968) назвав їх «зеленою революцією». Особистий внесок Нормана Борлоуга у модернізацію світового сільського господарства здобув всесвітнє визнання. Високу оцінку його досягнень було підтверджено присудженням Нобелівської премії миру у 1970 році [14], а сторіччя зо дня народження цього видатного вченого і організатора біологічної й аграрної науки, який убезпечив від голоду понад три мільярди людей [21], світова громадськість відзначила у нинішньому році.

У життєписі Нормана Борлоуга як видатного вченого і вмілого організатора впровадження наукових досліджень у світове сільськогосподарське виробництво доречно виділити чотири основні періоди: становлення вченого; підґрунтя «зеленої революції»; триумф «зеленої революції»; започаткування нової хвилі «зеленої революції».

Доля світової цивілізації залежить від забезпечення гідного рівня життя для всього людства.

Норман Борлоуг

Становлення вченого

Онук норвезьких іммігрантів Норман Ернест Борлоуг народився 25 березня 1914 року на фермі поблизу невеличкого містечка Креско (Cresco), що у північно-східній частині штату Айова, в сім'ї Генрі і Клари Борлоугів. Дитинство майбутнього нобелівського лауреата проходило на фермі. Саме завдяки родинному трудовому вихованню у його психіці з малолітства закарбувалося розуміння, що без напруженої праці неможливо досягти жодного успіху. Запроваджені родиною кращі риси Нормана Борлоуга розвивалися на тлі суворих життєвих реалій та під впливом шкільних учителів і наставників. У малесенькій школі, де в одній кімнаті разом з дітьми американських фермерів, переважно прихожан методистської церкви, навчалися діти емігрантів і з лютеранських норвезьких, і католицьких чеських сімей, молодий Норман Борлоуг уперше дістав урок, що труднощі фермерського життя в прерії об'єднують розрізаних людей і спонукають їх до співпраці. Він зрозумів, як і інші іммігрантські діти, що всі вони мають багато спільного, так само, як і їхні батьки, що працюють разом; усвідомив, що забезпечення достатнього харчування для них усіх набагато важливіше, ніж будь-які етнічні чи мовні відмінності, що можуть їх розділяти. Це відчуття залишалося з Борлоугом і пронизувало його роботу протягом усього життя [21].

Спортивні навички й бійцівський характер, вихований його шкільним тренером з грецької боротьби Дейвом Бартелмою (David C. Bartelma), котрий навчав Нормана Борлоуга не здаватися навіть перед найгірнішим супротивником, неодноразово допомагали йому у найскрутніших життєвих ситуаціях [15–17]. Наступний урок, що стосувався значення для фермерів доріг, якими вони перевозили отриманий врожай на торговище, Норман

Борлоуг також отримав ще у роки навчання. Бездоріжжя, що накладалося на негаразди зі збутом вирощеного на сімейних фермах врожаю під час Великої депресії, посилювало прояви політичної нестабільності в Айові, доводячи їх до близького до повстання стану. Мережа доріг, побудованих за державною програмою по всьому штату, зняла напругу і не лише сприяла перевезенню сільськогосподарської продукції від ферми до ринку, а й зменшила проблеми з доставлянням дітей до школи та полегшила фермерам доступ до медичної допомоги [15, 20, 21].

Ще підлітком Норман Борлоуг поставив перед собою амбітну мету – стати першим в історії своєї родини фахівцем з вищою освітою. Спочатку він планував отримати фах викладача середньої школи в коледжі штату Айова. Однак, коштів на навчання не було і після закінчення школи Норман став працювати за 50 центів у день як найманий сільськогосподарський робітник і почав заощаджувати з цієї зарплати, щоб зібрати суму потрібну для оплати за рік навчання у коледжі. Зрештою він заробив достатньо грошей, але плани щодо вибору фаху змінилися і Норман розпочав вивчати лісівництво у Міннесотському університеті. Здобувши ступінь бакалавра у 1937 році він улаштувався на роботу до Лісової служби США, де працював на її станціях у Массачусетсі й Айдахо. Однак плани стосовно кар'єри у лісовому господарстві радикально змінилися, коли Норман Борлоуг вперше почув лекцію фітопатолога Ельвіна Стакмана (Elvin Stakman). Молодий лісівник був зачарований його ідеями щодо створення методами гібридизації нових стійких проти іржі сортів пшениці та інших зернових культур. Це захоплення втілювалось у ступінь магістра фітопатології, який Норман Борлоуг у отримав в Міннесотському університеті у 1939 році, а у 1942 році – ступінь доктора філософії з цього ж фаху. У 1942 по 1944 роках він працював мікробіологом у Фонді Дюпон де Немур, де тестував промислові й сільськогосподарські бактерициди, фунгіциди та консерванти [15, 21].

Саме в ці роки виховані в сім'ї морально-етичні життєві принципи Нормана Борлоуга та конкурентний дух тренуваного спортсмена розвинулись і доповнились винятковою здатністю зосередитись на головному, вмінням контролювати діяльність розуму і почуттів на тлі жагучої захопленості своєю роботою.

Підгрунття «зеленої революції»

Темпи інтенсифікації сільського господарства у промислово-розвинених державах почали прискорюватись ще з XIX сторіччя рівнобіжно зі зростанням чисельності міського населення і відповідним зменшенням кількості працюючих в аграрному виробництві. Відповідно модернізація аграрного сектора економіки завдяки створенню та впровадженню нових високопродуктивних сортів, механізації, хімізації тощо відбувалась відносно рівномірно – зі стабільним нарощуванням валових зборів і врожайності основних сільськогосподарських культур [7]. У більшості сучасних європейських держав така відносна стабільність росту аграрного виробництва порушувалась у роки воєн, зокрема першої світової війни, а в США – у роки «Великої депресії» 1929–1933 років, коли попит на американське продовольство на європейському ринку скоротився завдяки відродженню власного сільського господарства у Великобританії, Франції, Бельгії, Голландії та деяких інших державах, що вийшли з війни. Натомість у Латинській Америці, Південній і Південно-Східній Азії та Африці тоді переважало дрібнотоварне сільськогосподарське виробництво у традиційно невеликих фермерських господарствах, з робочою худобою, відсутністю належних технічних засобів для обробки ґрунту та збирання врожаю, без хімічних добрив і пестицидів, без іригації та з використанням місцевих сортів.

Низька врожайність і недостатня продуктивність праці у згаданих регіонах на тлі політичних змін кінця XIX – початку XX сторіччя здебільшого ставали причиною дефіциту продовольства, хронічного недоїдання значної частки населення, а в неврожайні роки призводили до голоду. Саме катастрофічно повторювані неврожайні зернових, від яких на початку 40-х років минулого сторіччя потерпала Мексика, спонукали уряд цієї країни звернутися за допомогою до керівництва США. На ініціативу віце-президента США Генрі Воллеса (Henry A. Wallace), однак на кошти неурядового благодійного Фонду Рокфеллера, до Мексики була направлена делегація американських учених. До складу делегації потрапив молодий фітопатолог-селекціонер Норман Борлоуг [20, 23].

З'ясувавши, що головною причиною нестабільності врожайів пшениці у фермерських господарствах Мексики було ураження її хворобами, зокрема іржастими, Норман Борлоуг розпочав пошук вихідного матеріалу для забезпечення цілеспрямованої програми

селекції. Вчений виявив, що з численних сортів, привезених з різних країн, лише чотири мали стійкість проти іржі. Схрещування відібраних імунних сортів з місцевими сортами та включення їх у гібридизацію з японським сортом Норин 10, що характеризувався коротким міцним стеблом, дало змогу відібрати стійку проти хвороб і шкідників і водночас адаптовану до особливостей мексиканського клімату короткостеблову, стійку проти вилягання, так звану «карликову» пшеницю, яка за відповідного вологозабезпечення і мінерального живлення давала надвисокі (до 40 ц/га) врожаї. Слід пам'ятати, що в ті роки мексиканські фермери збирали зерна по 8–10 ц/га. Успіху Нормана Борлоуга сприяло запровадження ним з 1945 року «трансферної селекції», за якої гібридні F_2 , F_3 і наступні покоління почергово досліджували у різні (літній і зимовий) сезони у двох контрастних за агрометеорологічними умовами зонах з відстанню між ними близько 1000 км і різницею у висоті над рівнем моря понад 2,5 км [18]. Унаслідок цього Мексика вже у 1956 році перетворилась із хронічного імпортера збіжжя в державу, що не лише повністю забезпечувала себе пшеницею, а й стала експортувати зерно. Мексиканські сорти пшениці Сонора 63, Сонора 64, Лерма Рохо і Майо 64 здобули світове визнання. У 1963 р. на базі мексиканських дослідних установ було створено Міжнародний центр поліпшення сортів пшениці та кукурудзи (СІММУТ), що й дотепер активно сприяє поширенню «зеленої революції» в світі [13, 22].

Тріумф «зеленої революції»

«Зелена революція» мала не тотальний, а осередковий і хвильовий характер із самого початку [2]. Розпочавшись у сорокові роки минулого сторіччя в Мексиці, вона поступово (хоча й швидше, ніж Мексикою) наприкінці 60 – початку 70-х років поширилась країнами Азії, зокрема в Індії, Пакистані й на Філіппінах. В афро-азійських країнах «зелена революція» не була природним результатом попередньої соціально-економічної еволюції. Вона народилася як заперечення всіх суспільних форм, що базувалися на традиційному технічному базисі, стала «індустріальним сплеском», цілком адекватним відлунням епохи науково-технічної революції, яка відбувалася в розвинених державах [8]. До запровадження принципів «зеленої революції» розрив у способах ведення сільського господарства між розвиненими державами і країнами, що розвиваються, був величезним. Так, у Південній

і Південно-Східній Азії вносили в середньому менше 6 кг/га хімічних добрив, тоді як у Західній Європі близько 100, а в Японії до 250 кг/га. Внаслідок діяльності СІММУТ і самого Нормана Борлоуга та цільових інвестицій значно зменшився дефіцит продовольства в Індії й Пакистані, а Південна Корея, Тайвань, Сінгапур, Гонконг, Малайзія, Індонезія, Таїланд і Філіппіни в Південно-Східній Азії, а також Мексика, Бразилія, Аргентина і Чилі в Латинській Америці продемонстрували вражаючий економічний і навіть соціальний прогрес.

Схожі процеси відбувалися в Україні, як і в решті республік колишнього СРСР, однак під іншими гаслами «хімізації» та «інтенсивних» або «індустріальних» технологій вирощування сільськогосподарських культур [1]. У 40–60 роках минулого сторіччя в СРСР збирали по 8–11 ц/га зернових, хоча в Україні ці показники були в півтора рази більші [3, 9], однак явно недостатні. Завдяки праці видатних селекціонерів В.М. Ремесла, П.П. Лук'яненка, Ф.Г. Кириченка, Д.О. Долгушина, М.А. Литвиненка та інших і запровадженню створених ними нових інтенсивних сортів разом з інтенсивними технологіями їх вирощування впродовж двадцятиріччя вдалось збільшити врожайність озимої пшениці у два–три рази.

Тріумфальний поступ «зеленої революції» забезпечувався масовим запозиченням нових сортів і передових технологій з найбільш розвинених агросистем зі стабільною врожайністю для перенесення їх на поля країн, що розвиваються, внаслідок чого вдалось досягнути поліпшення продовольчої безпеки в Південній Америці, Південно-Східній Азії, багатьох районах Африки. Отримане небувале зростання врожайності пшениці й рису дало підстави сподіватись, що загроза голоду залишилась у минулому і розпочалась нова ера розвитку сільського господарства на планеті. Норман Борлоуг став одним з п'яти людей у світовій історії, кому було присуджено не лише Нобелівську Премію миру, а також Президентську медаль Свободи і Золоту медаль Конгресу. Крім нього так були вшановані тільки мати Тереза, Нельсон Мандела, Елі Візель, і Мартін Лютер Кінг.

Започаткування нової хвилі «зеленої революції»

Стабільність результатів започаткованої Норманом Борлоугом «зеленої революції» не видається настільки очевидною в останні десятиріччя. Так, якщо з 1950 по 1984 рік ріст валової врожайності зернових культур дійсно

значно перевищував приріст чисельності населення земної кулі, а зерновиробництво в перерахунку на душу населення за той період зросло на третину – з 247 до 342 кг зерна на рік, однак до кінця 1990-х років цей показник знизився до 317 кг. Це спонукало самого Нормана Борлоуга визнати, що його успіхи в подоланні загрози голоду були тимчасовими, а подальших досягнень можна очікувати від запровадження біотехнологічних методів у селекцію та поліпшення демографічної ситуації. Зокрема вчений зазначив, що: сільське господарство – унікальний вид людської діяльності, який можна одночасно розглядати як мистецтво, науку і ремесло управління ростом рослин і тварин для потреб людини. І завжди головною метою цієї діяльності залишалося зростання виробництва продукції, щоб нагодувати всезростаюче населення Землі [8, 11, 12]. При цьому він висловив переконання, що вже сьогодні (йшлося про 2000 рік) людство має технології, що або повністю підготовлені до впровадження, або такі, що перебувають у завершальній стадії розробки, використання яких дасть змогу надійно прогодувати майбутнє 10-тимільярдне населення планети. Питання лише в тому, чи отримають виробники продовольства в усьому світі доступ до цих технологій [10], чи матимуть фермери у будь-якій точці світу доступ до найбільш передових методів вирощування високоврожайних сортів культурних рослин.

Норман Борлоуг переконує, що однією з найбільших проблем, що стоятимуть перед суспільством у 21 сторіччі, буде оновлення змісту й розширення доступу до освіти для всіх соціальних груп в усіх регіонах планети, і щоб таке оновлення освіти йшло в ногу з наукою. Саме протистояння споживачів проти використання біотехнологічних сільськогосподарських культур в Європі та інших регіонах можна було б уникнути, якби більше людей отримали кращу освіту про генетичне різноманіття і його зміни, адже спекулюючи на неосвіченості населення екстремальні екологи, здається, роблять все можливе, щоб зірвати науковий прогрес у біології і аграрному виробництві [10]. При цьому ними використовується малозрозуміла і певною мірою загрозлива для широкого загалу аббревіатура ГМО, що поступово із засобів масової інформації як журналістсько-побутовий і не надто грамотний сленг стала проникати в біотехнологічну науку [6] не лише в Україні.

Нинішнє розповсюдження біотехнологічних сільськогосподарських культур у світі, площі під якими незважаючи на «лякалку ГМО» з кожним роком зростають, можна вважати сучасним біотехнологічним втіленням ідей Нормана Борлоуга [23, 24] – новою хвилею «зеленої революції» [2].

Це зумовлює ревізію стратегії подальшого збільшення врожайності сільськогосподарських рослин і продуктивності агроєкосистем. На заміну традиційним концепціям селекції пропонується нова, орієнтована на формування біотехнологічними методами ознак антропоадаптивності у новостворюваних сортів. Антропоадаптивні сорти здатні забезпечувати досить високі (хоча й не рекордні) врожаї у сприятливих умовах і в сприятливі роки за незначного зменшення врожаю і його якості у несприятливі роки. Нова концепція селекційних програм розглядає врожайність як похідну двох компонентів – продуктивності і витривалості нових сортів культурних рослин [4, 5, 19]. Тож антропоадаптивність, як здатність сорту стабільно задовольняти потреби людини: забезпечувати щорічну врожайність і якість, стійкість проти хвороб, шкідників і несприятливих ґрунтово-кліматичних умов, пристосованість до механізованого догляду й збирання врожаю, здатність ефективно акумулювати сонячну енергію, рости на забруднених фонах без накопичення в урожаї шкідливих речовин (пестицидів, нітратів, солей важких металів, радіонуклідів тощо), опірність проти несприятливого впливу господарчої діяльності людини – може розглядатись як мета селекції і базисний компонент нової хвилі «зеленої революції».

Висновки

Життєпис лауреата Нобелівської премії миру Нормана Борлоуга як втілення «американської мрії щодо рівних можливостей» може бути прикладом науковцям будь-якої країни для наслідування. Неупереджене ставлення до людей різних національностей, різного кольору шкіри, релігійних і політичних переконань – без жодного натяку на ксенофобію, загострене відчуття новизни, на корисні для людства ідеї, розуміння, що найвидатніше наукове досягнення мертве, якщо не докласти відповідних зусиль для його впровадження, помножені на титанічну працездатність і наполегливість зумовили успіх ученого і його ім'я буде завжди сприйматись як ім'я Батька «зеленої революції».

Література

1. Иофинов С.А., Лышко Г.П. Индустриальные технологии возделывания сельскохозяйственных культур: Учеб. пособие для ФПК. – М.: Колос, 1983. – 191 с.
2. Кабачевская К.В. Волновая составляющая «зеленой революции» // Культура народов Причерноморья: научный журнал / Крымский научный центр Национальной академии наук и Министерства образования и наук Украины (Симферополь), Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского (Симферополь), Межвузовс». – 2007. – № 106. – С. 49–54.
3. Народное хозяйство СССР в 1960 году (Статистический ежегодник). – М.: Госстатиздат ЦСУ СССР, 1961. – Земледелие. – С. 384–447.
4. Опалко А.И., Опалко О.А. Проблема повышения антропоадаптивного потенциала культурных растений // Актуальные проблемы сохранения устойчивости живых систем: Мат. VIII Международ. науч. экологической конф. (Белгород, 27–29 сентября 2004 г.). – Белгород: Изд-во БелГУ, 2004. – С. 152–153.
5. Опалко А.И. Антропоадаптивность растений как базисный компонент рационального использования земельных ресурсов // Развитие регионов в XXI веке: мат. I Международ. науч. конф.: Сев.-Осет. гос. ун-т им. К.Л. Хетагурова. (31 октября–2 ноября 2013 г.) [Под об. ред. В.Г. Созанова]. – Владикавказ: ИПЦ СОГУ, 2013. – Часть I. – С. 348–354.
6. Опалко О.А., Опалко А.И. Дидактичні проблеми селекційно-генетичної термінології // Фактори експериментальної еволюції організмів: Зб. наук. пр. НАНУ, УААН, АМНУ, УТГіС ім. М.І. Вавилова; Редкол.: ... Кунах В. А. (голов. ред.) та ін. – К.: Логос, 2010. – 9. – С. 489–494.
7. Потапов Н.А., Салицкий А.И., Шахматов А.В. Зеленая революция // Экономика современной Азии. – М.: Международные отношения, 2008. – С. 37–44.
8. Савицкая М.Т. Социально-философский аспект «зеленой революции» середины XX века – 2012. – [Электронный ресурс]. – Режим доступа: [http://www.rgazu.ru/db/vestnic/2012\(3\)/gum/003.pdf](http://www.rgazu.ru/db/vestnic/2012(3)/gum/003.pdf)
9. Сельское хозяйство Союза ССР (Статистический справочник). – М.: Госпланиздат, 1939. – V. Посевные площади и урожай. – С. 136–247.
10. Borlaug N.E. Ending world hunger: The promise of biotechnology and the threat of antisience zealotry // Plant Physiology. – 2000. – 124. – P. 87–490.
11. Borlaug N.E., Dowswell C.R. Prospects for world agriculture in the twenty-first century // Sustainable agriculture and the international rice-wheat system [Eds. R. La, P.R. Hobbs, N. Uphoff, D.O. Hansen]. – Madison: Marcel Dekker Inc., 2004. – P. 1–18.
12. Borlaug N.E. Sixty-two years of fighting hunger: personal recollections // Euphytica – 2007. – 157, N 3. – P. 287–297.
13. Borlaug N.E. Wheat, rust, and people // Phytopathology. – 1965. – 55. – P. 1088–1098.
14. Brown L.R. Nobel Peace Prize: developer of high-yield wheat receives award (Norman Ernest Borlaug) // Science. – 1970. – 170, N 3957. – P. 518–519.
15. Dowswell C., Rajaram S. Dedication: Norman E. Borlaug the humanitarian plant scientist who changed the world // Plant Breeding Reviews [Ed. Jules Janick]. – 2007. – 28 – P. 1–38.
16. Dowswell C. Retrospective. Norman Ernest Borlaug (1914-2009) // Science. – 2009. – 26, N 5951. – P. 381.
17. Eustice J. Wrestling roots run deep in Southern Minnesota and Iowa: Bartelma and Borlaug // Eustace families post. – 2013. – P. 31.
18. Miller H.I. Norman Borlaug: The genius behind the Green revolution [Электронный ресурс] // Forbes. – 2012. – Режим доступа: <http://www.forbes.com/sites/henrymiller/2012/01/18/norman-borlaug-the-genius-behind-the-green-revolution/>
19. Opalko A.I., Kotko I.K. Wykorzystanie obcego DNA dla uzyskania antropoadaptywnych mutacji pozenicy ozimej // Hodowla roslin i nasiennictwo (Biuletyn branżowy). – N 2. – 1992. – P. 1–4.
20. Phillips R.L. Norman E. Borlaug: A Biographical Memoir. – Washington: NAS, 2013. – 27 p.
21. Quinn K.M. Dr. Norman Borlaug: Full Biography [Электронный ресурс] // The World Food Prize. – 2009. – Режим доступа: https://www.worldfoodprize.org/en/dr_norman_e_borlaug/full_biography/
22. Swaminathan M.S. Obituary: Norman E. Borlaug (1914–2009): Plant scientist who transformed global food production // Nature. – 2009. – 461, N 7266. – P. 894.
23. Weasel L.H. Food fray: inside the controversy over genetically modified food. – New York et al.: AMACOM, 2009. – 256 p.
24. Zargar S.M., Nazir M., Agarwal G.K., Rakwal R. OMICS based interventions for climate proof crops // Genomics and Applied Biology. – 2011. – 2, N 4. – P. 24–28.

OPALKO A.I.

National dendrological park "Sofiyivka" of NAS of Ukraine and Uman National University of Horticulture, Ukraine, 20300, Uman, Kiyivska str., 12A, e-mail: opalko_a@ukr.net

FATHER OF THE «GREEN REVOLUTION» (the 100th anniversary of the birth of Nobel Peace Prize laureate Norman Borlaug)

Aims. To find out the sources of the formation and development of a personality of Norman E. Borlaug as one of the most outstanding figures of the XX century whose efforts prevented famine for over three billion people on our planet. **Methods.** To do the research, a biographic method of studying an individual way and life experience was used. The data, received as a result of analyzing available publications presented by the scholars of various scientific schools in different countries, was generalized with help of a group selection method; using quotation criteria this made it possible to prioritize the researches carried out according to international programs and to put aside some doubtful articles. **Results.** It was established that Norman Borlaug's extraordinary character resulted from labor education in the family, and was very much influenced by school teachers and university professors. Further, he «made himself». Emphasizing an exceptional significance of the radical changes, which took place in agriculture of the developing countries in 40–70 ties of the last century, for world economy in general and for the solution of food problems in particular, the then head of the USAID William Gaud (William Gaud, 1968) called them the «green revolution». High appraisal of Norman Borlaug's personal contribution to the modernization of world agriculture was confirmed by awarding him with Nobel Peace Prize in 1970 and by celebrating his 100th anniversary, as an outstanding scientist and founder of biological and agrarian science, in scientific societies and world community, including those in Ukraine. In the biography of Norman Borlaug, as he was a famous scientist and a first-rate organizer to introduce researches into world agricultural production, four major periods were classified: becoming a scientist; grounds of the «green revolution»; triumph of the «green revolution»; initiation of a new wave of the «green revolution». **Conclusions.** Norman Borlaug's biography, as a realization of «an American dream of equal possibilities», can be an example to follow for the scientists of every country. Impartial attitude to people of different nationalities, skin color, religion and political beliefs – without any signs of xenophobia, keen sense of a novelty and useful ideas for mankind, deep understanding that the best scientific discovery would be useless without proper efforts for its introduction combined with titanic hard work and persistence – all this resulted in the scientist's success and he will always be associated with the name of the Father of the «green revolution». The world dissemination of biotechnological/biotech crops supported by Norman Borlaug can be considered as current biotechnological translation of his idea to fight famine – a new wave of the «green revolution».

Key words: anthropoadaptability, agricultural development, biotech crops, food production, Nobel Peace Prize, plant breeding, plant pathology, short-strawed disease resistant wheat.

КЛІТИННІ, ГЕННІ ТА МОЛЕКУЛЯРНІ БІОТЕХНОЛОГІЇ

УДК 581.143.6:58.085

БАВОЛ А.В., ДУБРОВНА О.В., ГОНЧАРУК О.М., ВОРОНОВА С.С.

Інститут фізіології рослин і генетики Національної академії наук України,
Україна, 03022, м. Київ, вул. Васильківська, 31/17, e-mail: bavoll@rambler.ru

AGROBACTERIUM-ОПОСЕРЕДКОВАНА ТРАНСФОРМАЦІЯ М'ЯКОЇ ПШЕНИЦІ З ВИКОРИСТАННЯМ КАЛЮСНИХ КУЛЬТУР

На сьогодні, рослини пшениці, стійкі до стресових чинників, отримують, в основному, методами генетичної інженерії та клітинної селекції. Генетична трансформація рослин може здійснюватись за допомогою *Agrobacterium*-опосередкованого методу або шляхом прямого перенесення генів. Найбільш поширеним методом для рослин є генетична трансформація з використанням *Agrobacterium* для перенесення екзогенних Т-ДНК в рослинну клітину. Незважаючи на те, що такий підхід широко застосовується для більшості сільськогосподарських культур, у зернових спочатку не було отримано успіхів, оскільки ці культури були, природно, не сприйнятливі до *Agrobacterium* [1, 2]. Тим не менш, вдосконалення технологій *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації привело до отримання генетично модифікованих рослин пшениці [3–5].

Цей метод має декілька переваг у порівнянні з іншими підходами: в геном реципієнта включається обмежене число копій генів, можливість передачі відносно великих генетичних конструкцій з мінімальною її перебудовою, простота методик та загалом менша вартість. Очікується, що *Agrobacterium* буде використовуватися в якості надійного і недорогого вектора для доставки екзогенних генів у геном пшениці. Проте, використання такого підходу ускладнене тим, що для його успішного застосування існуючі методики потребують вдосконалення та адаптації для роботи з конкретним рослинним об'єктом. Крім того, значні труднощі пов'язані з тим, що клітини м'якої пшениці мало сприйнятливі до дії агробактерії. Тому розробка ефективної методики трансформації пшениці за допомогою *A. tumefaciens* є актуальною задачею.

Розробка відповідного способу *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації дуже складне завдання, тому що важливо розуміти роль усіх чинників, які впливають на

доставку Т-ДНК в клітини, з яких в подальшому буде здійснюватися регенерація рослин. Після отримання фертильних рослин, необхідні подальші аналізи для перевірки інтеграції та експресії Т-ДНК.

Визначено декілька факторів, які впливають на перенесення Т-ДНК в клітини рослин: первинний експлант, штам *Agrobacterium*, векторна конструкція, щільність суспензії агробактеріальних клітин, склад поживних середовищ, умови трансформації (температура і час прекультивування, інокуляції та кокультивування), наявність поверхнево-активних речовин або індукційних агентів при інокуляції та кокультивуванні, антибіотики або селективні маркери та ін. [6–9].

Одним з найбільш визначальних факторів, що впливає на ефективність *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації рослин є вибір відповідного типу експланта. Щоб встановити параметри, необхідні для успішного отримання трансгенної пшениці були випробувані різні експланти. Але тільки в 1997 році Cheng і співавт. [10] повідомили про стабільну трансформацію, при спільному культивуванні *Agrobacterium* із свіже виділеними незрілими зародками, прекультивованими незрілими зародками, і ембріогенним калюсом, та продемонстрували успішну передачу екзогенних генів у наступні покоління рослин. Крім того, були випробувані деякі інші експланти, такі як проростки 1–4-денного віку [11], колоски [12], апікальні меристеми зародків сухого насіння [13], базальні частини листя [14]. Ці експерименти показали високу ефективність трансформації, але успадкування трансгенів в насінневих поколіннях рослин не була представлено.

Метою роботи була *Agrobacterium*-опосередкована трансформації морфогенних калюсів м'якої пшениці та оптимізація етапів її проведення.

Матеріали і методи

У дослідженнях використовували сучасний високоврожайний сорт пшениці Подолянка, який характеризується високим морфогенним потенціалом *in vitro* [15]. Для трансформації використовували калюси, індуквані з апікальних меристем 3-добових стерильних проростків, попередньо вирощених *in vitro*. Калюсні культури культивували на середовищі МС з додаванням 2 мг/л 2,4-Д. *Agrobacterium*–опосередковану трансформацію проводили з використанням векторної конструкції рСВ002, яка містить: *gus* – ген ферменту β -глюкуронідази та *nptII* – ген неоміцинфосфотрансферази II *E. coli* (штам GV 2260) та векторної конструкції рВі2Е, з дволанцюговим РНК–супресором гена проліндегідрогенази (*pdh*) та *nptII* – ген неоміцинфосфотрансферази II *E. coli* (штам LBA4404) (рис. 1).

Нічну культуру *A. tumefaciens* отримували при культивуванні на середовищі LB з додаванням рифампіцину 50 мг/л та канаміцину 100 мг/л. Для кокультивування експлантів використовували суспензію агробактерії в концентрації $OD_{660} = 0,2-0,8$. Кокультивування тривало 1–5 діб. Подальша елімінація агробактерії проводилась за допомогою антибіотика цефотаксиму в концентрації 100–1000 мг/л. В якості селективного агента використовували антибіотик канаміцин у концентрації 100 мг/л. Стійкі до канаміцину калюсні культури добирали протягом 2 пасажів. Стійкі калюсні лінії пересажували на регенераційне середовище і культивували до отримання пагонів. Канаміцинстійкими вважались регенеранти, що утворились за дії селективного чинника та зберігали зелене забарвлення та нормально росли і розвивалися на селективному середовищі.

Результати та обговорення

Одним з перших етапів генетичної трансформації є кокультивування експлантів з суспензією агробактерії. Успіх подальшої

роботи значною мірою залежить від добору її концентрації. Нами була проаналізована різні дози суспензії агробактерії – від 0,1 до 0,8 опт. од. Найбільш оптимальною виявилась концентрація 0,2 опт. од. Вища концентрація бактерій в середовищі спричиняла появу некротичних плям, а також сповільнення росту та розвитку пагонів. За такої концентрації в подальшому вдавалось майже в 100 % калюсів провести елімінацію агробактерії та отримати максимальну кількість регенерантів. За більшої концентрації суспензії доводилось зменшувати тривалість кокультивування, що було пов'язано з ускладненнями при елімінації агробактерії. При цьому знижувалась імовірність вбудовування Т-ДНК.

Значною мірою на вбудовування ДНК впливає тривалість спільного кокультивування калюсів з агробактерією. Оптимальний результат було отримано при спільному кокультивуванні калюсів з агробактерією протягом 3-х діб, після чого $53,8 \pm 4,65$ % калюсів зберігали морфогенетичний потенціал. Збільшення тривалості експозиції понад 3 доби в подальшому приводило до неможливості повної елімінації агробактерії.

Елімінація агробактерії здійснювали за допомогою антибіотика цефотаксима. Нами показаний позитивний вплив цього антибіотика на морфогенез у культурі апікальних меристем пагонів і зрілих зародків пшениці [16]. Проте зі збільшенням концентрації цефотаксиму в поживному середовищі збільшується негативний вплив на калюсні тканини, а саме на утворення соматичних зародків. Найбільший вихід регенерантів спостерігався при концентрації цефотаксима 250 мг/л. При використанні векторної конструкції рСВ002 було отримано 55, а при використанні рВі2Е – 38 стійких калюсних ліній (табл. 1).

Для виявлення стабільної експресії гена *gus* проводили гістохімічне фарбування тканин калюсу через 21 добу після трансформації (рис. 2).

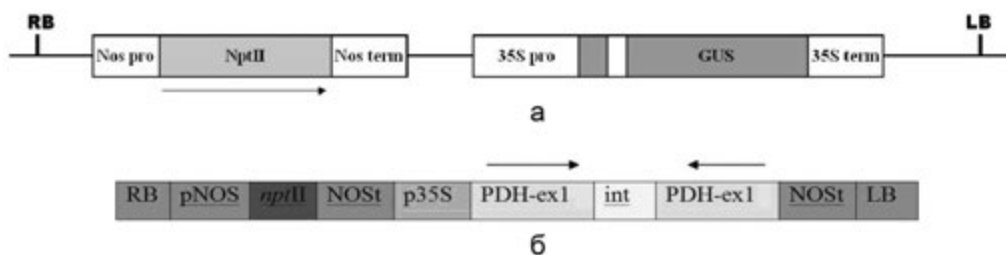


Рис. 1. Схема векторних конструкцій рСВ002 (а) та рВі2Е (б)

Таблиця 1. Частота отримання канаміцин-стійких регенерантів за *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації калюсних культур м'якої пшениці

Векторна конструкція	Кількість трансформованих калюсів, шт.	Кількість отриманих стійких калюсних ліній, шт.	Кількість канаміцин-стійких регенерантів	
			шт.	%
pCB002 (штам GV 2260)	800	55	21	2,6 ± 0,6
pVi2E (штам LBA 4404)	800	38	14	1,75 ± 0,5

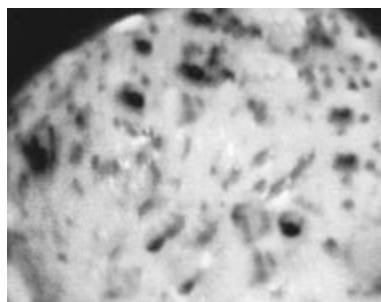


Рис.2. Експресія маркерного гена *gus* після *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації калюсних культур м'якої пшениці (21 доба після трансформації)

Із стійких калюсних культур, трансформованих за участі штаму GV 2260, було отримано 21 регенерант, а при використанні штаму LBA 4404 – 14. Тобто, частота отримання канаміцин-стійких рослин склала 2,6 та 1,75 % відповідно. Отримані дані свідчать про більшу чутливість калюсних культур пшениці сорту Подолянка до трансформації штамом GV 2260.

Більшість отриманих канаміцин-стійких регенерантів за дії селективного агенту характеризувались нормальним розвитком. Проте зустрічались рослини-мозаїки, що в тій чи

іншій мірі містили позбавлені хлорофілу тканини (рис. 3). На наш погляд, наявність таких регенерантів є свідченням того, що утворення пагона відбувається з групи клітин (з яких частина трансформується, а частина залишається незмінною) або того, що частина клітин з часом втрачає чужорідні гени.

У результаті проведеної роботи було отримано канаміцин-стійкі рослини озимої пшениці. Трансгенну природу регенерантів буде перевірено методом ПЛР.

Висновки

У ході роботи нами була проведена *Agrobacterium*-опосередкована трансформація морфогенних калюсів м'якої пшениці. Оптимізовано умови проведення генетичної трансформації. Показано, що найбільш оптимальною є концентрація агробактерій 0,2 опт. од., тривалість кокультивування калюсів з агробактерією протягом 3-х діб та використання антибіотика цефотаксиму у концентрації 250 мг/л. За таких умов 54 % калюсів зберігали морфогенний потенціал. Виявлено неоднакову чутливість сорту Подолянка до різних штамів/генетичних конструкцій, про що свідчить різна кількість отриманих канаміцин-стійких пагонів.

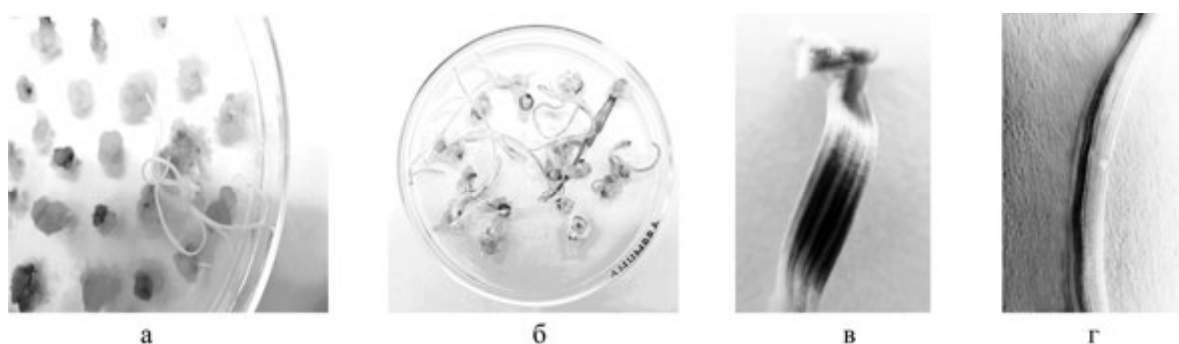


Рис. 3. *Agrobacterium*-опосередкована трансформація калюсних культур м'якої пшениці: а – регенерація пагона з нетрансформованої клітини; б – регенерація пагона з трансформованої клітини (збереження зеленого забарвлення); в, г – листок рослин-регенерантів з різним ступенем прояву мозаїцизму

Література

1. Potrykus I. Gene transfer to cereals: as assessment // *Biotechnology*. – 1990. – 8. – P. 535–542.
2. Potrykus I. Gene transfer to plants: assessment of published approaches and results // *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology (Annual Review of Plant Biology since 2002)*. – 1991. – 42. – P. 205–225.
3. Cheng M., Fry J., Pang S., Zhou H., Horinaka C., Duncan D., Conner T., Wan Y. Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens* // *Plant Physiol.* – 1997. – 115. – P. 971–980.
4. Peters N., Ackerman S. Davis E.A. A modular vector for *Agrobacterium*-mediated transformation of wheat // *Plant Molecular Biology Reporter*. – 1999. – 17. – P. 323–331.
5. Jones H., Wilkinson M., Doherty A., Wu H. High throughput *Agrobacterium* transformation of wheat: a tool for functional genomics, In: *Wheat production in stressed environments. Proceedings of the 7th International Wheat Conference, 27 November – 2 December 2005, Mar Del Plata, Argentina, H.T. Buck, J.E. Nisi & N. Salomon. (Ed.). – 2007. – P. 693–699.*
6. Jones H., Doherty A., Wu H. Review of methodologies and a protocol for the *Agrobacterium*-mediated transformation of wheat // *Plant methods*. – 2005. – 1, N 5.
7. Bhalla P.L., Ottenhof H.H., Singh, M.B. Wheat transformation – an update of recent progress // *Euphytica*. – 2006. – 149. – P. 353–366.
8. Opabode J.T. *Agrobacterium*-mediated transformation of plants: emerging factors that influence efficiency // *Biotechnology and Molecular Biology Review*. – 2006. – 1. – P. 12–20.
9. Kumlehn J., Hensel G. Genetic transformation technology in the triticeae // *Breeding Science*. – 2009. – 59. – P. 553–560.
10. Cheng M., Fry J., Pang S., Zhou H., Horinaka C., Duncan D., Conner T., Wan Y. Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens* // *Plant Physiol.* – 1997. – 115. – P. 971–980.
11. Dale P., Marks M., Brown M., Woolston C., Gunn H., Boulton M., Mullineaux P., Lewis D., Kemp J., Chen D., Gilmour D., Flavell R. Agroinfection of wheat: inoculation of in vitro grown seedlings and embryos // *Plant Sci.* – 1989. – 63. – P. 237–245.
12. Hess D., Dressler K., Nimrichter R. Transformation experiments by pipetting *Agrobacterium tumefaciens* into the spikelets of wheat (*Triticum aestivum* L) // *Plant Sci.* – 1990. – 72. – P. 233–244.
13. Chen D., Dale P. A comparison of methods for delivering DNA to wheat: the application of wheat dwarf virus DNA to seeds with exposed apical meristems // *Transgenic Res.* – 1992. – 1. – P. 93–100.
14. Mahalakshmi A., Khurana P. *Agrobacterium* mediated gene delivery in various tissues and genotypes of wheat (*Triticum aestivum* L) // *J Plant Biochem Biotechnol.* – 1995. – 4. – P. 55–59.
15. Гончарук О.М., Бавол А.В., Дубровна О.В. Морфогенетичний потенціал високопродуктивних сортів озимої пшениці в культурі апікальних меристем пагонів // *Фактори експериментальної еволюції організмів: Збірник наукових праць*. – Київ: Логос. – 2011. – 11. – С. 237–242.
16. Дубровна О.В., Бавол А.В., Зінченко М.О., Гончарук О.М., Лялько І.І. Вплив цефатоксиму на морфогенез у культурі апікальних меристем і зрілих зародків пшениці // *Физиология и биохимия культурных растений*. – 2012. – 44, № 3. – С. 218–224.

BAVOL A.V., DUBROVNA O.V., GONCHARUK O.M., VORONOVA S.S.

Institute of Plant Physiology and Genetics, NAS of Ukraine,

Ukraine, 03022, Kyiv, Vasylykivska str., 31/17, e-mail: bavoll@rambler.ru

AGROBACTERIUM-MEDIATED TRANSFORMATION OF WHEAT USING CALLI CULTURE

Aims. *Agrobacterium*-mediated transformation of morphogenic calli of wheat and optimization of stages of its implementation. **Methods.** For transformation we are use calli induced from apical meristems of 3-day seedlings. **Results.** Morphogenic calli of bread wheat (*Triticum aestivum* L.) cv Podolyanka were transformed using *Agrobacterium tumefaciens* strains carrying binary vector pCB002 (with the genes *gus* and *nptII*) or pBi2E (*pdh* genes and *nptII*). **Conclusions.** It is shown that the optimal conditions for transformation is: concentration of agrobacteria OD = 0.2, cocultivation period of calli and agrobacteria for 3 days and the use of antibiotic cefotaxime at a concentration of 250 mg/l. Under these conditions, 54 % of calli kept morphogenic potential. We found different sensitivity of cv Podolyanka to the *Agrobacterium* strains/genetic constructions.

Key words: *Triticum aestivum* L., *Agrobacterium*-mediated transformation, wheat.

УДК 633.16:224.234

БІЛИНЬСЬКА О.В.¹, ДУЛЬНІВ П.Г.²

¹ Інститут рослинництва ім. В.Я. Юр'єва НААН України,
Україна, 61060, м. Харків, проспект Московський, 142, e-mail: bilinska@ukr.net

² Інститут біоорганічної хімії і нафтохімії НАН України,
Україна, 02160, м. Київ, Харківське шосе, 50, e-mail: selit@ua.fm

ВПЛИВ ГЕЛЕУТВОРЮЮЧОГО КОМПОНЕНТА ЖИВИЛЬНОГО СЕРЕДОВИЩА НА ЕФЕКТИВНІСТЬ ОТРИМАННЯ ГАПЛОЇДІВ ЯЧМЕНЮ ЯРОГО (*HORDEUM VULGARE* L.) У КУЛЬТУРІ ПИЛЯКІВ *IN VITRO*

За масового одержання андрогенних ліній подвоєних гаплоїдів для прискорення селекційного процесу важливим завданням є забезпечення високої частоти регенерації рослин у якомога більшій кількості гібридних популяцій. Це досягається як за рахунок удосконалення технології гаплопродукційного процесу [1, 2], так і шляхом залучення гібридів, створених за участі чутливих до андрогенезу *in vitro* батьківських форм [3].

Оскільки найбільший регенераційний потенціал мають ембріоїди – біполярні структури із спряженим розвитком стеблових і кореневого апексів, що нагадують будовою зиготичні зародки [4], на стимулювання прямого ембріодогенезу чи утворення ембріогенного калюсу спрямовані головним чином дослідження з оптимізації режимів вирощування, попередньої обробки рослинного матеріалу та складу живильних середовищ для культивування пиляків і морфогенних структур мікроспоріального походження [5, 6].

Нами вперше встановлено позитивний вплив на ембріодогенез і регенерацію у культурі пиляків *in vitro* ярого ячменю заміни агар-агару на хімічно модифіковані крохмалі [7, 8], природні кукурудзяні крохмалі з підвищеним вмістом амілози, отримані з зерна ліній-носіїв рецесивних мутацій *ae* і *su*₂ [9, 10], та зернові крохмалі гороху [11]. Застосування цих гелеутворювачів є інноваційним елементом технології, який забезпечує більш повну реалізацію морфогенного потенціалу пилякової культури на тлі істотного зниження вартості живильного середовища, а отже і вартості кінцевого продукту – ліній подвоєних гаплоїдів.

Метою цього дослідження, проведеного в рамках програми зі створення вітчизняного гелеутворюючого компонента живильних середовищ з високими технологічними характеристиками і низькою вартістю, була оцінка ефективності використання у складі живильного середовища для культивування *in vitro* пиляків ячменю ярого удосконаленого

препарату хімічно модифікованого крохмалю Д-5аМ і визначення перспектив його застосування для масового отримання гаплоїдів.

Метеріали і методи

Методичні дослідження було проведено із залученням еталонних за здатністю до андрогенезу *in vitro* генотипів: лінії ячменю ярого ДГ00-126, якій притаманна висока здатність до продукування ембріодів і рослин-регенерантів, та сорту Фенікс з стабільно низьким рівнем прояву ознак культурабельності.

Для отримання андрогенних гаплоїдів було використано F₁ гібридів п'яти комбінацій схрещування нових сортів української селекції з лініями-носіями гена *ix*, дібраними за результатами цитологічного аналізу зрілого пилку, забарвленого розчином йоду, із зразка GSHO18288193444, наданого Національним центром генетичних ресурсів рослин України.

Рослини-донори пиляків вирощували у польових умовах. Вегетаційний період 2013 р. був вкрай несприятливим для росту і розвитку ячменю ярого і характеризувався практично повною відсутністю опадів у фазі сходи, кушіння, вихід у трубку. Збереження рослин і можливість проведення експериментів були забезпечені виключно за рахунок штучного поливу, починаючи з фази кушіння.

Добір колосся, попередню обробку і отримання асептичної культури здійснювали за власними методичними розробками [12]. Базове індукційне середовище, яке слугувало контролем, і середовище для отримання рослин-регенерантів [9] містили 0,8 % агар-агару «Difco» (США). У дослідних варіантах індукційного середовища агар-агар було замінено на хімічно модифікований крохмаль Д-5аМ, отриманий за удосконаленою технологією в Інституті біоорганічної хімії та нафтохімії НАНУ. Цей препарат було додано до живильного середовища у концентраціях 6,0 і 12,0 %.

Ефективність експериментального андрогенезу *in vitro* оцінювали за кількістю

морфогенних пиляків і зелених рослин-регенерантів у відсотках від загального числа культивованих пиляків. Експериментальні дані було оброблено за допомогою методів варіаційної статистики з використанням пакету програм Microsoft Office (Excel 2003).

Результати та обговорення

Дослідження показали, що хімічно модифікований крохмаль Д-5аМ мав покращені технологічні властивості порівняно з препаратом Д-5а [8]. Зокрема, він характеризувався утворенням більш рідкого клейстеру та наявністю більшої водоутримуючої здатності. Окрім того, з крохмалю Д-5аМ було отримано гель придатної для інокуляції пиляків щільності не лише у концентрації 12,0 %, й 6,0 %, хоча в остатньому випадку істотно збільшувалася тривалість гелеутворення.

Результати досліджень дають підставу для твердження про позитивний вплив двох концентрацій цього гелеутворювача на частоту

індукції морфогенних структур у обох генотипів, а у сорту Фенікс і на ефективність регенерації зелених рослин (рис. 1).

Зокрема, у лінії ДГ00-126 мало місце зростання кількості морфогенних пиляків на середовищі, яке містило 12,0 % крохмалю Д-5а-М, майже на 16 % за тенденції до збільшення цього показника на середовищі з меншою концентрацією препарату. У сорту Фенікс відмічено зростання кількості морфогенних пиляків в середньому на 10 %, і майже на таку ж величину збільшилася частота регенерації зелених рослин. Як і у раніше проведених експериментах з дослідження впливу природи гелеутворювача на ефективність індукції гаплоїдів ячменю ярого, мало місце проростання ембріодів на індукційному середовищі, хоча на середовищах, які містили крохмаль, цей процес відбувався менш інтенсивно, ніж на агаровому середовищі (рис. 2).

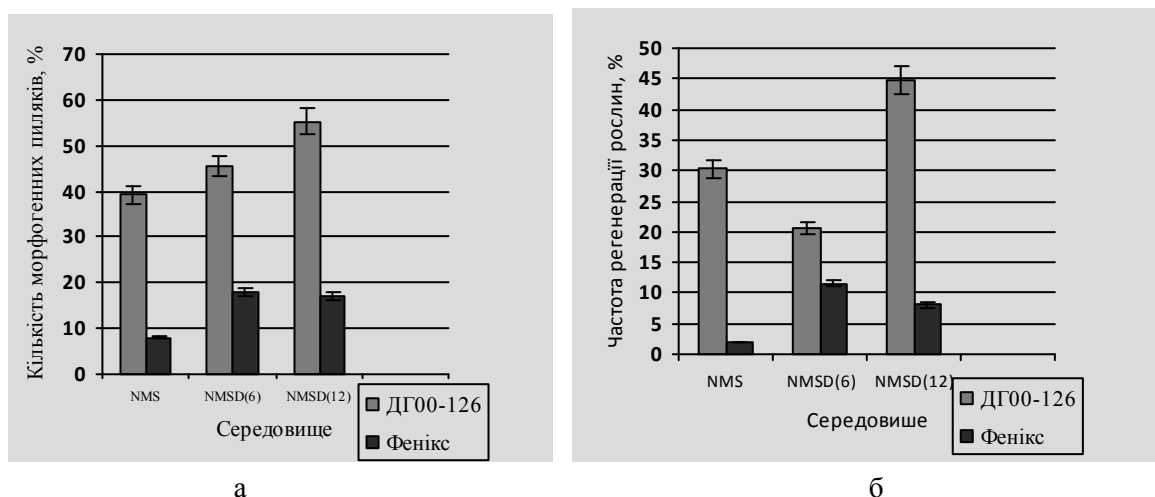


Рис. 1. Утворення морфогенних структур (а) і регенерація рослин (б) у культурі пиляків *in vitro* ячменю ярого на живильних середовищах, які містили в якості гелеутворювача: NMS – агар-агар (0,8%, «Difco», США); NMSD(6) – хімічно модифікований крохмаль Д-5аМ (6,0 %); NMSD (12) – хімічно модифікований крохмаль Д-5аМ (12,0 %)



Рис. 2. Утворення морфогенних структур і регенерація зелених рослин у культурі пиляків *in vitro* ячменю ярого залежно від природи гелеутворювача живильного середовища і його концентрації (позначення ті ж, що і на рис. 1)

У сорту Фенікс проростання ембріодів було відмічено лише на середовищі, яке містило 6,0 % крохмалю Д-5аМ. Переважна більшість рослин була отримана при перенесенні андрогенних структур на регенераційне середовище з агаром.

Зростання показників гаплопродукції на середовищі з крохмалем Д-5а було підтверджено на гібридному матеріалі. Як свідчить аналіз результатів, узагальнених у таблиці, за меншої кількості висаджених пиляків у дослідному варіанті було отримано однакову або більшу кількість рослин, ніж у контролі. Середня частота морфогенних пиляків зростає з $(29,89 \pm 0,96) \%$ до $(38,05 \pm 1,49) \%$. При цьому лише в одній комбінації за цим показником перевищення було істотним, а в інших, за винятком комбінації схрещування GSHO-2(их) / Модерн, виявлено очевидну тенденцію до збільшення інтенсивності андрогенезу *in vitro* під впливом крохмалю.

За основним показником ефективності пилякової культури – частотою регенерації зелених рослин – істотну різницю відмічено у всіх комбінаціях за винятком GSHO-4(их) / Модерн. Середня частота регенерації зелених рослин на середовищі з хімічно модифікованим крохмалем становила $(16,62 \pm$

$1,14) \%$, що було на 10% вище, ніж у контролі. Максимальний вихід морфогенних пиляків $(57,62 \pm 2,88) \%$ і зелених рослин-регенерантів $(31,52 \pm 2,70) \%$ отримано у комбінації схрещування GSHO-5(их) / ДГ00-126, де батьківською формою слугувала чутлива до андрогенезу *in vitro* лінія (табл.).

Особливістю гібридів, залучених до експерименту, була присутність у їх родоводі сортів Вакула, Модерн і лінії ДГ00-126, які мають високу здатність до андрогенезу *in vitro* (у сорту Модерн було отримано на середовищі з крохмалем Д-5а більше 70, а у ДГ00-126 біля 90 зелених рослин-регенерантів на 100 культивованих пиляків), та ліній-носіїв гена *их*, дібраних із низько чутливого до процедури культивування пиляків зразка. Високі донорські властивості щодо кількості морфогенних пиляків і регенерації рослин зберегла лише лінія ДГ00-126. У комбінаціях схрещування з сортами Вакула і Модерн мало місце домінування низької здатності до регенерації зелених рослин *их*-ліній, що свідчить про різнонаправлене домінування та необхідність створення донорів гена *их* з високою здатністю до андрогенезу *in vitro* з метою їх подальшого використання у програмах галлоїдної селекції на поліпшену якість зерна.

Таблиця. Здатність до андрогенезу *in vitro* ячменю ярого в залежності від природи гелеутворювача індукційного живильного середовища і гібридної комбінації (2013 р.)

Комбінація схрещування	Гелеутворювач	Висаджено пиляків, шт.	Отримано			
			морфогенних пиляків		зелених рослин-регенерантів	
			шт.	%	шт.	%
F ₁ GSHO-4 (их) / Вакула	агар-агар	464	106	22,84±1,95	16	3,45±0,85
	Д-5аМ	144	47	32,64±3,91	17	11,81±2,68*
F ₁ GSHO-5(их) / ДГ00-126	агар-агар	407	166	40,79±2,44	58	14,25±1,73
	Д-5аМ	295	170	57,62±2,88**	93	31,52±2,70**
F ₁ GSHO-2(их) / Модерн	агар-агар	398	140	35,18±2,39	26	6,53±1,24
	Д-5аМ	110	31	28,18±4,29	20	18,18±3,68*
F ₁ Модерн /GSHO-2(их)	агар-агар	609	178	29,23±1,84	36	5,91±0,95
	Д-5аМ	248	80	32,64±2,98	32	12,90±2,13*
F ₁ GSHO-4(их) / Модерн	агар-агар	393	89	22,64±2,11	16	4,07±1,00
	Д-5аМ	262	75	28,63±2,79	14	5,34±1,39
Всього	агар-агар	2271	679	—	152	—
	Д-5аМ	1059	403	—	176	—
Середнє	агар-агар	—	—	29,89±0,96	—	6,69±0,52
	Д-5аМ	—	—	38,05±1,49*	—	16,62±1,14**

Примітки:

- *різниця істотна при $P \leq 0,05$; ** різниця істотна при $P \leq 0,01$;
- базовим слугувало середовище NMSмод2. Середовища містили 0,8 % агар-агару «Difco» (США) і 12,0 % хімічно модифікованого крохмалю Д-5аМ.

Загалом за культивування 3330 пиляків, вилучених з колосся F₁ гібридів п'яти комбінацій схрещування, отримано 328 нормально пігментованих рослин-регенерантів, які вирощено до фази повної стиглості в умовах штучного клімату для одержання насіннєвого потомства.

Трудові затрати щодо інокуляції на живильне середовище такої кількості пиляків становили 3 робочі дні одного працівника.

Висновки

Хімічно модифікований крохмаль Д-5аМ має поліпшені порівняно з препаратом Д-5а

технологічні характеристики, зокрема, утворений ним гель має кращі водоутримуючу здатність та структурно-механічні властивості. Крохмаль Д-5аМ в разі його використання у складі живильного середовища для культивування *in vitro* пиляків ячменю ярого стимулює прямий ембріодогенез і підвищує частоту регенерації рослин. Препарат є перспективним для використання у біотехнології рослин як значно дешевший та ефективніший за агар-агар гелеутворювач живильного середовища для культури пиляків *in vitro* ячменю ярого.

Література

1. Kuhlmann U., Foroughi-Wehr B. Production haploid in frequencies sufficient for barley breeding programs // *Plant Cell Rept.* – 1989. – 8. – P. 78–81.
2. Devaux P., Kasha K.J. Overview of barley doubled haploid production // *Advances in haploid production in high plants* / Ed. A. Touraev, B.P. Forster, S.J. Mohan. Springer Science+Business Media, 2009. – P. 47–64.
3. Foroughi-Wehr B., Friedt W., Wenzel G. On the genetic improvement of androgenetic haploid formation in *Hordeum vulgare* L. // *Theor. Appl. Genet.* – 1982. – 62. – P. 233–239.
4. Батыгіна Т.Б. Хлебное зерно / Отв. ред. М.С. Яковлев. – Л.: Наука, 1987. – 103 с.
5. Sorvari S. The effect of starch gelatinized nutrient media in barley anther culture // *Annales Agr. Finnie.* – 1986. – 25. – P. 127–133.
6. Manninen O. Optimizing anther culture for barley breeding // *Agricultural and food Science in Finland.* – 1998. – 6. – P. 389–398.
7. 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. – 39, № 2. – С. 136–143.
8. Белинская Е.В., Дульнев П.Г. Особенности морфогенеза в культуре *in vitro* пыльников ярового ячменя на средах с химически модифицированными крахмалами // *Физиология и биохимия культурных растений.* – 2012. – 44, № 5. – С. 440–448.
9. Белинская Е.В., Тымчук С.М., Дульнев П.Г., Дерезинова О.Ю. Использование высокоамилозного крахмала в питательной среде для культивирования пыльников ячменя // *Физиология и биохимия культурных растений.* – 2009. – 41, № 6. – С. 539–546.
10. Білинська О.В. Застосування кукурудзяних крохмалів з підвищеним вмістом амілози (мутації *ae* і *su*₂) у складі штучного живильного середовища для одержання гаплоїдів ярого ячменю у культурі пиляків *in vitro* // *Вісник Харківського національного університету ім. В. Н. Каразіна. Серія: біологія.* – 2010. – Вип. 11 (№ 905). – С. 60–65.
11. Білинська О.В., Тимчук С.М., Дерезинова О.Ю. Штучне живильне середовище для отримання гаплоїдів ячменю у культурі пиляків *in vitro*. Патент України на винахід № 103426 від 10.10.2013. Бюл. № 19.
12. Білинська О.В. Генотипові особливості індукції гаплоїдів ячменю (*H. vulgare* L.) методом культури пиляків *in vitro*: Автореф. дис. канд. біол. наук. – Харків, 1997. – 19 с.

BILYNSKA O.V.¹, DULNYEV P.G.²

¹ *Yurjev Plant Production Institute of National Academy of Agricultural Sciences of Ukraine, Ukraine, 61060, Kharkiv, Moskovsky av., 142, e-mail: bilinska@ukr.net*

² *Institute of bioorganic and oil chemistry of National Academy of Sciences of Ukraine, Ukraine, 02160, Kyiv, Kharkivske h., 50, e-mail: selit@ua.fm*

EFFECT OF MEDIUM GELATINIZED COMPONENT ON THE EFFICIENCY OF SPRING BARLEY (*HORDEUM VULGARE* L.) HAPLOID PRODUCTION IN ANTHER CULTURE *IN VITRO*

Aims. Nutrient media for plant cell, tissue and organ culture include numerous substances of different chemical nature and biological activity. Among them gelatinized component of solid media presented as a rule by agar isn't considered to be the most decisive factor of morphogenesis *in vitro* promotion. However, it was demonstrated very interesting effect of starch solidified media to stimulate a direct embryoidogenesis

and improve plant regeneration in barley anther culture *in vitro*. Investigations aimed to evaluate the efficiency of agar substitution for new preparation of chemically modified starch D-5aM in medium for spring barley haploid production in anther culture *in vitro*. **Methods.** Plants were grown under field conditions. Anthers were isolated from spikes of F₁ hybrids of five combinations and two model genotypes. Inductive media were differed by gelling component. Control contained agar, two experimental variants included chemically modified starch D-5aM at two concentrations. **Results.** There has been conformed positive effect of agar substitution for less costly chemically modified starch on direct embryo formation and regeneration efficiency. It was revealed that lower concentration of starch decrease regeneration frequency in high responsive genotype and at the same time increased that one in cultivar possessing low androgenic capacity. **Conclusions.** Obtained data indicate advantage of chemically modified starch in comparison with agar. Perspective preparation D-5aM is recommended for application in plant biotechnology. **Key words:** *Hordeum vulgare* L., barley, anther culture *in vitro*, nutrient media, agar, chemically modified starch, morphogenesis.

УДК 633.791:575.113

ВЕНГЕР А.М., ВОЛКОВА Н.Е.

Селекційно-генетичний інститут – Національний центр насіннєзнавства та сортовивчення, Україна, 65036, м. Одеса, вул. Овідіопольська дорога, 3, e-mail: venger87@ukr.net

ІДЕНТИФІКАЦІЯ ТИПУ СОРТУ ХМЕЛЮ ЗВИЧАЙНОГО ЗА МОЛЕКУЛЯРНИМИ МАРКЕРАМИ ГЕНІВ, ЩО КОДУЮТЬ ХАЛКОНСИНТАЗИ

Хмель звичайний *Humulus lupulus* L. – важлива сільськогосподарська культура, що використовується у харчовій, медичній та парфумерній галузях. Господарське значення хмелю звичайного обумовлене в більшій мірі наявністю в шишках гірких α - і β -кислот та ароматичних речовин – пренілфлавоноїдів. Синтез даних речовин каталізується ферментами халконсинтазами. У хмелю звичайного відомо п'ять халконсинтаз – халконсинтаза 1 (CHS_{H1}), халконсинтаза 2 (CHS₂), халконсинтаза 3 (CHS₃), халконсинтаза 4 (CHS₄) та валерофенонсинтаза (VPS), що кодуються генами *chs_H1*, *chs2*, *chs3*, *chs4* та *vps*, відповідно [1].

При визначенні типу сорту хмелю (гіркий або ароматичний) використовують кількість гірких кислот (табл.) та ефірної олії. Пренілфлавоноїди та α - і β -кислоти не є прекурсорами ефірної олії, проте рівень α - і β -смол (похідних α - і β -кислот) прямо пов'язаний з рівнем ефірної олії [2]. Визначення рівня α - та β -кислот проводиться методами газової та

високоєфективної рідинної хроматографії, яка є дорогою та довготривалою процедурою [3].

Незважаючи на значний обсяг молекулярно-генетичних досліджень геному хмелю з використанням різних видів ДНК-маркерів, огляд літератури показав відсутність робіт, присвячених розробці молекулярних маркерів для ідентифікації типу сорта. Тому мета даної роботи полягала в оцінюванні можливості ідентифікації типу сорта за молекулярними маркерами генів *chs_H1*, *chs2*, *chs3*, *chs4* та *vps* хмелю звичайного.

Матеріали і методи

Матеріалом досліджень слугували 20 сортів хмелю звичайного селекції Інститута сільського господарства Полісся НААН, для яких визначено тип сорту: гіркі сорти – Альта, Зміна, Ксанта, Кумир, Надія, Назарій, Оболонський, Поліський, Промінь, Чаклун; ароматичні сорти – Видибор, Гайдамацький, Житомирський 75, Заграва, Клон 18, Оскар, Пивовар, Полісянка, Славянка, Хмелеслав.

Таблиця. Біохімічні критерії визначення типу хмелю [2]

Показник	Тип сорту	
	ароматичний	гіркий
Масова доля когумолону в складі α -кислот, %	< 30	> 30
Масова доля колупулону в складі β -кислот, %	< 50	> 50
Співвідношення кількості β -кислот до α -кислот, %	> 0,9	< 0,7

Результати молекулярно-генетичного аналізу поліморфізму генів *chs_H1*, *chs2*, *chs3*, *chs4* та *vps* (довжини продуктів ампліфікації у п.н.) у вибірці вищенаведених сортів отримано нами у попередніх дослідженнях[4–6].

Кластерний аналіз даних молекулярно-генетичного аналізу проводили за допомогою програми MEGA5 незваженим парногруповим методом з арифметичним усередненням (UPGMA) [7].

Достовірність перевіряли за допомогою коефіцієнту рангової кореляції Спірмана [8] для малих вибірок:

$$r = 1 - 6(\sum d^2 / (n^3 - n)),$$

де r – коефіцієнт кореляції рангів, d – квадрат різниці між рангами, n – кількість ознак, що брали участь у ранжуванні. Якщо серед значень X (тип сорту – гіркий або ароматичний) та значень Y (значення маркерів) зустрічається декілька однакових, утворюються пов'язані ранги, тобто однакові середні номери. У таких випадках коефіцієнт Спірмана обраховували за формулою:

$$r = 1 - 6(\sum d^2 - A - B / (n^3 - n - 12A)(n^3 - n - 12B)),$$

де $A = \sum(A_j^3 - A_j)/12$; $B = \sum(B_k^3 - B_k)/12$, j – номери зв'язок по порядку для ознаки X ; A_j – число однакових рангів в j -й зв'язці для ознаки X ; k – номери зв'язок по порядку для значення Y ; B_k – число однакових рангів в k -й зв'язці для значення Y .

Для того, щоб на рівні значущості α перевірити нульову гіпотезу про дорівнювання нулю коефіцієнта рангової кореляції Спірмана

H_0 ; $r = 0$ при конкуруючій гіпотезі H_1 ; $r \neq 0$, обраховували критичну точку:

$$T_{kr} = t(\alpha, k) \sqrt{\frac{1 - r^2}{n - 2}},$$

де n – об'єм вибірки; r – вибірковий коефіцієнт рангової кореляції Спірмана; $t(\alpha, k)$ – критична точка двосторонньої критичної області, яку знаходять по таблиці критичних точок Ст'юдента, за рівнем значущості α та числу ступенів свободи $k = n - 2$.

Якщо $|r| < T_{kr}$ – нульова гіпотеза підтверджується. Ранговий кореляційний зв'язок між ознаками незначущий. Якщо $|r| > T_{kr}$ – нульова гіпотеза не підтверджується, ранговий кореляційний зв'язок між ознаками значущий.

Довірчий інтервал обраховували за формулою:

$$r \pm t((1 - r^2) / \sqrt{n});$$

Результати і обговорення

Для кластерного аналізу використовували сумарні дані молекулярно-генетичних досліджень поліморфізму інтрону, 3'-нетрансльованого регіону та екзону 2 гена *chs_H1*; інтронів генів *chs2*, *chs3*, *chs4*; промотора та локуса, що складається з екзона 1, інтрона та екзона 2, гена *vps* сортів хмелю звичайного української селекції. Результат кластерного аналізу відображений на рис.

Дендрограма містить два кластери (I і II). До кластеру I увійшли всі гіркі сорти, до кластеру II – всі ароматичні.

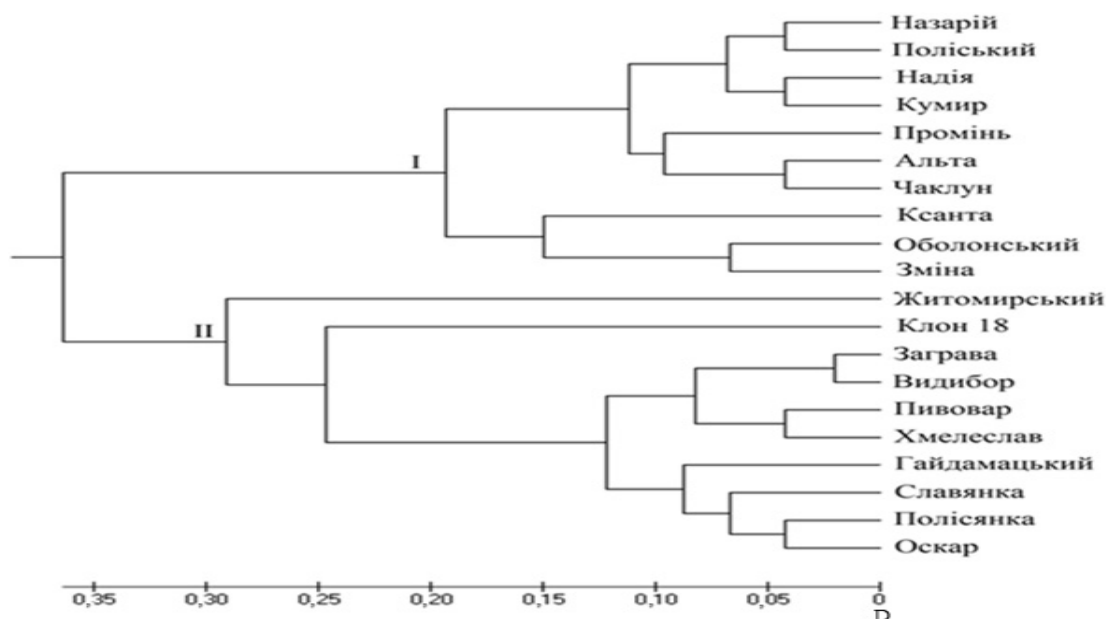


Рис. Дендрограма, побудована за результатом кластерного аналізу поліморфізму генів *chs_H1*, *chs2*, *chs3*, *chs4* та *vps* сортів хмелю звичайного української селекції. I і II – кластери

Значення критичної точки $T_{кр}$ складає 0,190, значення коефіцієнта Спірмана r складає 0,881.

$|r| > T_{кр}$ ($0,881 > 0,19$), це означає, що нульова гіпотеза не підтверджується; ранговий кореляційний зв'язок між ознаками значущий. Довірчий інтервал r був (0,79; 0,97).

Таким чином, зв'язок між показником «тип сорту» (гіркий або ароматичний) та поліморфізмом певних регіонів генів *chs_H1*, *chs2*, *chs3*, *chs4* та *vps* хмелю звичайного є прямим, значущим та в межах довірчого інтервалу.

Слід зазначити, що кластерний аналіз даних молекулярно-генетичних досліджень поліморфізму окремих регіонів генів *chs_H1*, *chs2*, *chs3*, *chs4* та *vps* та поліморфізму окремих сортів та їх поєднань не призвів до угруповання сортів за типом. Чітка кластеризація за типом здійснилась тільки при використанні сумарних

даних щодо поліморфізму всіх досліджених генів. Це означає, що для синтезу певних кількостей когумолону, колуполону та отримання певного співвідношення β - і α -кислот, що призводить до формування показника «тип сорту», важливим є алельний стан всіх генів, що кодують халконсинтази, *chs_H1*, *chs2*, *chs3*, *chs4* та *vps*.

Висновки

Встановлено зв'язок між поліморфізмом генів *chs_H1*, *chs2*, *chs3*, *chs4* та *vps*, що кодують халконсинтази, та показником «тип сорту». Показано можливість використання молекулярних маркерів, за допомогою яких виявлено поліморфізм вищенаведених генів, для ідентифікації ароматичного або гіркого типу сорту. Розроблений підхід ідентифікації типу сорту хмелю за молекулярними маркерами. є статистично достовірним, не є дорогою і довготривалою процедурою.

Література

1. Austin M.B., Noel J.P. The chalcone synthase superfamily of type III polyketide synthases // Natural Product Reports. – 2003. – 20. – P. 79–110.
2. Ляшенко Н.И., Михайлов Н.Г., Рудык Р.И. Физиология и биохимия хмелю. – Житомир: «Полісся», 2004. – С. 405.
3. Patzak J., Nesvadba V., Hencychova A., Krofta K. Assessment of the genetic diversity of wild hops (*Humulus lupulus* L.) in Europe using chemical and molecular analyses // Biochemical Systematics and Ecology. – 2010. – 38. – P. 136–145.
4. Венгер А.М., Волкова Н.Е., Сиволап Ю.М. Молекулярно-генетичний поліморфізм гена *chs_H1* у сортів хмелю звичайного української селекції // Цитологія і генетика. – 2014 (у друці).
5. Венгер А.М., Волкова Н.Е. Молекулярно-генетичний поліморфізм генів *chs2*, *chs3*, *chs4* у сортів хмелю звичайного української селекції // Вісник Запорізького національного університету. – 2014 (у друці).
6. Venger A., Volkova N. Molecular-genetic polymorphism of *vps* gene in Ukrainian hop varieties // Modern science. – 2014 (у друці).
7. Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods // Molecular Biology and Evolution. – 2011. – 28, N 10. – P. 2731–2739.
8. Spearman C. The proof and measurement of association between two things // Amer. J. Psychol. – 1987. – 100, N 3–4. – P. 441–471.

VENGER A.M., VOLKOVA N.E.

Plant Breeding and Genetics Institute – National center of seed and cultivar investigation, Ukraine, 65036, Odesa, Ovidiopol's'ka doroga str., 3, e-mail: venger87@ukr.net

IDENTIFICATION OF HOP TYPE BY MOLECULAR MARKER OF CHALCONE SYNTHASE ENCODED GENES

Aims. Hop *Humulus lupulus* is a commercial important plant in Ukraine. The primary commercial application of the hop plants has been in the beer brewing industry. Most important substances from hop are bitter acids. Depending on level of bitter acids hop varieties derive in aroma and bitter. The purpose of present work was to study the possibility of hop types identification according to polymorphism of *chs_H1*, *chs2*, *chs3*, *chs4* and *vps* genes in sampling of 20 Ukrainian hop varieties. **Methods.** Cluster analysis of hop type varieties was derived by analysis of gene polymorphism using UPGMA. Reliable was calculated by Spearman coefficient. **Results.** The cluster analyses of 20 Ukrainian hop varieties based on gene polymorphism data resulted in pure differentiation of studied varieties into bitter and aroma clusters. **Conclusions.** Dependence between *chs_H1*, *chs2*, *chs3*, *chs4* and *vps* genes polymorphism and type of hop

variety was shown. The method of type identification of hop varieties by molecular markers was developed. The elaborated method is statistically reliable and does not need much time or expensive reagents.
Key words: *Humulus lupulus*, gene polymorphism, molecular markers, aroma and bitter varieties.

УДК 577.2:58.036.5:633.11

ГАЛАЕВА М.В., ФАЙТ В.И., ГАЛАЕВ А.В., ФЕДОРОВА В.Р., СИВОЛАП Ю.М.

Селекционно-генетический институт – Национальный центр семеноведения и сортоизучения, Украина, 65036, м. Одесса, Овидиопольская дорога, 3, e-mail: mariagall@rambler.ru

МОРОЗОСТОЙКОСТЬ РЕКОМБИНАНТНО-ИНБРЕДНЫХ ЛИНИЙ ПШЕНИЦЫ И ЕЕ СВЯЗЬ С АЛЛЕЛЯМИ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ ЛОКУСОВ

Пшеница мягкая озимая – одна из наиболее распространенных злаковых культур в мире. Достаточный уровень зимо- и морозостойкости определяет стабильность урожая озимых культур и ареал распространения конкретного сорта. В суровые зимы на территории Украины наблюдается значительная гибель посевов пшеницы озимой, а на уцелевших площадях отмечены различные не летальные повреждения растений, которые приводят к резкому снижению урожая. Поэтому создание сортов озимой мягкой пшеницы с высоким генетически обусловленным уровнем морозостойкости – одна из важных задач селекции в Украине [1, 2].

Привлечение молекулярно-генетических методов помогает идентифицировать и отбирать в процессе селекции генотипы с необходимыми генами. Использование указанных методов позволяет выявить специфические фрагменты ДНК, тесно сцепленные с определенными генами морозостойкости. С помощью молекулярных маркеров на длинных плечах хромосом пятой гомеологической группы локализованы главные гены морозостойкости, а именно, гены *Fr-A1* и *Fr-A2* на хромосоме 5A, *Fr-B1* – на 5B и *Fr-D1* – на 5D [3, 4]. Большая часть маркеров к указанным генам были получены с помощью достаточно трудоемкого ПДРФ-анализа, а ПЦР-маркеры не были эффективными для сортов украинской селекции. Возникла необходимость в поиске новых ПЦР маркеров к генам морозостойкости у украинских сортов пшеницы.

В наших предыдущих исследованиях был проведен анализ морозостойкости и микросателлитный анализ популяций пшеницы мягкой озимой и установлена связь аллельных различий ряда локусов с уровнем морозостойкости пшеницы [5, 6]. Настоящее исследование является продолжением

указанных работ. Его цель – анализ рекомбинантно-инбредных линий F₇ пшеницы мягкой озимой Лузановка одесская/Одесская красноколосая по аллелям микросателлитных (МС) локусов хромосом пятой гомеологической группы и оценка связи аллельных различий МС-локусов с морозостойкостью пшеницы.

Материалы и методы

Материалом для исследований служили родительские формы и 101 рекомбинантно-инбредная линия (РИЛ) F₇ комбинации скрещивания Лузановка одесская/Одесская красноколосая. Лузановка одесская относится к группе сортов с уровнем морозостойкости «выше среднего», а Одесская красноколосая имеет относительно «низкий» уровень морозостойкости.

Оценку морозостойкости РИЛ проводили с помощью искусственного промораживания проростков и растений в фазе кушения согласно методике [7]. Промораживание проростков осуществляли трижды в течение 2008 года при –12 °С.

Для определения морозостойкости растений в фазе кушения семена РИЛ высевали в октябре 2010 и 2011 на трехрядных участках длиной 1 м по 50 зерен на рядок с площадью питания отдельного растения 30x2 см². В I декаде февраля и I декаде марта 2011 года и I декаде января 2012 года с поля отбирали по 25–85 растений каждой линии и промораживали при температуре –16 °С.

ПЦР с направленными праймерами проводили на термоциклере «Терцик» («ДНК-технология», Россия). Реакционная смесь содержала буфер (67 мМ трис-НCl pH 8,8; 16,6 мМ (NH₄)₂SO₄; 1,5 мМ MgCl₂; 0,01% Tween-20); 0,2 мМ каждого dNTP; 0,25 мкМ праймера; 20 нг ДНК; 1 ед. Taq-полимеразы. Условия реакции – 35 циклов: денатурация при 94 °С – 30 с (начальная – 2 мин), отжиг при 55 °С, 58 °С,

60 °С, 62 °С (в зависимости от праймеров) – 30 с, элонгация при 72 °С – 1 мин, заключительная элонгация – 4 мин. Анализ ДНК сортов и РИЛ F₇ проводили с помощью праймеров к микросателлитным локусам, локализованным на хромосомах пятой группы: *Xbarc117-5A*, *Xwmc75-5B*, *Xwmc289-5B*, *Xgprw3191-5B*, *Xwmc289-5D*, *Xcfd57-5D*, *Xgprw303-5D*. Продукты амплификации фракционировали в 2% агарозном геле и 12% полиакриламидном геле в 1хТВЕ.

Статистическую обработку полученных результатов проводили по общепринятым методикам [8].

Результаты и обсуждение

Уровень морозостойкости популяции РИЛ F₇ Лузановка одесская/Одесская красноколосая был достаточно высоким (66–86 %) и при промораживании проростков несколько большим, чем при промораживании растений в фазе кущения (табл. 1). Морозостойкость популяции в фазе кущения в 2011 году не зависела от времени отбора растений в поле ($t = 0,76$, при $t_{0,05} = 1,96$) и равнялась 69 % живых растений в I декаде февраля и 66 % – в I декаде марта. Размах варьирования отдельных линий в феврале составлял 87%, а в марте, в силу уменьшения общего уровня морозостойкости растений в конце зимы, возрастал до 100 %.

Морозостойкость популяции РИЛ Лузановка одесская/Одесская красноколосая в январе 2012 составила 78 % , что на 9–12 % выше морозостойкости популяции в феврале и марте 2011 года ($t = 2,87$ и $t = 3,63$, соответственно). Указанные существенные различия по морозостойкости могут быть обусловлены разными условиями выращивания и закалывания растений в поле в 2011 и 2012 годах.

При использовании праймеров к 7 МС-локусам хромосом пятой гомеологической группы, которые могут быть сцеплены с генами морозостойкости, выявлен полиморфизм ДНК сортов Лузановка одесская и Одесская красноколосая по трем из них, а именно *Xbarc 117-5A*, *Xwmc75-5B* и *Xgprw3191-5B* (табл. 2). Продукты амплификации ДНК сортов Лузановка одесская и Одесская красноколосая при использовании праймеров к локусам *Xwmc289-5B*, *Xwmc289-5D*, *Xcfd57-5D* та *Xgprw303-5D* были идентичными.

В дальнейшем был проведен анализ ДНК 101 РИЛ F₇ Лузановка одесская/Одесская

красноколосая по полиморфным микросателлитным локусам *Xbarc 117-5A*, *Xwmc75-5B* и *Xgprw3191-5B*. ДНК-маркеры, как правило, проявляют менделеевский характер расщепления [9]. При различиях родительских сортов по двум аллелям одного локуса и отсутствии селективного преимущества в F₇ должно наблюдаться расщепление линий в соотношении 49,7 линий с аллелем одной родительской формы, 1,6 линий с аллелями обеих родителей и 49,7 линий с аллелем второй родительской формы (табл. 3). Соотношение расщепления по аллелям локусов *Xwmc75-5B* и *Xgprw3191-5B* соответствовало теоретически ожидаемому (табл. 3). Величины критерия соответствия χ^2 для указанных локусов составили 3,67 и 2,12, соответственно, что достоверно меньше $\chi^2_{0,05} = 5,99$ для $df = 2$. Расщепление по аллелям локуса *Xbarc 117-5A* не соответствовало теоретически ожидаемому ($\chi^2 = 12,39$). Такое отклонение с вероятностью 9–24% может быть обусловлено случайными причинами, 5–20 % – расположением локуса на конце группы сцепления и 60–82 % – в определенных горячих точках хромосом, которые связаны с наличием чужеродных транслокаций [10].

Сопоставление двух групп линий-носителей альтернативных аллелей (гетерозиготные линии не учитывали) по каждому из полиморфных локусов позволило выявить достоверные аллельные различия по морозостойкости для локуса *Xgprw3191-5B* (табл. 4). Линии-носители аллеля 178 п.н. от более морозостойкого сорта Лузановка одесская характеризовались более высокой морозостойкостью проростков по сравнению с линиями-носителями аллеля 236 п.н. менее морозостойкого сорта Одесская красноколосая при всех трех промораживаниях. В первом случае аллельные различия составили 12 %, во втором – 17 %, в третьем – 10 %, при размахе варьирования между линиями в популяции по указанному признаку 96, 98, 91 %, соответственно. Следовательно, 12,5 % фенотипического разнообразия популяции по морозостойкости проростков рекомбинантно-инбредных линий F₇ Лузановка одесская/Одесская красноколосая в первом опыте связаны с аллельными различиями по локусу *Xgprw3191-5B*, во втором и третьем опыте – 17,3 и 11,0 % соответственно.

Таблица 1. Основные статистические показатели морозостойкости (%) популяции РИЛ F₇ Лузановка одесская/Одесская красноколосая на стадии проростков (I; -12 °С) и растений в фазе кущения (II; -16 °С)

Опыт		$\bar{x} \pm S\bar{x}^*$	N	min	max	y	CV
Проростки	1	73 ± 2,2	100	3	99	21,9	30
	2	81 ± 2,4	100	2	100	24,2	30
	3	86 ± 2,0	100	9	100	19,8	23
Кущение	Февраль 2011	69 ± 2,7	75	11	98	23,0	33
	Март 2011	66 ± 2,9	67	0	100	23,9	36
	Январь 2012	78 ± 1,6	99	21	100	15,7	20

Примечание: * $\bar{x} \pm S\bar{x}$ – среднее значение показателя ± стандартная ошибка, N – количество линий, min – минимальное значение показателя, max – максимальное значение показателя, y – стандартное отклонение, CV – коэффициент вариации.

Таблица 2. Генотипы сортов Лузановка одесская и Одесская красноколосая по аллелям (количество п.н.) микросателлитных локусов пятой группы хромосом

Сорт	Локус						
	<i>Xbarc</i> 117-5A	<i>Xwmc</i> 75-5B	<i>Xwmc</i> 289-5B	<i>Xwmc</i> 289-5D	<i>Xcfd</i> 57-5D	<i>Xgpw</i> 303-5D	<i>Xgpw</i> 3191-5B
Лузановка одесская	224	210	198	164	291	105	178
Одесская красноколосая	230	190	198	164	291	105	236

Таблица 3. Соотношение расщепления по аллелям полиморфных микросателлитных локусов популяции РИЛ F₇ Лузановка одесская/Одесская красноколосая

Аллели сорта	Теоретически ожидаемое	Фактически полученное		
		<i>Xbarc</i> 117-5A	<i>Xwmc</i> 75-5B	<i>Xgpw</i> 3191-5B
Лузановка одесская	49,7	46	49	54
Обоих родителей	1,6	6	4	0
Одесская красноколосая	49,7	49	48	47
χ^2		12,39	3,67	2,12

В то же время, при промораживании растений в фазе кущения при -16 °С в феврале 2011 года наблюдали противоположную закономерность. Морозостойкость линий с аллелем 236 п.н. от сорта Одесская красноколосая по локусу *Xgpw3191-5B* была выше на 12,6 % таковой линий-носителей аллеля 178 п.н. от сорта Лузановка одесская. Аналогичную тенденцию отмечали и при промораживании растений в фазе кущения в

марте 2011 и январе 2012 годов. Различия по морозостойкости между группами линий с альтернативными аллелями локуса *Xgpw3191-5B* в данных двух случаях оказались не достоверными. Изменения рангов генотипов-носителей альтернативных аллелей одного локуса при промораживании разновозрастных растений (проростки, фаза кущения) были отмечены ранее [11, 12] и, вероятно, связаны с изменениями условий закаливания растений.

Таблица 4. Морозостойкость групп РИЛ F₇ Лузановка одесская/Одесская красноколосая – носителей альтернативных аллелей локусов *Xbarc 117-5A*, *Xwmc75-5B* и *Xgprw3191-5B* на стадии проростков (-12 °C) и растений в фазе кущения (-16 °C), % живых растений

Локус	Аллель	Проростки			Кущение		
		1	2	3	Февраль 2011	Март 2011	Январь 2012
<i>Xbarc117-5A</i>	224 п.н. Л	76	85	89	68	66	77
	230 п.н. О	71	77	85	71	67	80
НСР _{0,05}		-	-	-	-	-	-
<i>Xwmc75-5B</i>	210 п.н. Л	75	84	88	70	68	79
	190 п.н. О	71	77	84	68	66	79
НСР _{0,05}		-	-	-	-	-	-
<i>Xgprw3191-5B</i>	Л	79	89	91	64	62	78
	О	67	72	81	75	70	79
НСР _{0,05}		8	9	7	10	-	-

Выводы

Выявлен полиморфизм по аллелям трех из семи МС-локусов пятой группы хромосом *Xbarc 117-5A*, *Xwmc75-5B* и *Xgprw3191-5B* различающихся по морозостойкости сортов Лузановка одесская и Одесская красноколосая, а также 101 РИЛ F₇, полученных от скрещивания указанных сортов. Аллельные различия локуса *Xgprw3191-5B* определяют 11–17 % фенотипического разнообразия популяции РИЛ по морозостойкости проростков. Существенное

увеличение морозостойкости линий связано с присутствием в генотипе аллеля 178 п.н., характерного для морозостойкой родительской формы Лузановка одесская. При промораживании растений в фазе кущения отмечена смена рангов генотипов-носителей альтернативных аллелей, большей морозостойкостью характеризовались линии – носители аллеля 236 п.н. сорта Одесская красноколосая.

Литература

1. Лыфенко С.Ф. О некоторых закономерностях наследования морозостойкости у гибридов озимой мягкой пшеницы // Пути создания исходного материала для селекции зерновых культур. – Одесса: ВСГИ, 1976. – Вып. 14. – С. 71–86.
2. Литвиненко М.А. Удосконалення програми селекції сортів озимої м'якої пшениці універсального типу для умов Півдня України // Збірник наукових праць СГІ-НЦНС. – 2010. – Вип. 16 (56). – С. 9–22.
3. Vagujfalvi A., Galiba G., Cattivelli L., Dubcovsky J. The cold-regulated transcriptional activator *Cbf3* is linked to the frost-resistance locus *Fr-A2* on wheat chromosome 5A // Mol. Genet. Genomics. – 2003. – 269. – P. 60–67.
4. Toth B., Galiba G., Feher E., Sutka J., Snape J.W. Mapping genes affecting flowering time and frost resistance on chromosome 5B of wheat // Theor. Appl. Genet. – 2003. – 107. – P. 509–514.
5. Галаева М.В., Файт В.И., Чеботарь С.В., Сиволап Ю.М. Морозостойкость F₂ популяций пшеницы мягкой озимой и ее связь с аллелями микросателлитных локусов // Вісн. Харків. націон. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія. – 2013. – Вип. 3 (30). – С. 68–75.
6. Галаева М.В., Файт В.И., Чеботарь С.В., Галаев О.В., Сиволап Ю.М. Зв'язок алелів мікросателітних локусів п'ятої групи хромосом з морозостійкістю озимої пшениці // Цитологія та генетика. – 2013. – 47, № 5. – С. 3–11.
7. Феоктістов П.О., Гаврилов С.В., Ляшок А.К. та ін. Методологічні принципи оцінки озимої пшениці на терморезистентність в умовах півдня України. – К.: Видавничий центр НАУ, 2006. – 36 с. – (Методичні рекомендації).
8. Рокицкий П.Ф. Биологическая статистика. – М.: Колос, 1973. – 327 с.
9. Laroche A., Demeke T., Gaudet D.A. Development of PCR marker for rapid identification of the Bt-10 gene for common bunt resistance in wheat // Genome. – 2000. – 43. – P. 217–223.
10. Kammholz S.J., Campbell A.W., Sutherland M.W. Establishment and characterization of wheat genetic mapping populations // Aust. J. Agric. Res. – 2001. – 52. – P. 1079–1088.
11. Файт В.И., Федорова В.Р. Влияние различий генов *Ppd* на адаптацию и урожай в условиях юга степи Украины // Цитология и генетика. – 2007. – 41, № 6. – С. 26–33.
12. Мокану Н.В., Файт В.И. Различия эффектов аллелей генов *Vrd1* и *Ppd-D1* по зимо- морозостойкости и урожаю у озимой пшеницы // Цитология и генетика. – 2008. – 42, № 6. – С. 28–35.

GALAEVA M.V., FAYT V.I., GALAEV A.V., FEDOROVA V.R., SIVOLAP Yu.M.

Plant Breeding and Genetics Institute – National Center of Seed and Cultivar Investigations, Ukraine, 65036, Odessa, Ovidiopolskaya dor., 3, e-mail: mariagall@rambler.ru

FROST RESISTANCE OF WHEAT RECOMBINANT-INBRED LINES AND ITS RELATION WITH MICROSATELLITE LOCI ALLELES

Aim. The study of the relation between allelic differences of microsatellite loci and frost resistance of recombinant-inbred lines Luzanovka odesskaya/Odesskaya krasnokolosaya. **Methods.** Polymerase chain reaction (PCR), gel-electrophoresis, test of frost resistance. **Results.** Microsatellite analysis of chromosomes of homeologous group 5 and the analysis of frost tolerance were performed on recombinant-inbred lines (RILs) derived from a cross between winter wheat varieties Luzanovka odesskaya (tolerant to frost) and Odesskaya krasnokolosaya (susceptible to frost). Microsatellite analysis of parental varieties by using 7 microsatellite markers located on chromosomes 5A, 5B and 5D showed polymorphism for loci *Xbarc 117-5A*, *Xwmc75-5B* and *Xgpw3191-5B*. These microsatellite markers were used for analysis of RILs. The association between allelic differences at microsatellite loci and frost resistance was studied. **Conclusions.** Allelic differences of RILs Luzanovka odesskaya/Odesskaya krasnokolosaya for *Xgpw3191-5B* locus showed a significant relationship with the level of frost resistance. Increase of frost resistance of lines at the germination stage by 11–17 % was associated with 178 bp allele for this microsatellite locus, which is typical for the frost resistant variety Luzanovka odesskaya. Increase of frost resistance of lines at the tillering stage was associated with 236 bp allele, which is typical for the variety Odesskaya krasnokolosaya.

Key words: *Triticum aestivum* L., frost resistance, microsatellite loci.

УДК 579.873.1:577.181.4

ГОРБАЛЬ Л.О.¹, ЮЩУК О.С.¹, ЗАБУРАНИЙ Н.¹, КОБИЛЯНСЬКИЙ А.М.², ОСТАШ Б.О.¹, МАРІНЕЛЛІ Ф.², ЛУЖЕЦЬКИЙ А.М.³, ФЕДОРЕНКО В.О.¹

¹ Львівський національний університет імені Івана Франка,

Україна, 79005, м. Львів, вул. Грушевського 4, e-mail: v_fedorenko@franko.lviv.ua

² Department of Biotechnology and Life Sciences, University of Insubria, Varese and “The Protein Factory” Research Center Politecnico of Milano, ICRM CNR Milano and University of Insubria, Varese Italy

³ Helmholtz-Institute for Pharmaceutical Research Saarland, Germany, Saarbrücken

ГЕНЕТИЧНИЙ ІНСТРУМЕНТАРІЙ ДЛЯ КОНСТРУЮВАННЯ ШТАМІВ *ACTINOPLANES TEICHOMYCETICUS* ІЗ ПІДВИЩЕНИМ РІВНЕМ ПРОДУКЦІЇ ТЕЙКОПЛАНІНУ

Виникнення і розповсюдження патогенних мікроорганізмів, стійких до більшості відомих антибіотиків, є однією з найголовніших проблем сучасної медицини. Антибіотичні препарати все частіше стають неефективними у боротьбі зі збудниками інфекцій. Тому існує потреба у пошуку нових антибіотиків. Продуцентами більшості відомих антибіотиків є актинобактерії, а саме представники роду *Streptomyces*. Однак останнім часом зусилля науковців все більше спрямовані на виділення та дослідження метаболічного потенціалу «нестрептоміцетних» актинобактерій, зокрема тих, що належать до роду *Actinoplanes*, серед яких є багато продуцентів біологічно-активних сполук. До цього роду належить *Actinoplanes teichomyceticus* –

продуцент глікопептидного антибіотика тейкопланіну, який застосовується для лікування важких інфекційних хвороб, викликаних множиннорезистентними збудниками. Попри те, що тейкопланін є фармацевтично-важливим препаратом, а кластер генів його біосинтезу виявлено ще у 2004 році [1, 2], особливості генетичного контролю і регуляція продукції цього антибіотика в *A. teichomyceticus* залишаються малодослідженими. Це зумовлено складністю маніпуляцій з цим об'єктом, а також з тим, що методи генетичної та генно-інженерної роботи з ним розроблені недостатньо. Тому розробка нових генетичних підходів щодо *A. teichomyceticus* має важливе значення не тільки для вивчення механізмів біосинтезу тейкопланіну, але й селекції його

надпродуцентів, генетичного маніпулювання синтезом тейкопланіну і отримання його похідних. У цій роботі узагальнено наші дослідження з розробки генетичного інструментарію для *A. teichomyceticus*: методів перенесення генетичного матеріалу в цей штам, вибору ефективних реплікативних й інтегративних векторів, репортерної системи для оцінки експресії генів і активності промоторів в *A. teichomyceticus*. З використанням розроблених методів нами створено декілька рекомбінантних штамів із підвищеним рівнем продукції тейкопланіну.

Матеріали і методи

У роботі використано штами *Actinoplanes teichomyceticus* – продуценти тейкопланіну, а також штами *Escherichia coli* DH5б для конструювання рекомбінантних плазмід і ET12567 pUZ8002 для кон'югаційного перенесення плазмід в *A. teichomyceticus*.

Для надекспресії генів-регуляторів в *A. teichomyceticus* застосовано інтегративний й реплікативний вектори pKC1139 і pSET152, а також їхні похідні. Ампліфікацію фрагментів ДНК, що містили гетерологічні промотори або регуляторні гени здійснювали методом ПЛР використовуючи Pfu-полімеразу фірми Thermo scientific.

Продукцію тейкопланіну вивчали за описаних умов глибинної ферментації структурного аналізу [8]. Аналіз глюкуронідазної активності здійснювали за методикою описаною в [8].

Результати та обговорення

Кон'югаційне перенесення реплікативних та інтегративних векторів у *A. teichomyceticus*. Для перенесення векторних і рекомбінантних молекул ДНК у клітини актиноміцетів використовують різноманітні підходи: трансформацію протопластів, електропорацію, кон'югаційні схрещування між *Escherichia coli* і актиноміцетами [3]. Перші два методи мають низку недоліків, а тому як найперспективніший спосіб перенесення ДНК у клітини *A. teichomyceticus* може розглядатися міжродова кон'югація з *E. coli*. Вона вже набула широкого застосування у генно-інженерних роботах із актиноміцетами роду *Streptomyces* [4]. Проте процедури кон'югаційного схрещування з *E. coli*, розроблені для одних видів актиноміцетів (і навіть окремих штамів одного виду) часто неефективні для інших. Ми оптимізували методику перенесення плазмідних ДНК в кон'югаційних схрещуваннях *E. coli* з *A. teichomyceticus* за низкою параметрів.

З'ясовано, що найкращим донором для перенесення чужорідної ДНК є *E. coli* ET12567 (*dam-13::Tn9*, *dcm-6*, *hsdM*, *hsdS*), що містить плазмиду pUZ8002 – похідну RK2 з дефектним *oriT*, який унеможливує її власне кон'югаційне перенесення, проте за рахунок її *tra*-генів можуть переноситися корезидентні плазмиди. Для проведення кон'югаційних схрещувань ми використали два середовища: більш багате – соєво-манітолове (СМ) і менш багате – вівсяне (ВС), на яких спостерігали значну різницю у частоті появи pSET152⁺-транскон'югантів. На середовищі СМ їх отримували з частотою $(2,9 \pm 0,2) \times 10^{-3}$, натомість на ВС – близько 1×10^{-6} . Однією з причин такої різниці могло бути значно краще споруювання *A. teichomyceticus* на СМ, ніж на ВС. Ми також встановили, що додавання до середовища іонів магнію в концентрації 20-40 mM істотно підвищує частоту транскон'югантів. З літератури відомо, що частота кон'югаційного перенесення плазмід у схрещуваннях *E. coli* – *Streptomyces* зростає, якщо використовувати пророщенні спори актиноміцетів [3]. Їх проростання стимулюється короткочасною термічною обробкою. Однак з'ясувалося, що нагрівання спор *A. teichomyceticus* протягом 10 хв при 50 °С робить їх повністю нежиттєздатними. Тому термічна обробка спор є недоцільною для цього штаму.

Штам *A. teichomyceticus*, як і інші представники роду *Actinoplanes*, утворює спорангії з ланцюжками рухливих спор, які за природних умов розкриваються після занурення у воду. Ми встановили, що для достатньо повного розкривання спорангіїв і виходу з них спор свіжо-приготовану суспензію, зняту з газону культури *A. teichomyceticus*, слід витримувати в дистильованій воді не менше 15 хв. Це суттєво підвищує кількість клітин-реципієнтів і доступ до них донора та сприяє підвищенню ефективності кон'югаційного перенесення плазмід.

Оскільки існує потреба вносити в клітини *A. teichomyceticus* різну кількість додаткових копій досліджуваних генів, ми дослідили перенесення у цей штам двох типів човникових векторів: реплікативних та інтегративних. Вектори pSET152, pSOK804 і pRT801 здатні до інтеграції у хромосому актинобактерій, а сайти їх інтеграції в хромосомі у більшості випадків унікальні. Натомість вектори pKC1139, pKC1218E і pSOK101 реплікативні, оліго- чи мультикопійні. Усі вектори з високою ефективністю переносилися в клітини

A. teichomyceticus, за винятком pSOK101 [5]. Причиною цього може бути те, що реплікон pIJ101, на основі якого сконструйовано цей вектор, не функціонує в цьому штамі.

Отже, нам вдалося розробити ефективну методику кон'югаційного перенесення плазмід у штаму *A. teichomyceticus*, що дає можливість вносити в нього генетичний матеріал як у складі інтегративних малокопійних, так і в складі реплікативних багатокопійних плазмід.

Репортерна система для аналізу активності промоторів та експресії генів. Репортерні системи є хорошим генетичним інструментом для дослідження експресії генів, зокрема аналізу активності промоторів. Раніше для *Actinoplanes friuliensis* було застосовано репортерну систему на основі зеленого флуоресцентного білка EGFP [6]. Проте, ця система вимагає спеціального дорогого обладнання і є менш чутливою, ніж інші відомі репортери. Враховуючи вищесказане, ми відібрали для роботи два репортерні гени: *xylE* (катехолоксигенази) та *gusA* (глюкуронідази) [7]. Кожен із цих генів окремо злили з промотором *gylP1/P2* гліцеролового оперону *Streptomyces coelicolor* та перенесли в *A. teichomyceticus* у складі інтегративного вектора pSET152, що має лише один сайт інтеграції в хромосомі цього штаму. Отримані рекомбінантні штами вирощували газомом і заливали катехолом, або 5-бром-4-хлор-3-індоліл-в-D-глюкоронідом (X-Gluc). Ми не виявили різниці у забарвленні міцелію між штамом дикого типу і штамом із геном катехолоксигенази після обробки катехолом, що унеможливує застосування *xylE* як репортера в *A. teichomyceticus*. У той же час репортерна система на основі гена *gusA* виявилась функціональною, оскільки штаму, що містив цей ген, набув яскраво-синього кольору вже через 5 хв після обробки X-Gluc, у той же час газом штаму дикого типу, на який був нанесений цей субстрат, не змінив свого забарвлення навіть протягом п'яти діб.

Застосування репортерного гена *gusA* в *A. teichomyceticus* дало змогу оцінити силу низки індукційних та конститутивних гетерологічних промоторів у цьому штамі і вибрати найбільш активні. Ми проаналізували активність 9 промоторів: гена *tipA* із *S. lividans*, експресія якого індуктується тіострептоном, гена стійкості до апраміцину *aac(3)IV* із *Klebsiella pneumoniae*, гена стійкості до еритроміцину *ermE* із *Saccharopolyspora erythraea*, гліцеролового оперону *gylP1/P2* із *S. coelicolor*, гена NDP-гексозо-епімерази *moeE5* із *S. ghanaensis*. Ми

також використали промотори регуляторних генів *cdaR*, *wblA* та *actII-R4 S. coelicolor*, а також синтетичний промотор P72. Серед них лише промотори гена стійкості до еритроміцину, апраміцину, а також P72 є конститутивними. Кожен із перелічених промоторів злили з репортерним геном *gusA* у складі інтегративного вектора pSET152 і перенесли в штаму дикого типу *A. teichomyceticus*. Оцінку сили промоторів здійснювали за глюкуронідазною активністю отриманих рекомбінантних штамів. Отримані дані свідчать про те, що промотор шлях-специфічного регуляторного гена *actII-R4* з кластеру генів біосинтезу актинородину є найсильнішим, тоді як промотори гліцеролового оперону та гена *moeE5* характеризуються середньою силою. Широковживані в клітинах стрептоміцетів промотори генів *tipA* та *ermE* в середньому в 2,5 рази слабші, ніж промотор гена *moeE5*. Найслабшим виявився синтетичний промотор P72 [8].

Створена нами репортерна система для *A. teichomyceticus* ефективна, проста в застосуванні, високочутлива і не потребує для аналізу складного обладнання. Охарактеризована бібліотека включає промотори різної сили, які можуть бути використані з метою надекспресії певних генів. У свою чергу, слабкий промотор може застосовуватися для експресії генів, що кодують потенційно токсичні білки.

Використання генів-регуляторів і гетерологічних промоторів для конструювання штамів *A. teichomyceticus* – надпродуцентів тейкопланіну. До кластеру генів біосинтезу тейкопланіну (*tcp*-кластеру) входять гени, що контролюють етапи біосинтезу молекули антибіотика, гени стійкості до власного антибіотика, а також регуляторні гени. Ми виявили два потенційні шлях-специфічні регуляторні гени: *tcp28* і *tcp29*, що кодують білки родин StrR і LuxR, відповідно. За допомогою таких біоінформатичних методів як моделювання вторинної та третинної структури цих білків (HHPred), пошук гомологів і порівняння з ними (Blastp, delta-blast) ми з'ясували, що Tcp28 і Tcp29 містять потенційні ДНК-зв'язувальні, а також сигнальні домени. Ці дані свідчать про те, що Tcp28 і Tcp29 можуть брати участь у регуляції експресії генів *tcp*-кластера на транскрипційному рівні. Відомо, що у представників роду *Streptomyces* білки цих родин зазвичай задіяні в позитивній регуляції біосинтезу вторинних метаболітів. Уведення додаткових копій таких генів у штаму дикого

типу часто зумовлює зростання продукції антибіотиків, синтез яких вони контролюють [9]. Базуючись на цих даних, ми припустили, що продукти генів *tcp28* і *tcp29* є позитивними регуляторами продукції тейкопланіну, а маніпуляції з ними можуть впливати на його біосинтез.

Ми вирішили розробити нові підходи для отримання штамів *A. teichomyceticus* із підвищеним синтезом тейкопланіну, які б базувалися на методах генетичної інженерії. З цією метою ген *tcp28* злили з трьома різними гетерологічними промоторами, активність яких ми попередньо вивчали: *aac(3)IVp*, *moeE5p* та *actII-R4p*. Такі конструкти клонували в інтеграційний вектор pSET152, що має один сайт інтеграції в хромосомі та вносить лише одну додаткову копію гена *tcp28*. Отримані плазмиди перенесли в клітини дикого типу і проаналізували біосинтез тейкопланіну рекомбінантними штамми. Виявилось, що штам, який містив ген *tcp28* під контролем апраміцинового промотора продукував у 8 разів більше тейкопланіну, ніж штам дикого типу. Натомість інші штамми, в яких цей самий ген був під контролем *moeE5p*, або *actII-R4p* синтезують у 1,6 та 2,8 рази більше антибіотика, відповідно, ніж дикий тип. Попри те, що *actII-R4p* є активнішим у штамі *A. teichomyceticus*, ніж *aac(3)IVp*, все ж злиття останнього із геном-регулятором має кращий ефект на рівень синтезу антибіотика. Це може бути пов'язано з тим, що злиття дуже сильного промотора з геном-регулятором може мати певний негативний вплив на клітину. Такі ефекти раніше описані для промотора гена стійкості до еритроміцину – одного із найсильніших стрептоміцетних промоторів. Підсумовуючи отримані дані, можна зробити висновок, що найкраще зливати досліджувані регуляторні гени з промотором гена стійкості до апраміцину *aac(3)IVp*. Ми спробували також провести транскрипційне злиття гена *tcp29* із цим промотором. Отриманий конструкт клонували в вектор pSET152 і експресували в *A. teichomyceticus*. Аналіз вторинних метаболітів

у рекомбінантному штамі виявив зростання синтезу в середньому в 10 разів у порівнянні з контролем.

Оскільки уведення лише однієї додаткової копії обох генів-регуляторів приводить до суттєвого зростання продукції тейкопланіну, ми вирішили вивчити вплив на продукцію антибіотика більшої кількості копій згаданих генів. З цією метою використано реплікативний олігокопійний вектор pKC1139. Гени *tcp28* і *tcp29* під контролем *aac(3)IVp* клонували в цей вектор та експресували в штамі *A. teichomyceticus*. Обидва рекомбінантні штамми характеризувалися зростанням продукції тейкопланіну від 30 до 40 разів порівняно з контрольним штамом, що містив лише вектор, або з штамом дикого типу. Таким чином, застосувавши опрацьований підхід, нам вдалося підняти синтез антибіотика від 100 мг л⁻¹ до 3–4 г л⁻¹. Ми припускаємо, що цей генетичний підхід може бути ефективним і для підняття рівня синтезу тейкопланіну у вже існуючих промислових штаммах-надпродуцентах. Наші дані доводять, що зміна експресії регуляторних генів шляхом заміни власних промоторів на більш оптимальні гетерологічні, а також підбір відповідних векторів – це перспективний підхід до отримання штамів із підвищеним рівнем синтезу тейкопланіну. Суттєве зростання рівня біосинтезу тейкопланіну було досягнуте внаслідок одноетапного експерименту, а не декількох послідовних етапів мутагенезу і відбору, як це відбувається при традиційній селекції. Окрім того, цей підхід не призводить до виникнення небажаних додаткових мутацій, що часто трапляється у ході індукованого мутагенезу, і дає більш передбачуваний результат.

Висновки

Використовуючи розроблені нами генно-інженерні підходи, сконструйовано низку штамів *A. teichomyceticus* із підвищеним рівнем продукції тейкопланіну.

Ця робота підтримана грантом МОН України Бг98Ф (для В.О. Федоренка) і грантом DAAD – A/13/03150 (для Л.О. Горбаль).

Література

1. Li T.L., Huang F., Haydock S.F., Mironenko T., Leadlay P.F., Spencer J.B. Biosynthetic gene cluster of the glycopeptide antibiotic teicoplanin: characterization of two glycosyltransferases and the key acyltransferase // Chem. Biol. – 2004. – N 11. – P. 107–119.
2. Sosio M., Kloosterman H., Bianchi A., de Vreugd P., Dijkhuizen L., Donadio S. Organization of the teicoplanin gene cluster in *Actinoplanes teichomyceticus* // Microbiology – 2004. – N 150. – P. 95–102.
3. Kieser T., Bibb M.J., Buttner M.J., Chater K.F., Hopwood D.A. Practical *Streptomyces* genetics // The John Innes Foundation, Norwich, United Kingdom. – 2000.

4. Luzhetskyy A., Fedoryshyn M., Gromyko O., Ostash B., Rebets Y., Bechthold A., Fedorenko V. IncP plasmids are most effective in mediating conjugation between *Escherichia coli* and *Streptomyces* // *Genetica*. – 2006. – N 42. – P. 595–601.
5. Horbal L., Ziburannyy N., Ostash B., Shulga S., Fedorenko V. Manipulating the regulatory genes for teicoplanin production in *Actinoplanes teichomyceticus* // *World J. Microbiol. Biotechnol.* – 2012. – N 28. – P. 2905–2100.
6. Wagner N., Osswald C., Biener R., Schwartz D. Comparative analysis of transcriptional activities of heterologous promoters in the rare actinomycete *Actinoplanes friuliensis* // *J. Biotechnol.* – 2009. – N 142. – P. 200–204.
7. Myronovskyy M., Welle E., Fedorenko V., Luzhetskyy A. β -Glucuronidase as a sensitive and versatile reporter in actinomycetes // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2011. – N 77. – P. 5370–5383.
8. Horbal L., Kobylyanskyy A., Yushchuk O., Ziburannyy N., Luzhetskyy A., Ostash B., Marinelli F., Fedorenko V. Evaluation of heterologous promoters for genetic analysis of *Actinoplanes teichomyceticus*-Producer of teicoplanin, drug of last defense // *J. Biotechnol.* – 2013. – N 168. – P. 367–372.
9. van Wezel P.G., McDowall J.K. The regulation of the secondary metabolism of *Streptomyces*: new links and experimental advances // *Nat. Prod. Rep.* – 2011. – N 28. – P. 1311–1333.

HORBAL L.O.¹, YUSHCHUK O.S.¹, ZABURANNYYI N.¹, KOBLYANSKYI A.M.², OSTASH B.O.¹, MARINELLI F.², LUZHETSKYY A.M.³, FEDORENKO V.O.¹

¹ *Ivan Franko national university of Lviv,*

Ukraine, 79005, Lviv, Hrushevskogo str., 4, e-mail: v_fedorenko@franko.lviv.ua

² *Department of Biotechnology and Life Sciences, University of Insubria,*

Varese, Italy

³ *Helmholtz-Institute for Pharmaceutical Research Saarland,*

Germany, Saarbrücken

GENE ENGINEERING METHODS FOR THE CONSTRUCTION OF THE ACTINOPLANES TEICHOMYCETICUS STRAINS WITH INCREASED LEVEL OF TEICOPLANIN PRODUCTION

Aims. Random mutagenesis and selection were extensively applied to teicoplanin producers, while the gene engineering methods were not used, because of the paucity of genetic tools for *A. teichomyceticus*. **Methods.** A set of microbiological, biochemical and genetic methods were used in the study. **Results.** We worked out an effective method of transfer of integrative and replicative vectors in *A. teichomyceticus* by means of conjugation. Successful adaptation of the *gusA* reporter for the use in this strain let us to estimate the strength of different heterologous promoters that might be used for gene expressions in it. Several strains with in average 30–40 times increased level of teicoplanin production in comparison to the wild type were obtained. **Conclusions.** Based on the obtained results we proposed a new approach for the improvement of teicoplanin production.

Key words: *Actinoplanes*, teicoplanin, conjugation, reporter system, overproducer.

УДК 577.21: 57.085.1:577.233.3:633.11

ГОРБАТЮК І.Р., БАВОЛ А.В., МОРГУН Б.В.

Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України,

Україна, 03680, м. Київ, вул. Акад. Заболотного, 148, e-mail: molgen@icbge.org.ua

АГРОБАКТЕРІАЛЬНА ТРАНСФОРМАЦІЯ *IN PLANTA* ПШЕНИЦІ ОЗИМОГО СОРТУ ПОДОЛЯНКА ТА ЯРОГО СОРТУ ВОВНІТЕ

На даний час у молекулярній біології рослин науковці значну увагу приділяють розвитку методів трансформації, що дозволяє запобігти довготривалим процедурам отримання культури тканин. Останні досягнення у сфері генетичної трансформації показали, що можливе отримання трансгенних рослин без будь-яких процедур *in vitro*. У 1998 р. Bechtold зі співавторами [1] запропонували новий метод

трансформації, названий трансформація *in planta*.

Однією із проблем трансформації *in vitro*, яка пов'язана з регенерацією, є химерність отриманих трансформантів і соматональна мінливість. Для однодольних рослин регенерація ускладнюється ще й низьким морфогенетичним потенціалом, що у деяких випадках не дозволяє отримати фертильні

рослини [2].

Технологія агробактеріальної трансформації *in planta* дозволяє подолати наведені вище труднощі під час отримання трансгенних рослин шляхом трансформації клітин інтактною рослини [3].

З огляду на зазначене вище, метою нашої роботи було провести агробактеріальну трансформацію пшениці озимого сорту Подолянка [4] та ярого сорту іноземної селекції Bobwhite в умовах *in planta*.

Матеріали і методи

Колоски рослин, які були вибрані для трансформації *in planta*, у довжину становили приблизно 6–7 см і ще не повністю вийшли з прапорцевого листка [5, 6]. Проводили каstrування, залишаючи по 12–14 колосочків. Після закінчення на кожний колосок вдягався індивідуальний ізолятор із пергаментного паперу. Через 3 доби проводили інокуляцію суспензією агробактерії. Однодобову суспензійну культуру наносили на приймочки маточок та проводили запилення після повного висихання розчину.

У дослідженні використовувалася генетична конструкція p014 в *Agrobacterium tumefaciens* штамі AB1 (рис. 1). Бактерія нарощувалася у рідкому живильному середовищі Himedia M002 (аналог LB) з відповідними антибіотиками (спектиноміцин 50 мг/л та канаміцин 100 мг/л) [7] на шейкері протягом 16 годин. Бактеріальні клітини осаджували центрифугуванням при 5000×g 10 хв. і ресуспендували у стерильній дистильованій воді до оптичної щільності OD₆₀₀ = 1,0 [3, 5–7]. До суспензії бактерій додавали 100 мкМ acetosyringone [5, 6] та 0,05 % Silvet L77, рН доводилося до 4,0 [2].

Отримане насіння, у випадку Bobwhite, обробляли протруйником Максим Стар 025 FS (Сінгента), пророщували на фільтрувальному папері [7]. Проростки були висаджені у вегетаційні посудини. У випадку озимого сорту Подолянка насіння висаджувалося

безпосередньо у посудини з ґрунтом і культивувалося у тепличних умовах.

Зелений матеріал аналізували полімеразною ланцюговою реакцією (ПЛР) на присутність трансгену *nptII*. Для цього використовувалися праймери: форвардний – 5'-CCT-GAA-TGA-ACT-CCA-GGA-CGA-GGC-A-3' та реверсний – 5'-GCT-CTA-GAT-CCA-GAG-TCC-CGC-TCA-GAA-G-3', очікуваний фрагмент становив 647 п.н. [8].

Результати та обговорення

Кастрували та обробляли агробактеріальною суспензією 12 колосків сорту Bobwhite. З них нами отримано 13 насінин із 72 можливих. Середня зав'язуваність становила 18,0 % (рис. 2). Одержане насіння було поміщене у чашки Петрі для проростання без періоду спокою. Приблизно через 3 тижні з'явилися проростки, які були перенесені у вегетаційні посудини об'ємом 0,65 л.

Після того, як рослини вкоренилися, частину одного з листків зрізали для виділення загальної ДНК та ПЛР аналізу.

Паралельно проводилася робота з озимим сортом Подолянка, наданим Інститутом фізіології рослин і генетики НАН України. Загалом було кастровано 24 колоски, проведено обробку агробактерією і запилено власним пилком відповідно до зазначеної методики. Після завершення вегетаційного періоду отримано 293 насінини з 620 можливих. За нашими спостереженнями середня зав'язуваність насіння складала 46,4 % (табл.).

Отримане насіння відзначалося виповненістю і задовільним зовнішнім виглядом (рис. 3).

Зерна T₀ висаджувалися у вегетаційні посудини по 2 зернини, і культивувались в умовах теплиці за температури 22 °C і 16-годинного фотоперіоду. Після того, як рослини досягли фази двох листків, частину одного з них зрізали для проведення ПЛР-аналізу.



Рис. 1. Схематичне зображення Т-ДНК генетичної конструкції p014. Показано кодуючі послідовності генів неоміцину фосфотрансферази (*nptII*) та зеленого флуоресцентного білку (GFP), підсилений промотор вірусу мозаїки цвітної капусти (P35e), термінатори нопалінсинтази (Tnos) і білку теплового шоку (Thsp), плечі Т-ДНК (RB, LB)

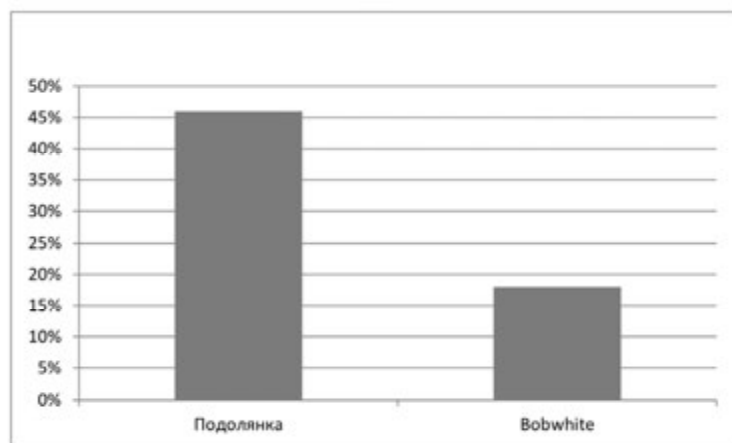


Рис. 2. Зав'язуваність насіння у досліджуваних сортів

Таблиця. Зведені дані мінімальної та максимальної кількості очікуваного і отриманого насіння, відсоток зав'язуваності

	Кількість насінин		Зав'язуваність насіння, %
	всього отримано	максимально можлива	
	293	620	
min	1	18	3,6
max	23	30	88,5
Середнє значення % зав'язуваності			46,4
Середня довжина колоса, см			5,9

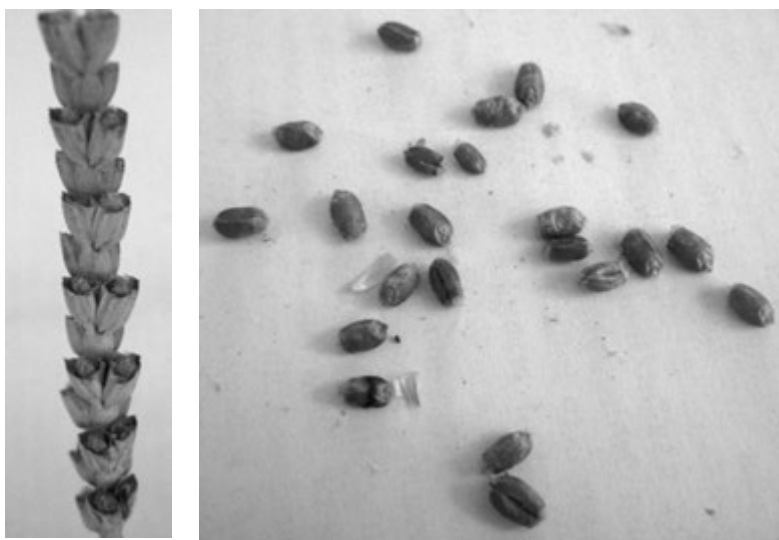


Рис. 3. Типовий колосок та насіння, отримане після обробки *in planta* агробактеріальною суспензією

За результатами ПЛР на присутність трансгену *nptII* із 12-ти протестованих проб сорту Bobwhite позитивних сигналів не виявлено.

Із 30 проб сорту Подольнка, тільки у чотирьох (48А, 51А, 56А, 57В) виявлено позитивний сигнал присутності *nptII* трансгену (рис. 4).

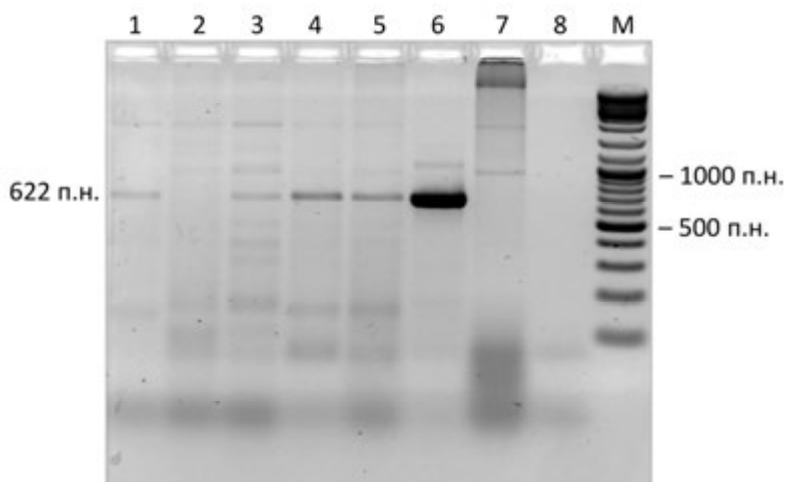


Рис. 4. Електрофореграма проб озимого сорту пшениці Подолянка на присутність послідовності трансгену *nptII*. Доріжки 1-5 – досліджувані проби 57В, 62В, 56А, 48А, 51А відповідно, 6 – позитивний контроль, *N. tabacum* трансформований конструкцією p014, 7 – нетрансформована пшениця сорту Подолянка у якості негативного контролю, 8 – негативний контроль (ТЕ буфер), М – маркер молекулярної маси DNA Ladder Mix

Слід зазначити, що температура навколишнього середовища може мати вирішальне значення на перебіг процесу трансформації і суттєво впливати на його ефективність. Не завжди можна ефективно контролювати цей параметр. Нами було помічено, що під час обробки колосків пшениці сорту Подолянка температура навколишнього середовища становила 17–18 °С, а в процесі обробки колосків пшениці ярого сорту іноземної селекції Bobwhite – 22–25 °С.

Таким чином, було проведено агробактеріальну трансформацію *in planta* озимого сорту Подолянка та ярого Bobwhite. Для ефективного перебігу трансформації та забезпечення життєдіяльності агробактерій важливо, щоб температура навколишнього середовища була нижчою 28 °С протягом

наступних 18 годин. У випадку сорту Подолянка було зібрано 293 насінини з 620 можливих, що становить 46,4 %. Аналіз отриманих форм за допомогою ПЛР дозволив виявити 4 чітких позитивних сигнали на присутність трансгена *nptII*, що становить 13,3 % від загальної кількості протестованого матеріалу. Разом з тим було отримано 13 насінин сорту Bobwhite із 72 можливих, що становить лише 18,0% зав'язуваності. Подальша перевірка рослинного матеріалу на присутність трансгенів послідовностей дала негативний результат. Ймовірно, що у даному випадку саме висока температура навколишнього середовища під час нанесення бактеріальної суспензії була критичним фактором і вчинила негативний вплив на процес агробактеріальної трансформації *in planta*.

Література

1. Bechtold N., Pelletier G. *In planta Agrobacterium*-mediated transformation of adult *Arabidopsis*. – 266.
2. Curtis I.S., Nam H.G. Transgenic radish (*Raphanus sativus* L. Longipinnatus Bailey) by floral-dip method – plant development and surfactant are important in optimizing transformation efficiency // *Transgenic Research* – 2001. – 10. – P. 363–371.
3. Чумаков М.И., Моисеева Е.М. Технологии агробактериальной трансформации растений *in planta* // *Биотехнология*. – 2012. – № 1. – С. 8–20.
4. Гончарук О.М., Бавол А.В., Дубровна О.В. Морфогенний потенціал високопродуктивних сортів озимої пшениці в культурі апікальних меристем пагонів // *Фактори експериментальної еволюції організмів: збірник наукових праць* – 2011. – 11. – С. 237–241.
5. Agarwal S., Loar S., Steber C.M., Zale J. Floral transformation of wheat // *Methods in Molecular Biology. Transgenic Wheat, Barley and Oats*. – 2009. – 478. – P. 105–113.
6. Zale J.M., Agarwal S., Loar S., Steber C.M. Evidence for stable transformation of wheat by floral dip in *Agrobacterium tumefaciens* // *Plant Cell Rep.* – 2009. – N 28. – P. 903–913.
7. Supartana P., Shimizu Ts., Nogawa M., Shioiri H., Nakajima T., Haramoto N., Nozue M., Kojima M. Development of simple and efficient *in planta* transformation method for wheat (*Triticum aestivum* L.) using *Agrobacterium tumefaciens* // *Journal of Bioscience and Bioengineering*. – 2006. – 102, N 3. – P. 162–170.

8. Kim Y.-Y., Kim D.-Y., Shim D. et al. Expression of the novel wheat gene TM20 confers enhanced cadmium tolerance to bakers' yeast // J. of Biological Chemistry. – 2008. – 283 (23). – P. 15893–15902.

GORBATYUK I.R., BAVOL A.V., MORGUN B.V.

Institute of Cell Biology and Genetic Engineering, National Academy of Sciences of Ukraine, Ukraine, 03680, Kyiv, Akad. Zabolotnoho str., 148, e-mail: molgen@icbge.org.ua

AGROBACTERIUM-MEDIATED *IN PLANTA* TRANSFORMATION OF WINTER WHEAT CV. PODOLYANKA AND SPRING WHEAT CV. BOBWHITE

Aims. *Triticum aestivum* L., being one of the world's most important staple crops, remains a challenge for genetic transformation. This paper describes the application of *in planta* method to obtain transformants by treating cells of intact plants with argobacterium. **Methods.** Analysis of the plant material for the presence of *nptII* transgene was carried out using polymerase chain reaction (PCR). **Results.** Fresh agrobacterium containing vector p014 was transferred into spikes of wheat. There were 13 seeds (18.0 %) collected of cv. Bobwhite out of 72 possible from 12 spikes and 293 seeds (46.4 %) of cv. Podolyanka out of 620 possible from 24 spikes. Based on the results of PCR for the presence of *nptII* transgene there were no positive signals found for the cv. Bobwhite. On the other hand there were 4 clear positive samples detected for cv. Podolyanka indicating the presence of *nptII* sequence. **Conclusions.** *Agrobacterium*-mediated *in planta* transformation was conducted for winter cv. Podolanka and spring cv. Bobwhite. The ambient temperature below 28 °C during the next 18 hours after agrobacterium application was crucial. Tested probes of cv. Podolyanka (13.3 %) were positive for the presence of transgene *nptII*.

Key words: wheat, transformation, *nptII*, agrobacterium, GFP.

УДК 167.33:616.36-004+599.323.41

ГУЛЬКО Т.П.^{1,5}, ДРАГУЛЯН М.В.¹, ДЕРЯБИНА Е.Г.^{1,5}, КОРДИУМ В.А.¹, ЛЕВКИВ М.Ю.², БУБНОВ Р.В.^{3,4}

¹ *Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины,*

Украина, 03143, г. Киев, ул. Акад. Заболотного, 150, e-mail: kordium@imbg.org.ua

² *Киевский национальный университет им. Тараса Шевченка,*

Украина, 01601, г. Киев, ул. Владимирская, 64/13

³ *Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины,*

Украина, 03143, г. Киев, ул. Акад. Заболотного, 154

⁴ *Центр ультразвуковой диагностики и интервенционной сонографии Клинической больницы «Феофания» Государственного Управления делами,*

Украина, 03680, г. Киев, ул. Акад. Заболотного, 21

⁵ *ГУ «Институт генетической и регенеративной медицины НАМНУ»,*

Украина, 04114, г. Киев, ул. Вышгородская, 67

МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОЦЕССОВ ПОВРЕЖДЕНИЯ, КОМПЕНСАЦИИ И ПРИСПОСОБЛЕНИЯ В ПАТОЛОГИЧЕСКИ ИЗМЕНЕННОЙ ПЕЧЕНИ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ CCl₄

Многие заболевания печени характеризуются наличием воспалительного процесса, при котором происходит интенсивное отмирание гепатоцитов, в результате чего орган теряет свои функции. Однако следует заметить, что многие авторы при комплексном лечении заболеваний печени рассматривают компенсаторно-приспособительные (адаптивные) реакции. К таким реакциям исследователи относят регенерацию, гипертрофию и перестройку тканей [1, 2]. В связи с этим,

актуальным представляется исследование повреждения печени на экспериментальной модели, индуцированной четыреххлористым углеродом (CCl₄), а также изучение регенеративной способности в измененной печени на протяжении 2 месяцев после окончания затравки токсином.

Материалы и методы

Исследования проведены на 20 мышцах-самцах линии ICR, которые в начале эксперимента были разделены на 3 группы.

Животным первой группы на протяжении всего эксперимента раз в неделю интраперитонеально вводили 30 % масляный раствор CCl_4 (1 мкл на 1 г живого веса). Животным второй группы на протяжении 7 недель раз в неделю интраперитонеально вводили 30% масляный раствор CCl_4 (1 мкл на 1 г живого веса), а потом за 2 месяца до окончания эксперимента прекращали затравку четыреххлористым углеродом. Животные 3-й группы были здоровыми. В начале эксперимента масса тела мышей, которых содержали на стандартном пищевом рационе, составляла 25 г.

Животных после проведения ультразвукового исследования (УЗИ) внутренних органов и предварительного ночного голодания выводили из эксперимента на 7, 10, 12 и 14 неделе от начала опыта. Полученный от животных биоматериал использовали для проведения патологоанатомических, биохимических и гистологических исследований.

Результаты и обсуждение

При вскрытии мышей из 1-ой и 2-ой группы на 10 неделе опыта у мышей 2-ой группы (на момент забоя 4 недели, как прекратили вводить CCl_4) печень визуально не отличалась – была твердая, кровенаполненная, крупнозернистая с затупленными краями. Желчный пузырь плотный, мутный, внутри визуализировалось инородное включение. Визуально о регенерации органа у мышей 2-ой группы можно с большей степенью судить по 12 неделе эксперимента (на момент забоя 6 недель, как прекратили вводить CCl_4). Печень у мышей этой группы неоднородная, светло-коричневая, паренхима органа местами твердая, местами мягкая. По мере того, как печень у мышей, которым 8 недель, перестали вводить CCl_4 , постепенно визуально восстанавливалась и приближалась к интактной, у мышей, которым постоянно вводили токсин наблюдалась противоположная картина. Визуально орган у животных 1 группы светло-коричневый, крупнозернистый, с белыми новообразованиями (в основном на большой доле), плотный по консистенции. У этих мышей значительно увеличивались брыжеечные лимфоузлы.

О наличии компенсаторно-приспособительных реакций в измененной печени мышей 2-ой группы также свидетельствовал вес печени, тимуса и селезенки, который, по сравнению с мышами 1-ой группы (через 4

недели прекращения затравки) сначала увеличивался, а потом уменьшался и становился меньше, чем у мышей 1 группы. Следует отметить, что с уменьшением размера печени уменьшались показатели АлАТ и АсАТ во 2-ой группе мышей, которым прекратили вводить токсин, по сравнению с 1-ой группой мышей, у которых показатели АлАТ выше (табл.).

На рисунке 1 представлена гистология печени здоровых мышей и мышей, которым прекратили вводить четыреххлористый углерод (в момент прекращения затравки). Фото мышей, которым вводили токсин свидетельствует о частичном нарушении структуры печеночных долей, некрозе гепатоцитов и 80 % некротизации паренхимы органа

На рисунке 2 представлена гистология 2-х групп мышей – мышки, которой прекратили вводить четыреххлористый углерод (через 4 недели) и мышки, которой продолжали вводить CCl_4 . Гистологические исследования изменения в структуре паренхимы печени у мышей обеих групп выявили наличие участков некроза паренхимы органа, частичный некроз гепатоцитов, наличие лимфоцитарно-макрофагальной инфильтрации в паренхиму органа (рис. 2, а, б). У мышей 1-ой группы, которым вводили CCl_4 на протяжении всего эксперимента выявлено нарушение дольковой структуры с пронизывающими соединительнотканными прослойками (рис. 2, в). Позитивный сдвиг гистологических параметров печени наблюдался в печени мышей 2-ой группы (на момент забоя 4 недели, как прекратили вводить CCl_4), по сравнению с печенью мышей 1-ой группы (рис. 2, г).

На рисунке 3 представлена гистология 2 групп мышей. Забой на конечной точке эксперимента. Гистологические изменения в печени мышей, которым на протяжении всего эксперимента вводили токсин, свидетельствует о полном отсутствии структуры долей органа. Имеет место выраженный некроз гепатоцитов, что привело к 100 % некротизации паренхимы органа. Еще более выраженный позитивный сдвиг гистологических параметров наблюдается в печени мышей 2-ой группы на последней исследуемой точке эксперимента. У них, по данным гистологического исследования, сохранена структура печеночных долей, присутствует вздутие, некроз гепатоцитов, кровенаполнение сосудов органа.

Таблица. Некоторые биометрические показатели физиологического состояния организма мышей в ходе эксперимента

№	Группа животного	Неделя эксперимента	Количество недель после окончания затравки CCl_4	Вес животного	Вес печени на 100 г	Вес тимуса на 100 г	Вес селезенки на 100 г	АлАТ (Ед/л)	АсАТ (Ед/л)
1	1 группа	10	-	29,3	6,1	68,0	778,2	90,6	87,3
2	1 группа	12	-	31,5	6,0	69,8	436,5	84,1	80,9
3	1 группа	12	-	33,3	5,7	58,6	672,8	88,2	83,5
4	1 группа	14	-	33,1	6,9	72,5	507,6	87,6	83,9
5	2 группа	10	4	35,5	7,0	59,0	839,4	80,9	77,6
6	2 группа	10	4	32,7	9,0	58,0	951,0	135,9	139,1
7	2 группа	12	6	33,4	5,4	52,4	371,3	43,2	87,4
8	2 группа	12	6	31,3	5,1	63,5	426,5	67,3	60,8
9	2 группа	14	8	30,2	5,9	64,2	365,4	55,3	74,1
10	интакт			34,1	5,4	79,2	785,9	24,7	24,7
11	интакт			31,5	5,2	120,0	787,3	16,1	8,1
12	интакт			32,5	5,4	64,6	707,6	6,5	16,1

Примечание: 1 группа – мыши, которым вводили CCl_4 на протяжении 4 месяцев эксперимента; 2 группа – мыши, которым на протяжении 7 недель вводили CCl_4 , а потом за 2 месяца до окончания эксперимента прекращали затравку четыреххлористым углеродом.

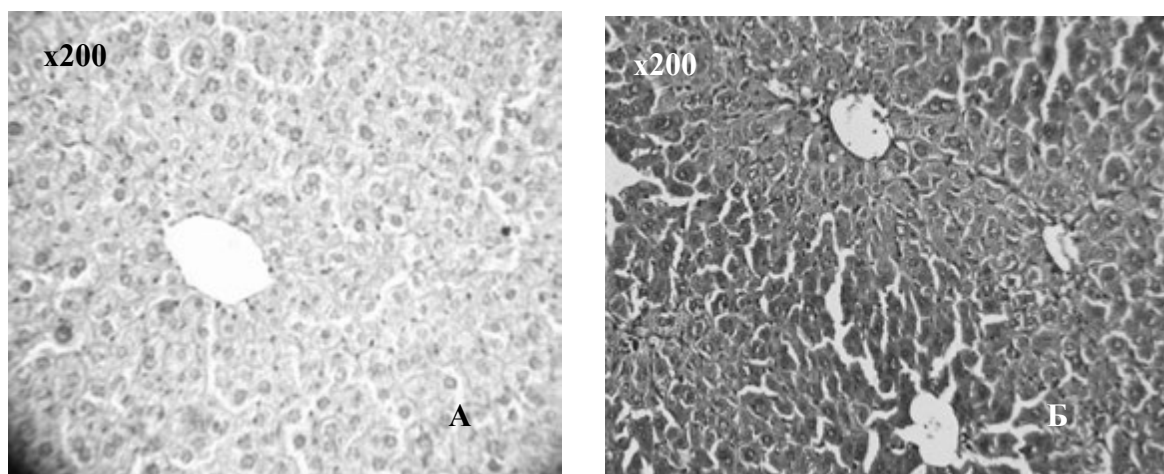


Рис. 1. Гистология печени: А) печень здоровой мышки; Б) изменения в структуре печени мышей после 7 недель внутрибрюшинного введения CCl_4

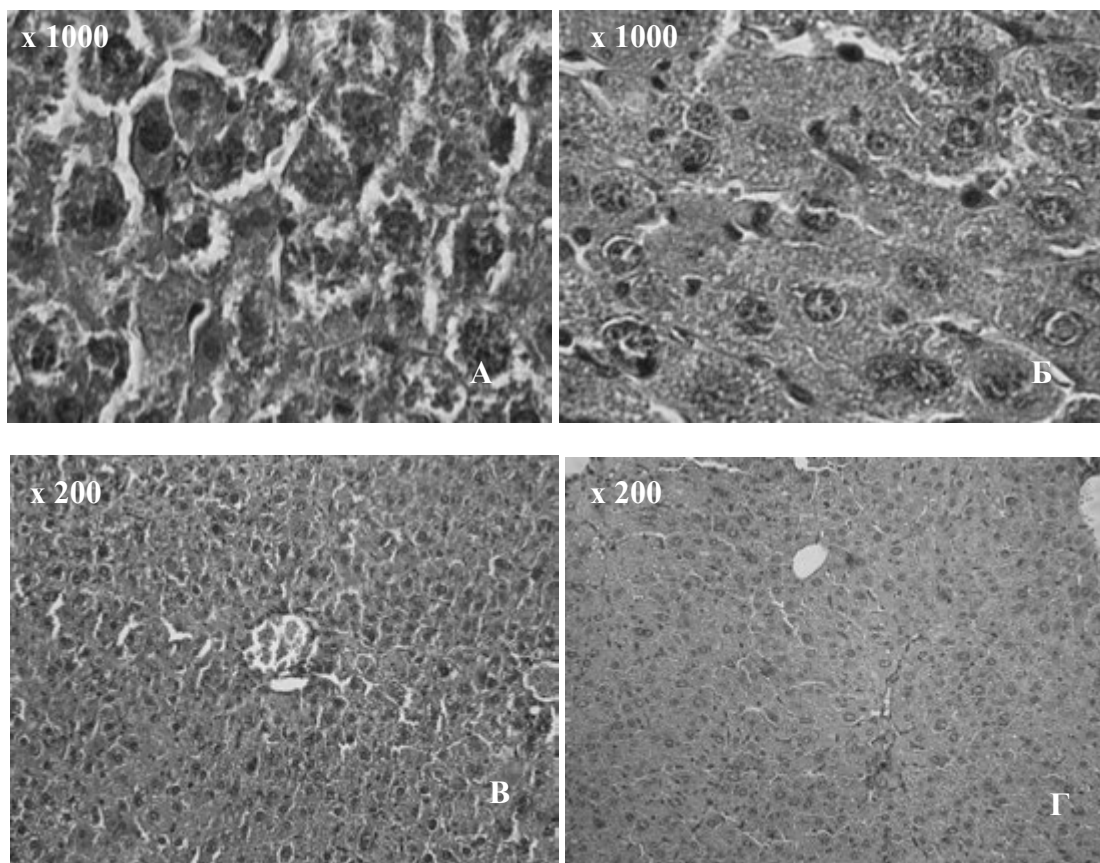


Рис. 2. Гистологические изменения в структуре печени мышей после внутривентриального введения CCl_4 : А, В) печень мышки, которой вводили CCl_4 на протяжении 12 недель эксперимента; Б, Г) печень мышки, которой прекратили вводить CCl_4 через 7 недель от начала эксперимента (на момент забоя 4 недели, как прекратили вводить CCl_4)

При проведении УЗИ печени у мышей 1-й группы, которым постоянно вводили CCl_4 , размер печени составлял 1,3 см, диаметр воротной вены 0,15 см. У мышей 2-й группы, которым прекратили вводить CCl_4 через 7 недель от начала эксперимента размер печени – 1,4 см., диаметр воротной вены 0,11 см. Биометрические показатели размера печени и диаметра воротной вены у здоровых мышей были 1,3 и 0,09 см соответственно (рис. 3).

При интраперитонеальном введении подопытным мышам 1 раз в неделю на протяжении 4-х месяцев 30 % раствора четыреххлористого углерода в подсолнечном масле из расчета 1 мкл на 1 г массы тела нами был получен фиброз печени, обусловленный цитотоксическим мембранотропным действием токсина. Характерными признаками этого фиброза печени были: нарушение дольковой структуры с пронизывающими соединительно-тканными прослойками, наличие участков некроза паренхимы органа, значительная

портальная гипертензия и расширение диаметра воротной вены.

В ходе естественного патоморфоза фиброза печени через два месяца после окончания затравки были выявлены признаки, характерные для глубокого фиброза печени, однако процент поврежденной ткани визуально уменьшился. Об этом свидетельствовали также УЗИ печени. Достоверно уменьшились показатели АлАТ в 1,95 раз и АсАТ в 1,46 раз. Уменьшился вес печени в 1,35 раза и селезенки в 2,44 раза. Вес тимуса наоборот увеличился в 0,95 раз.

Выводы

Таким образом, наличие регенеративных процессов в печени, в результате которых она сама поддерживает баланс, указывает на необходимость контроля и управления за происходящими в ней процессами, что позволит улучшить результаты лечения самого заболевания и его осложнений.

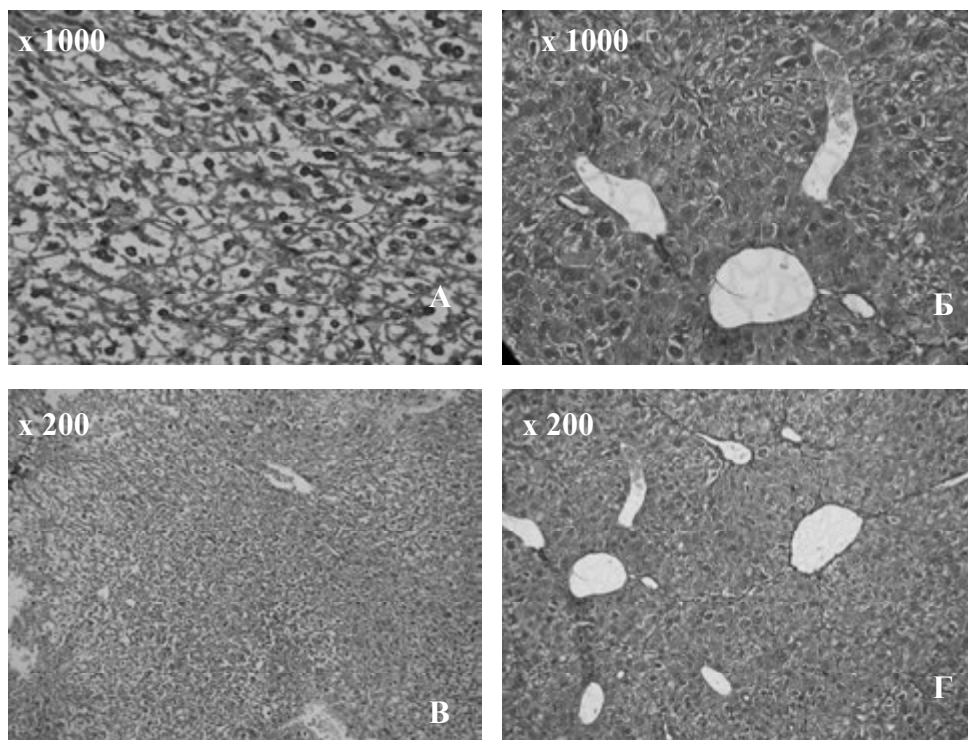


Рис. 3. Гистологические изменения в структуре печени мышей после внутрибрюшинного введения CCl_4 : А, В) печень мышки, которой вводили CCl_4 на протяжении всего эксперимента; Б, Г) печень мышки, которой прекратили вводить CCl_4 через 7 недель от начала эксперимента (забой на конечной точке эксперимента)

Литература

1. Абрамовская Н.В. Сравнительная морфологическая характеристика цирроза печени, индуцированного четыреххлористым углеродом, и его патоморфоза после воздействия на печень высокоинтенсивного диодного лазера (экспериментальное исследование): дис.канд.мед. наук: спец. 14.00.15 – патологическая анатомия / Наталья Владимировна Абрамовская. – Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Челябинская государственная медицинская академия Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию Российской Федерации» Южноуральского научного центра Российской академии медицинских наук. – Челябинск, 2008. – 182 с.
2. Саркисов Д.С. Регенерация и гипертрофия // Арх. патологии. – 1968. – № 7. – С. 3–12.

GULKO T.P.^{1,5}, **DRAGULYAN M.V.**¹, **DERYABINA E.G.**^{1,5}, **KORDYUM V.A.**¹, **LEVKIV M.U.**², **BUBNOV R.V.**^{3,4}

¹ *Institute of Molecular Biology and Genetics, NAS of Ukraine, Ukraine, 03143, Kyiv, Akad.Zabolotnogo str., 150, e-mail: kordium@imbg.org.ua*

² *Kievsky National University Taras Shevchenko, Ukraine, 03143, Kyiv, Prospekt Hlushkov str., 2*

³ *Institute of Microbiology and Virology. DK Zabolotny NAS of Ukraine, Ukraine, 03143, Kyiv, Akad. Zabolotnogo str., 154*

⁴ *Tsentr ultrasound and sonography intervetsionnoy Clinical Hospital "Theophany" of the State Administration, Ukraine, 036803, Kyiv, Akad. Zabolotnogo str., 21*

⁵ *State Institute of Genetic and Regenerative Medicine National Academy of Medical Sciences of Ukraine, 04114, Kyiv, Vishgorodska str., 67*

MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF PROCESSES INJURY COMPENSATION AND DEVICES IN PATHOLOGICAL CHANGES LIVER CCl_4

Aim. Study of liver damage in an experimental model induced carbohydrate tetrachloride (CCl_4), and the study of the regenerative capacity of the diseased liver for 2 months after seeding toxin. **Methods.** Obtaining

models of liver cirrhosis in rats of Wistar 3 and 8 months of age, and was carried out by intraperitoneal injection of 30 % animal oil solution of CCl_4 (0.001 ml/kg) 1 day a week. The dynamics of the disease studied biochemical (measurement of ALT, AST), histological and radiological (SPL) methods. **Results.** By intraperitoneal injection of experimental mouse 1 times a week for 4 months, 30 % carbon tetrachloride solution in sunflower oil at the rate of 1 l per 1 g was formed liver fibrosis caused by cytotoxic membrane-action poison. Characteristic of liver fibrosis were: violation of lobular structures alternate with layers of connective tissue, the presence of areas of necrosis parenchymal organ, a significant expansion of portal hypertension and portal vein diameter. During natural pathomorphism liver fibrosis in two months after seeding showed signs characteristic of deep liver fibrosis, but the percentage of damaged tissue visually reduced. This is also evidenced liver ultrasound. Significantly decreased performance ALT and AST 1.95 times to 1.46 times. Decreased liver weight 1.35 times and 2.44 times in the spleen. Thymus weight conversely increased 0.95 times. **Conclusions.** Thus, the presence of regenerative processes in the liver, as a result of which she maintains the balance indicates the need for monitoring and control of processes occurring in it, which will improve the results of treatment of the disease and its complications. *Key words:* hepatic necrosis, fibrosis, regeneration, mouse.

УДК 577.3

ГУР'ЯНОВ Д.С., ЛИСЕЦЬКА Т.Ю., АНТОНЕНКО С.В., КРАВЧУК І.В., ТЕЛЕГЄВ Г.Д.

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,

Україна, 03680, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 150, e-mail: dmitriy.gurianov@gmail.com

РОЛЬ ДОМЕНУ PH БІЛКА BCR У КЛІТИННИХ ПРОЦЕСАХ, ЩО ВИЗНАЧАЮТЬ ФЕНОТИП Ph⁺-ПОЗИТИВНИХ МІЄЛОПРОЛІФЕРАТИВНИХ ЗАХВОРЮВАНЬ

Хромосомні порушення є однією з причин розвитку злоякісних захворювань, в тому числі і мієлопроліферативних. Хромосомна транслокація довгими плечима 9 та 22 хромосом призводить до злиття генів *Bcr* та *Abl*. При цьому, за рахунок різних місць розриву у гені *bcr*, утворюються різні варіанти химерного гена *bcr/abl*, що відрізняються наявністю або відсутністю певних функціональних доменів, зокрема доменів PH та DN. Це призводить до генерації химерних білків різної молекулярної маси – *BCR/ABL^{p190}*, *BCR/ABL^{p210}*, *BCR/ABL^{p230}*. Вони призводять до розвитку відповідно гострої лімфобластної лейкемії, хронічної мієлоїдної лейкемії, та хронічної нейтрофільної лейкемії. Таким чином спостерігається закономірність, що при короткій формі білка хвороба протікає у гострій формі, при довгих – у хронічній [1]. В зв'язку з цим, важливо визначити в яких молекулярних процесах задіяні функціональні домени, що характерні для *BCR/ABL^{p210}*, але не *BCR/ABL^{p190}*. Це дозволить виявити, що саме дозволяє перебувати онкобілку в активній формі, але при цьому призводити до менш агресивного фенотипу.

У попередніх дослідженнях було визначено 23 білки, що є кандидатами на взаємодію з доменом PH білка *BCR* [2]. Серед них білки, що належать до різних

функціональних груп. Зокрема можна виділити групу білків елементів цитоскелету, реорганізаторів цитоскелету та цитоплазматичної мембрани, та білків, що задіяні в процесах протеолітичної деградації. Так, кортактин (СТТН) та *FBP17* здійснюють перебудови актинового примембранного цитоскелету, що має важливе значення для багатьох сигнальних процесів, зокрема, для рецепторно-опосередкованого ендоцитозу [3]. *FBP17* сприяє *CDC42*-індукованій полімеризації актину, активації *N-WASP-WIP* комплексу і, отже, приймає участь у сигналінгу від поверхні клітини до актинового цитоскелету [4]. Кортактин розгалуджує актинові філаменти після його активації фосфорилуванням у пролін-багатій ділянці та зв'язуванні з *Arg2/3* комплексом [5]. Відомо, що і *СТТН*, і *FBP17* взаємодіють з динаміном через *SH2* домен та забезпечують розгалуження актинових філаментів на пізніх стадіях формування клатринової везикули [3]. Домен PH взаємодіє з фосфоінозитол-4,5-фосфатами, що є одними з основних складових цитоплазматичної мембрани та комплексу Гольджі [6]. Таким чином може забезпечуватись розділення мембранних каналців для формування ендоцитозних пухирців.

Запобігання протеолітичній деградації є

одним з можливих шляхів збереження онкобілка BCR/ABL в активній формі. Білок убіквітин специфічна протеаза 1 (USP1) є білком цистеїнової групи протеаз. Він складається з трьох консервативних доменів, перші два – внутрішньоклітинні пептидази, третій – карбоксил-термінальна пептидаза. Основною функцією даного білка є деубіквітування за рахунок руйнування ізопептидних зв'язків, що забезпечується внутрішньоклітинними пептидазами [5]. Таким чином, підтвердження взаємодії домену PH білка BCR з USP1 може означати, що сам BCR/ABL, або його білки партнери зазнають деубіквітинізації, а також те, що USP1 може бути фосфорильований за рахунок тирозин-кіназної активності ABL частини.

Серед елементів цитоскелету, що можуть взаємодіяти з доменом PH, присутні такі білки як β -тубулін (TUBB) та цитокератин 10 (KRT10). Перший є компонентом мікротрубочок, другий – належить до проміжних філаментів. Зв'язування з цими клітинними структурами може мати декілька наслідків. По-перше, білки партнери можуть бути фосфорильовані по залишкам тирозину з боку Abl частини BCR/ABL. По-друге – участь у формуванні білкових комплексів, що закорені на елементах цитоскелету, а також обмеження тирозин-кіназної активності BCR/ABL. Фосфорилування є одним із основних модифікацій, що змінює активність білка та його здатність бути залученим до сигнального шляху. Таким чином, фосфорилування β -тубуліну може призвести до зміни динаміки збору мікротрубочок, а також до здатності певних білкових комплексів формуватись на їх поверхні [8]. А фосфорилування цитокератину 10 – до перебудови кератинових філаментів та вивільненню білків, що зв'язані з цитокератином 10 [9]. Роботи J. Paramio et al. показують, що цитокератин 10 інгібує АКТ, тому інактивація першого може мати наслідком активацію Акт-кіназного шляху [10], а це є характерним для клітин, що експресують Bcr/Abl p210, але не p190 [1].

Ще однією важливою особливістю мієлоїдних клітин є передчасне від'єднання від стромы кісткового мозку за рахунок порушення адгезії [1]. У цьому випадку важливу роль відіграють матриксні білки, до яких належить колаген 4 типу (COL4A1). Цей білок формує мереживні структури, що зв'язуються з клітинами через інтегрини та фібронектини за допомогою NC домену [11]. Оскільки BCR/ABL має

внутрішньоклітинне розташування, а колаген 4 знаходиться в позаклітинному матриксі, то доцільно припустити, що якщо взаємодія між ними має місце, то це відбувається на етапі дозрівання колагену 4.

Матеріали і методи

Для ампліфікації послідовності кортактину було підібрано праймери CTTN fwd (5'-tatagaattcAGATGTGGAAGCTTCAGCAG) та CTTN rev (5'-tatagatccAAAGAAGGCCTGATCTGTAGTG). Для ампліфікації послідовності бета-тубуліну було підібрано праймери TUBB fwd (5'-TTAACCATGAGGGAATCGTGC) TUBB rev (5'-TAAGGGAAGTGAAGCCTGAG). Матрицею для підбору праймерів та ПЛР служили генетичні конструкції pOTB7-COR (люб'язно надана Pontus Aspenstrom, Швеція) та pCMV-SPORT6-TUBB (Open Biosystems), що містять кДНК цілових послідовностей. Для ампліфікації USP1 було підібрано праймери USP1 fwd (AATTGCCTGGTGTACATACCTAGTG) та USP1 rev (GAGAGACCAATAATATCCAGTAGC). в якості матриці використано генетичну конструкцію із банку плазмід відділу Молекулярної генетики ІМБГ НАНУ (pCMV-XL5-USP1). Підбір праймерів проводився за допомогою програми PerlPrimer. Компоненти ПЛР були відповідно умовам виробника (Thermo Scientific) з використанням Pfu полімерази. Створення генетичних конструкцій для експресії цільових послідовностей та рестрикційний аналіз були змодельовані програмою Serial Cloner 2.6.1. Для клонування ампліфіковані послідовності кортактину та бета-тубуліну було лігровано в вектор pBluescriptSKII+ по сайтам EcoRI-BamHI та EcoRV відповідно. Після цього, послідовність кортактину було вирізано з pBluescriptSKII+ по сайтам EcoRI-NotI та лігвано у вектор pGEX4T2, а також вирізано по сайтах EcoRI-BamHI та лігвано по цим же сайтам у вектори pCMV-мус та pECFP-C3. Послідовність бета-тубуліну було вирізано з pBluescriptSKII+ та лігвано у вектор pCDNAHisMaxC по сайтах SalI(затуплений)/EcoRV-NotI, у вектор pGEX4T3 по сайтах SalI-NotI та у вектор pECFP-C3 по сайтах HindIII-EcoRI. Кодуючу послідовність цитокератину 10 було вирізано з вектора pCMV-SPORT6-K10 (Open biosystems) по сайтам EcoRI-NotI та лігвано у вектори pCMV-NA та pGEX4T2 по цим же сайтам. Для лігування у вектор pECFP-C3 послідовність цитокератину 10, вирізану з вектора pCMV-SPORT6-K10, було затуплено фрагментом

Кленова по NotI сайту, а вектор рЕСFP-C3 було розрізано по EcoRI-BamHI та затуплено по BamHI сайту. Послідовність альфа 1 поліпептидного ланцюгу колагену 4 типу було вирізано з вектора рCMV-SPORT-COL4A1 (Open Biosystems) по сайтах AscI-HindIII та лігвано у вектор рЕСFP-C1 по затупленому сайту XhoI та HindIII. Послідовність RH домену було вирізано з вектора рET32a-RH, створеного у нашому відділі, та лігвано у рmCitrine-C1 по BmHI/BglII-HindIII та у рCMV-Tag2b по BamHI – HindIII. Для перевірки наявності та орієнтації вставки було використано метод аналітичного розрізання ендонуклеазами рестрикції за умовами виробника. Для еукаріотичної експресії було використано плазмиди рJ3H-FBP17 та рEGFP-C3-RH, взяті з банку плазмід відділу молекулярної генетики ІМБГ НАНУ. Трансфекція клітин 293T конструкціями рJ3H-FBP17 та рEGFP-C3-RH була проведена за допомогою Turbofect (Thermo Scientific) за умовами виробника. Коїмунопреципітація здійснювалась за допомогою Protein G сефарози за протоколом E. Goldemis. Вестерн-блотинг був проведений за стандартним протоколом.

Результати та обговорення

Всі напрацьовані методом ПЛР цільові послідовності були очікуваного розміру: USP1 – 2500 п.н., TUBB – 1400 п.н., CTTN – 1600 п.н. (рис. 1).

Після лігування послідовностей TUBB, CTTN та USP1 у вектор рBluescriptSKII(+) наявність вставки перевірялась аналітичним розрізанням ендонуклеазами рестрикції та ПЛР. Після підтвердження плазмиди були просеквензовані та підтверджена їх ідентичність очікуваним послідовностям за допомогою порівняння результатів секвенсу з цільовою послідовністю у програмі Serial Cloner. Відповідність отриманих бактеріальних та еукаріотичних експресуючих векторів також була підтверджена за допомогою аналітичного розрізання (рис. 2) та секвенування.

Відповідність насинтезованих білків при еукаріотичній експресії була підтверджена ПАГЕ та вестерн-блотингом зі специфічними антитілами. За допомогою коїмунопреципітації

та вестерн-блоту було підтверджено взаємодію між FBP-17 та RH (рис. 3).

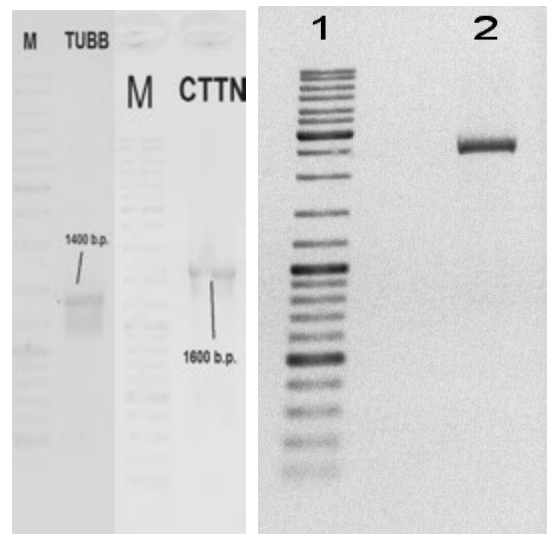


Рис. 1. Ампліфікати цільових послідовностей. М, 1 – маркер молекулярної маси Gene Ruler, TUBB – β -тубулін, CTTN – кортактин

Отже, можна стверджувати, що BCR/ABL може зв'язуватись з FBP17 через RH домен та відігравати роль в сигналінгу та реорганізації мембрани та примембранного цитоскелету при клатрин-опосередкованому ендоцитозі. Окрім цього, отримані конструкції можна буде використати для бактеріальної та еукаріотичної експресії та визначення наявності білок-білкової взаємодії між RH доменом та USP1, CTTN, TUBB, KRT10, COL4A1 за допомогою вестерн-болту та флуоресцентної мікроскопії.

Висновки

1. Створено генетичні конструкції для бактеріальної експресії: рGEX4T-3-TUBB, рGEX4T-2-KRT10, рGEX4T2-CTTN.

2. Створено генетичні конструкції для еукаріотичної експресії: рCMV-HA-USP1, рЕСFP-C1-COL4A1, рЕСFP-C3-KRT10, рЕСFP-C3-TUBB, рЕСFP-C3-CTTN, рCMVmyc-CTTN, рсDNA4HisMaxC-TUBB, рCMV-HA-KRT10.

3. Показано, що RH домен BCR здатен взаємодіяти з FBP17 в еукаріотичних клітинах.

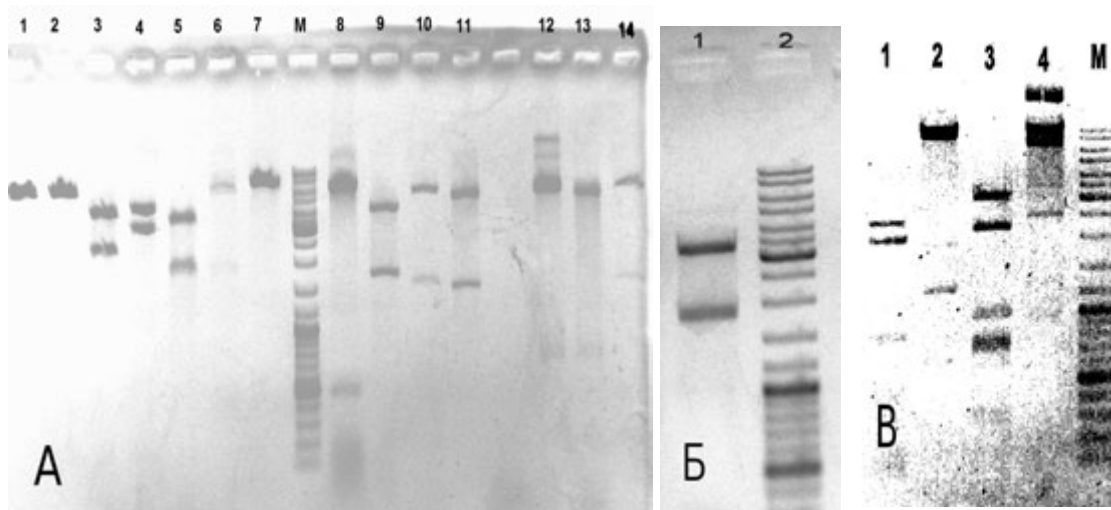


Рис. 2. Рестрикційний аналіз отриманих генетичних конструкцій. А: 1-2 – pECFP-C3-KRT10 (EcoRI); 3 – pCMV-HA-KRT10 (EcoRI-NotI); 4 pGEX4T2-KRT10(EcoRV); 5 – pBluescriptSKII-CTTN (EcoRI-NotI); 6 – pGEX4T2-CTTN (EcoRI-NotI); 7 – pECFP-C3-CTTN (SmaI); 8 – pCMV-мус-CTTN (XhoI); 9 – pcDNA4HisMaxA-CTTN (EcoRI-NotI); 10 – pGEX4T3 –TUBB (Sall-NotI); 11 – pECFP-C3-TUBB (EcoRI – HindIII); 12 – pmCitrine-PH (Sall); 13 - pCMV-Tag2b – PH (Sall); 14 – pcDNAHisMaxC-TUBB (EcoRI); М – маркер молекулярної маси O'GeneRuler. Б: 1 – pCMV-HA-USP1 (HincII); 2 - маркер молекулярної маси O'GeneRuler. В: 1 – HhaI; 2 AccI; 3 – ApoI; 4 – непорізаний вектор; М – маркер молекулярної маси O'GeneRuler

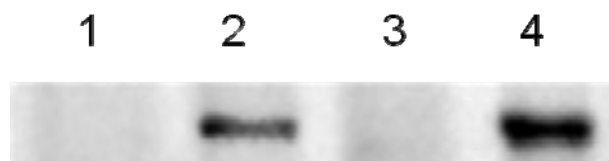


Рис. 3. Вестерн-блот аналіз взаємодії домену PH з FBP17 у культурі клітин 293T, котрансфектованих рJ3H-FBP17 та рEGFP-C3-PH, з анти-HA антитілами: 1 – лізат клітин 293T, які не було трансфектовано; 2 – лізат клітин 293T, які було котрансфектовано рEGFP-PH та рJ3H-FBP17; 3 – лізат клітин 293, які було котрансфектовано рEGFP-PH та порожнім рJ3H; 4 – коімунопреципітація EGFP-PH з HA-FBP17

Література

1. Charella A. Chronic Myeloid Leukaemia Biology and Treatment // Martin Dunitz Ltd. – 2001. – P. 3–39.
2. Miroschnychenko D., Dubrovskaya A., Maliuta S., Telegeev G., Aspenström P. Novel role of pleckstrin homology domain of the Bcr-Abl protein: Analysis of protein-protein and protein-lipid interactions // Experimental Cell Research – 2010. – 316. – P. 530–542.
3. Taylor M.J., Perrais D., Merrifield C.J. A High Precision Survey of the Molecular Dynamics of Mammalian Clathrin-Mediated Endocytosis // PLoS Biology. – 2011. – 9. – P. 1–23.
4. Takano K., Toyooka K., Suetsugu S. EFC/F-BAR proteins and the N-WASP-WIP complex induce membrane curvature-dependent actin polymerization // The EMBO Journal. – 2008. – 27. – P. 2817–2828.
5. Garcıa-Santisteban E., Peters G.J., Giovannetti E., Rodriguez J.A. USP1 deubiquitinase: cellular functions, regulatory mechanisms and emerging potential as target in cancer therapy // Molecular Cancer. – 2013, 12:91.
6. Gatesman A.A., Weed S.A. Cortactin Branches Out: Roles in Regulating Protrusive Actin Dynamics // Cell Motil Cytoskeleton. – 2008. – 65, N 9. – P. 687–707
7. Cesareni M. et al. Modular Protein Domains // Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. – 2005. – P. 337–363.
8. Gunderson G.G., Cook T.A. Microtubules and signal transduction // Curr. Opin. in Cell Biol. – 1999. – 11. – P. 81–94.
9. Paramio J.M. A role of phosphorylation in the dynamics of keratin intermediate filaments // Europ. J. of Cell Biol. – 1998. – 78. – P. 33–43.

10. Paramio J.M., Segrelles C., Ruiz S., Jorcano J.L. Inhibition of Protein Kinase B (PKB) and PKC ж Cycle Arrest Mediates Keratin K10-Induced Cell // *Molecular and Cellular Biology*. – 2001. – 21. – P. 7449–7459.
11. Sudhakar A. et.al. Human 61 type IV collagen NC1 domain exhibits distinct antiangiogenic activity mediated by 61b1 integrin // *J. Clin. Invest.* – 2005. – 115. – P. 2801–2810.

GURIANOV D.S., LYSETSKA T.YU., ANTONENKO S.V., KRAVCHUK I.V., TELEGEEV G.D.

Institute of Molecular Biology and Genetics of NAS of Ukraine,

Ukraine, 03680, Kyiv, Zabolotnogo str., 150, e-mail: dmitriy.gurianov@gmail.com

ROLE OF PH DOMAIN OF BCR PROTEIN IN CELLULAR PROCESSES THAT DETERMINE THE PHENOTYPE OF Ph⁺-POSITIVE MYELOPROLIFERATIVE DISORDERS

Aims. Three forms of fusion protein BCR/ABL differ by the presence or absence of PH and DH domains of BCR protein and cause different phenotypes of myeloproliferative disorders. To date, 23 proteins-candidates were identified as possible interaction partners of PH domain of BCR protein. Among them are different functional groups, such as cytoskeletal proteins, those involved in reorganization of cytoskeleton and clathrine-mediated endocytosis, matrix proteins and proteins involved in inhibition of proteolytic degradation. Therefore it is crucial to verify those interactions with more sensible and reliable methods as this will give clue to the functional differences, which lead to onset of different disorders. **Methods.** We used restriction enzyme-based ligation, coimmunoprecipitation and western-blot for creation of genetic constructs and verification of protein-protein interactions between PH domain of BCR and putative partners. **Results.** Different genetic constructs were created, that will be used for the expression of target sequences (USP1, CTTN, TUBB, KRT10, COL4A1) in bacterial and mammalian expression systems. Also we demonstrate that FBP17 protein interacts with PH domain in mammalian cell line 293T. **Conclusions.** Demonstrated interaction of PH domain and FBP17 shows its' important role in endocytosis and related cytoskeleton organization. All derived genetic constructs will be used in future research to verify interaction of target sequences with PH domain of BCR by far-Western blot, coimmunoprecipitation and fluorescent microscopy. It will be important in the future to check whether full-length BCR/ABL p210 interacts with USP1, CTTN, TUBB, KRT10, COL4A1, and FBP17, to study how it affects their phosphorylation state, and to determine their localization in the cell.

Key words: chronic myelogenous leukemia, myeloproliferative disorders, BCR/ABL, endocytosis, cytoskeleton reorganization, proteasomal degradation.

УДК 577.352.3:616-006.04:57.02:661.859

ДИБКОВА С.М., ГРУЗІНА Т.Г., РЄЗНІЧЕНКО Л.С., УЛЬБЕРГ З.Р.

Інститут біологічної хімії ім. Ф.Д. Овчаренка НАН України,

Україна, 03142, м. Київ, бульв. Академіка Вернадського, 42, e-mail: sdybkova@gmail.com

ВЗАЄМОДІЯ НАНОЧАСТИНОК ЗОЛОТА ТА СРІБЛА З ПЛАЗМІДНОЮ ДНК

Вивчення особливостей впливу наночастинок металів на генетичний апарат живої клітини є одним з актуальних завдань сучасної нанобіотехнології. Його вирішення відкриває нові перспективи у практичному застосуванні наночастинок металів [1, 2]. Відомо, що наночастинки золота є перспективними засобами діагностики та адресної доставки лікарських засобів у кардіології, онкології, а наночастинки срібла – ефективні антимікробні агенти. [3, 4].

Раніше нами було показано генотоксичну дію наночастинок золота розміром 20 нм та її відсутність для наночастинок золота розміром

30 нм, наночастинок срібла розмірами 30 та 50 нм. [5]. У зв'язку з цим виник ряд питань пов'язаних з впливом наночастинок металів на ДНК залежно від їх природи та розміру.

Відомо, що однією із важливих характеристик плазмід є їх здатність елімінуватися із бактеріальної клітини під дією певних хімічних речовин [6]. Перспективним підходом до вирішення проблеми подолання стійкості до антибіотиків у клінічних ізолятів збудників інфекційних захворювань є використання хімічних речовин, які забезпечують ефективну елімінацію плазмід антибіотикорезистентності (R-плазмід). Для R-

плазмідовмісних сальмонел, шигел і ешерихий такою ДНК-тропною речовиною є акридиновий жовтогарячий. Однак ця речовина є відомим мутагеном, тому її застосування в якості лікарського засобу є неможливим. Виходячи з отриманих нами даних щодо генотоксичної дії наночастинок металів, можна прогнозувати і їх здатність елімінувати плазмід, що відкриває значні перспективи в пошуку ефективних шляхів подолання антибіотикорезистентності.

З огляду на вище сказане, вивчення взаємодії наночастинок золота і срібла з плазмідною ДНК представляє значний теоретичний та практичний інтерес.

Матеріали і методи

Наночастинок золота синтезували шляхом відновлення аурату калію ацетоном або етанолом методом Девіса. Вихідною речовиною виступала золотохлористоводнева кислота $H[AuCl_4] \cdot 4H_2O$, з якої при взаємодії з карбонатом калію у водному розчині утворювався аурат калію. Наночастинок срібла отримували конденсаційним методом шляхом відновлення солей срібла. [7]. Розмір отриманих наночастинок визначали з використанням методу лазерно-кореляційної спектроскопії (ЛКС) за допомогою спектрометра Zetasizer-3 («Malvern Instruments Ltd», Великобританія).

В роботі було використано стерильні водні препарати наночастинок металів: золота – розміром 20 та 30 нм у вихідних концентраціях: 20 нм – 11,6 мкг/мл, 30 нм – 19,2 мкг/мл; срібла розміром 30 нм у концентрації 86,0 мкг/мл за металом.

Для вивчення взаємодії ДНК з наночастинками золота та срібла було використано плазмиду pUC19.

Плазмідна рUC19 знаходилася в *E. coli* XL1-Blue (Stratagene).

Для отримання препаратів плазмідної ДНК використовували метод лужного лізису за Бірнбоймом і Дої [8], розчиняли в стерильній дистильованій воді та зберігали при $-20^{\circ}C$.

Інкубацію препаратів плазмідної ДНК з наночастинками золота і срібла проводили при $24^{\circ}C$ протягом 30–60 хвилин. Інкубаційна суміш складалася з препарату плазмід, розведеного очищеною стерильною дистильованою водою, та стерильного водного препарату наночастинок металів. Концентрація наночастинок золота в інкубаційних сумішах складала: 20 нм – 5,8 мкг/мл за металом, 30 нм – 9,6 мкг/мл за металом; а наночастинок срібла розміром 30 нм – 43,0 та 17,0 мкг/мл за металом.

Електронно-мікроскопічний аналіз

препаратів ДНК з наночастинками золота та срібла здійснювали за допомогою трансмісійного електронного мікроскопу JEOL JEM-1230 Electron Microscope («Tokyo Boeki Ltd», Японія).

Елімінацію плазмід pUC19 з клітин бактерій *E. coli* здійснювали: шляхом спонтанної елімінації та шляхом обробки плазмідовмісних бактерій наночастинками золота та срібла з подальшою контрелекцією.

Результати і обговорення

Популярність позахромосомних факторів спадковості – плазмід, як експериментальних моделей, пояснюється простотою методичних прийомів роботи з ними та наявною детальною характеристикою їх генетичної природи, молекулярної структури і регуляції функцій. Плазмідна рUC19, добре відома як рекомбінантна плазмід, що використовується для клонування. Вона характеризується високою копійністю в бактеріальних клітинах та має гени антибіотикорезистентності до ампіциліну.

Для оцінки впливу наночастинок металів на структурний стан плазмідної ДНК здійснювали інкубацію плазмід рUC19 з наночастинками золота розміром 20 і 30 нм в концентраціях 5,8 і 9,6 мкг/мл за металом та наночастинками срібла розміром 30 нм в концентраціях 43,0 і 17,0 мкг/мл за металом. З інкубаційних сумішей готували препарати для електронної мікроскопії без додаткового контрастування.

Рисунок 1 відображає характер взаємодії наночастинок золота розміром 20 нм з плазмідною рUC19.

Так, на рисунку 1, А показано можливість розміщення наночастинок золота розміром 20 нм на плазміді рUC19. Спостерігалися структурні зміни рUC19 від глобул (рис. 1, С) до релаксованих форм (рис. 1, А). Характерною у даному випадку була агрегація наночастинок золота. Ми припускаємо, що це може бути наслідком присутності невеликої кількості білка, яка залишилася після виділення плазмідної ДНК та модифікувала поверхню досліджуваних наночастинок і спричинила їх агрегацію. Цікавим є те, що спочатку наночастинок золота викликали релаксацію плазмід, розміщувалися на її нитках і ставали точками їх агрегації.

На рисунку 2 наведені електронно-мікроскопічні зображення, отримані в результаті аналізу препаратів плазмід рUC19 після їх взаємодії з наночастинками золота розміром 30 нм.

Взаємодія наночастинок золота розміром 30 нм з плазмідною рUC19 теж призводить до переходу плазмиди в релаксовану форму. Наночастинки розміщуються на нитці плазмиди нерівномірно. Однак у цьому випадку наночастинки золота не мали тенденції до агрегації (рис. 2).

Таким чином, наночастинки золота розміром 20 нм та 30 нм викликають релаксацію плазмиди рUC19 та розміщуються не упорядковано на її нитках. Наночастинки золота

20 нм, на відміну від наночастинок 30 нм, агрегуються на релаксованій плазміді.

Особливості взаємодії препаратів плазмиди рUC19 з наночастинками срібла розміром 30 нм відображені на рисунку 3.

Видно, що наночастинки срібла 30 нм призводять до релаксації плазмиди рUC19, при цьому розміщуючись на ній з певною періодичністю. Характерним при цьому є, як і у випадку з наночастинками золота 20 нм, агрегація наночастинок.

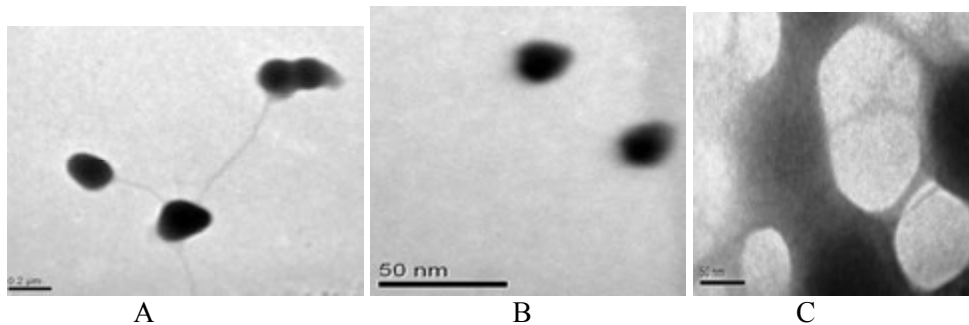


Рис. 1. Електронно-мікроскопічні зображення взаємодії наночастинок золота розміром 20 нм з плазмідною рUC19. А – препарат плазмиди рUC19 з наночастинками золота розміром 20 нм; В – контроль, препарат наночастинок золота розміром 20 нм; С – контроль, препарат плазмиди рUC19

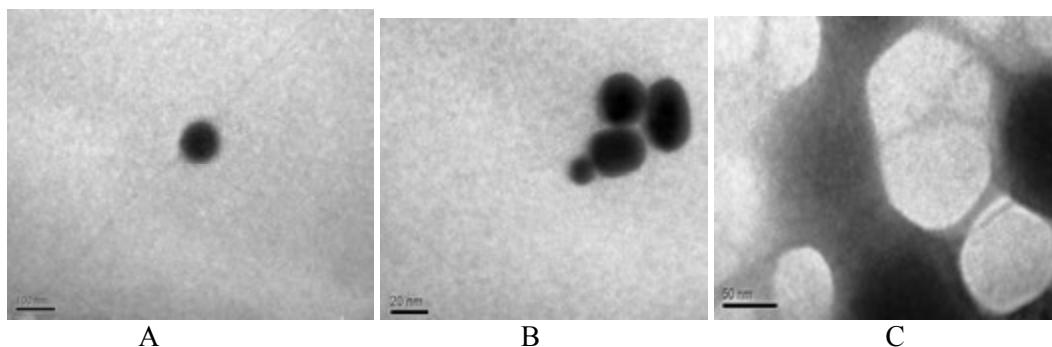


Рис. 2. Електронно-мікроскопічні зображення взаємодії наночастинок золота розміром 30 нм з плазмідною рUC19. А – препарат плазмиди рUC19 з наночастинками золота розміром 30 нм; В – контроль, препарат наночастинок золота розміром 30 нм; С – контроль, препарат плазмиди рUC19

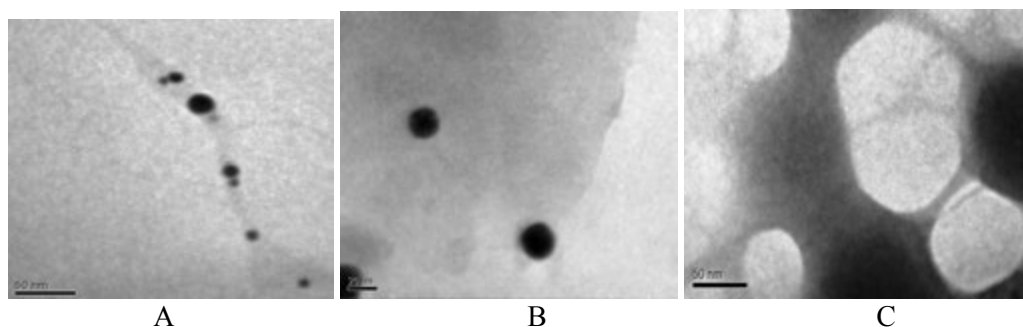


Рис.3. Електронно-мікроскопічні зображення взаємодії наночастинок срібла розміром 30 нм з плазмідною рUC19. А – препарат плазмиди рUC19 з наночастинками срібла розміром 30 нм; В – контроль, препарат наночастинок срібла розміром 30 нм; С – контроль, препарат плазмиди рUC19

Маючи ряд експериментальних доказів дії наночастинок золота і срібла на плазмиду pUC19, яка несе детермінанту антибіотикостійкості, було проведено дослідження щодо елімінуючої дії наночастинок металів. Елімінацію плазмиди pUC19 з клітин здійснювали: шляхом культивування плазмидовмісних бактерій *E. coli* на середовищі МПА без антибіотика (спонтанна елімінація) та при обробці плазмидовмісних бактерій наночастинами золота та срібла.

Так, шляхом культивування бактерій *E. coli* XL1-Blue (pUC19) в МПБ без антибіотика ампіциліну протягом 18 годин було встановлено частоту спонтанної елімінації у випадку плазмиди pUC19, яка становила 37 % (табл.).

При обробці плазмидовмісних бактерій *E. coli* XL1-Blue (pUC19) наночастинами золота розміром 20 нм в концентрації 5,8 мкг/мл по металу протягом 18 годин, частота елімінації становила 89 %. А у випадку використання в ролі елімінуючого агента наночастинок золота розміром 30 нм (9,6 мкг/мл по металу) частота елімінації складала 91 %.

Елімінація наночастинами срібла в концентрації 17 мкг/мл плазмиди pUC19 із бактерій штаму *E. coli* XL1-Blue (pUC19) показала високу частоту елімінації: pUC19 елімінувалася з частотою 98 %.

Таким чином, проведені дослідження продемонстрували високу ефективність наночастинок золота і срібла в якості елімінуючих агентів плазмід антибіотико-

резистентності. Однак, враховуючи частоту спонтанної елімінації дослідженої плазмиди pUC19, для остаточного висновку щодо елімінуючих властивостей досліджених наночастинок металів необхідно провести подальші дослідження із залученням плазмидовмісних резистентних клінічних ізолятів збудників захворювань.

Висновки

Наночастинки золота (20 і 30 нм) і наночастинки срібла (30 нм) змінюють структурний стан плазмиди pUC19, сприяючи її релаксацію.

Наночастинки золота (20 і 30 нм) і наночастинки срібла (30 нм) викликають високу частоту елімінації плазмиди pUC19 з бактерій штаму *E. coli* XL1-Blue (pUC19).

Виконані дослідження щодо елімінуючих властивостей досліджених наночастинок металів відкривають перспективи подальших досліджень щодо подолання антибіотико-резистентності у клінічних ізолятів збудників різних захворювань.

Робота підтримана проектом 0112U002927 «Розробка та створення високоефективних антимикробних агентів на основі наночастинок металів та їх кон'югатів з антибіотиками для лікування нозокоміальних інфекцій» цільової комплексної програми фундаментальних досліджень НАН України «Фундаментальні проблеми створення нових речовин і матеріалів хімічного виробництва».

Таблиця. Частота елімінації плазмиди pUC19 з *E. coli* XL1-Blue (pUC19) при обробці бактерій наночастинами золота та срібла

Тип елімінації плазмід	Частота елімінації (%)
Спонтанна елімінація <i>E. coli</i> XL1-Blue (pUC19)	37
Елімінація наночастинами золота 20нм плазмиди pUC19 з <i>E. coli</i> XL1-Blue (pUC19)	89
Елімінація наночастинами золота 30нм плазмиди pUC19 з <i>E. coli</i> XL1-Blue (pUC19)	91
Елімінація наночастинами срібла 30нм плазмиди pUC19 з <i>E. coli</i> XL1-Blue (pUC19)	98

Література

- West J.L., Halas N.J. Application of nanotechnology to biotechnology // Curr. Opin. Biotechnol. – 2000. – 11. – P. 215–217.
- Sahoo S.K., Parveen S., Panda J.J. The present and future of nanotechnology in human health care // Nanomedicine. – 2007. – N 3. – P. 20–31.
- Чекман І.С. Нанофармакологія. – Київ: ПВП «Задруга», 2011. – 422 с.
- Чекман І.С., Ульберг З.Р., Маланчук В.О., Горчакова Н.О., Зупанець І.А. Нанонаука, нанобіологія, нанофармація. – К.: Поліграф плюс, 2012. – 328 с.

5. Кундієв Ю.І., Ульберг З.Р., Трахтенберг М.І., Чекман І.С., Грузіна Т.Г., Дибкова С.М., Резніченко Л.С., Марченко М.Л. Проблема оцінки потенційних ризиків наноматеріалів та шляхи її вирішення // Доповіді НАН України. – 2013. – № 1. – С. 177–183.
6. Пехов А.П. Основы плазмидологии. – Москва, Издательство Российского Университета Дружбы Народов, 1996 – 230 с.
7. Перцов А.В. Методические разработки к практикуму по коллоидной химии. – М.: Изд-во МГУ, 1976. – 132с.
8. Birnboim H.C., Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA // Nucleic Acids Res. – 1979. – 7, N 6. – P. 1513–1523.

DYBKOVA S. M., GRUZINA T.G., RIEZNICHENKO L.S., ULBERG Z.R.

F.D. Ovcharenko Institute of Biocolloidal Chemistry of Natl. Acad. Sci. of Ukraine, Ukraine, 03142, Kyiv, Vernadskogo av., 42, e-mail: sdybkova@gmail.com

INTERACTION OF GOLD AND SILVER NANOPARTICLES WITH PLASMIDS DNA

Aims. Unique properties of metal nanoparticles and their biological activity open wide perspectives for their using in medicine. Studies of the peculiarities of metal's nanoparticles interaction with nucleic acids of plasmids has fundamental importance in the investigation of metal's nanoparticles influence on genetic complex of cells. **Methods.** Interaction of gold and silver nanoparticles different size with plasmids has been performed on the plasmid *pUC19* by the method of electron microscopy. Elimination of the plasmid *pUC19* was performed by culturing the bacteria *E. coli* XL1-Blue (*pUC19*) with gold and silver nanoparticles within 18 hours. **Results.** Gold nanoparticles (20 and 30 nm) causing relaxation of plasmid placed not sorted on it's threads. Moreover, gold nanoparticles with size 20 nm, in contrast to the 30 nm nanoparticles, aggregated an untwisted plasmid. Silver nanoparticles with size 30 nm leads to destructive changes of plasmid DNA, while being located on it at regular intervals. Gold (20 and 30 nm) and silver (30 nm) nanoparticles cause a high frequency of plasmid's *pUC19* elimination. **Conclusions.** Interaction of gold (20 and 30 nm) and silver nanoparticles (30 nm) with plasmid *pUC19* resulting in plasmid's relaxation. Effectively eliminates of plasmid's *pUC19* has been performed by gold (20 and 30 nm) and silver (30 nm) nanoparticles. **Key words:** gold nanoparticles, silver nanoparticles, plasmid, DNA, elimination.

УДК 577.112.82;543.545.2

ДИКУН М.О., СІРАНТ Л.В., ПОЧИНОК В.М., ЗАВАЛЬНА Г.В.

Інститут фізіології рослин і генетики НАН України, Україна, 03022, м. Київ, вул. Васильківська, 31/17, e-mail: bal.mascha@yandex.ua

ПОРІВНЯЛЬНА ЕФЕКТИВНІСТЬ ВИКОРИСТАННЯ МЕТОДІВ ОЦІНКИ ПИВОВАРНИХ СОРТІВ ЯЧМЕНЮ ЗА СПЕКТРОМ ГОРДЕЇНІВ

Сучасна пивоварна і солодова промисловість ставить високі вимоги до сортової чистоти зерна ячменю. Одним із основних методів лабораторного сортового контролю зерна ячменю є електрофорез спирторозчинних запасних білків – гордеїнів. У зв'язку з цим, першочерговим є пошук методик електрофорезу, які мають високу розподільчу здатність, зручність, доступність та рентабельність. З метою вирішення проблеми була поставлена задача порівняти два широко застосовані методи електрофорезу за методикою Бжезинського та Поперелі [1, 2].

Матеріали і методи

Матеріалом для дослідження були сорти ярого ячменю, отримані від солодових та пивоварних підприємств, сільськогосподарських господарств та приватних підприємців різних областей України. Дані сорти занесені до Державного реєстру.

Досліджували гордеїни 100 довільно вибраних зерен ячменю. Зернівки подрібнювали, заливали 70% етанолом. Отриманий екстракт центрифугували та висушували у сушильній шафі при 30–40°C. Сухий залишок розчиняли буфером, відповідно методу (табл. 1).

Різниця в умовах проведення процедур електрофорезу відмічена у табл. 2.

Таблиця 1. Порівняний компонентний склад екстрагуючих буферів

Компонент, одиниця виміру	за Бжезинським	за Поперелею
Сечовина, г	33	48
Оцтова кислота, мл	-	0,6
Меркаптоетанол, мл	-	5
Піронін, мг	1	1

Таблиця 2. Порівняний склад гелів та електродних буферів для електрофорезу гордеїнів

Гелі	Метод	
	за Бжезинським	за Поперелею
концентруючий	Застосовується *	не застосовується
розділяючий	застосовується	застосовується
Склад розділяючого гелю		
Акриламід	+	+
Метиленбісакриламід	+	+
Сечовина	+	+
Оцтова кислота	+	+
Гліцин	-	+
Залізо сірчанокисле	+	+
Аскорбінова кислота	+	+
Склад електродного буферу		
Мурашина кислота	+	-
Оцтова кислота	-	+
Гліцин	-	+

Примітка: * до складу концентруючого гелю, крім зазначених речовин, входить гістидин.

Каталізаторами виступали ТЕМЕД та 10% розчин персульфату амонію. Тривалість електрофоретичного фракціонування гордеїнів 4 години. Після розділення гелі фарбували протягом 10–15 годин. Склад фарби: Кумасі R – 250–300 мг, етиловий спирт – 70 мл, ацетон – 100 мл, льодяна оцтова кислота – 60 мл, трихлороцтова кислота – 60 г, дистильована вода – до 1 літра. Після фарбування гелі відмивали у воді протягом дня.

Результати і обговорення

Проводився аналіз сортової чистоти партій зерна пивоварного ячменю. Були отримані електрофоретичні спектри гордеїнів різних сортів (рис. 1).

Як видно з рис. 1, а, б, в обох випадках у спектрі гордеїнів виділяються три основні блоки компонентів різні за рухливістю. Зона малорухливих компонентів – контролюється локусом HrdA, зона середньорухливих компонентів – контролюється локусом HrdB і зона швидко рухливих компонентів – контролюються локусом HrdC [2]. Вказані зони

поділу чіткіше проявляються при використанні методики Поперелі. Разом з тим метод розділення гордеїнів за Бжезинським має ряд переваг порівняно з методикою Поперелі, бо не потребує використання такої токсичної речовини, як меркаптоетанол, кількокротного відмивання шроту спиртом, кип'ятіння проб тощо.

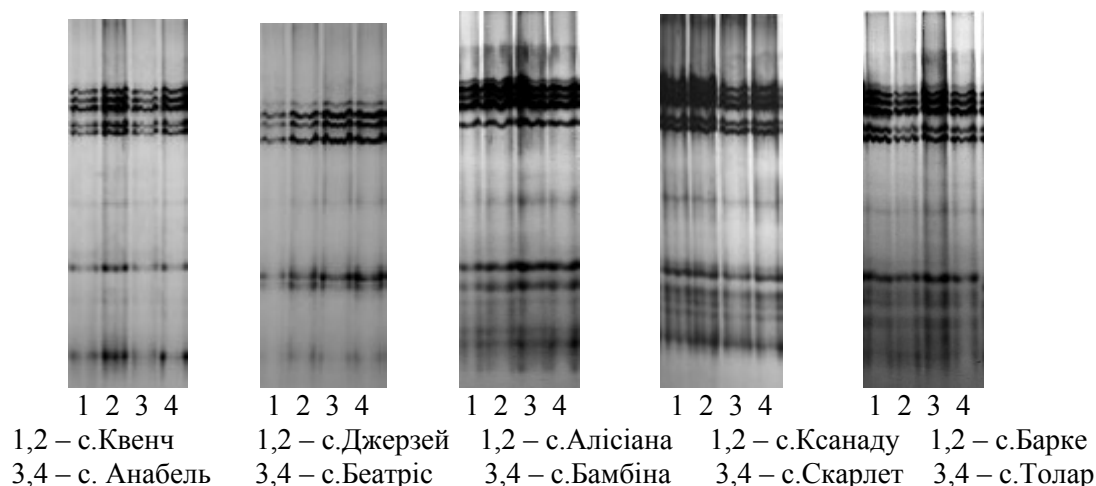
Електрофорез гордеїнів ячменю, як основний метод лабораторного сортового контролю, має певні обмеження. Ряд сортів ячменю за спектром гордеїнів не відрізняється. У результаті селекційної діяльності людини, відбувається звуження генетичної різноманітності [3]. Для таких сортів слід проводити додатково електрофорез альбумінів.

Висновки

1. Обидва методи електрофорезу дають чітку картину розділення гордеїнів ячменю та можуть застосовуватись у рівній мірі.

2. Електрофорез за методом Бжезинського є більш методично простим та екологічно безпечним.

Методика Бжезинського (а)



Методика Поперелі (б)

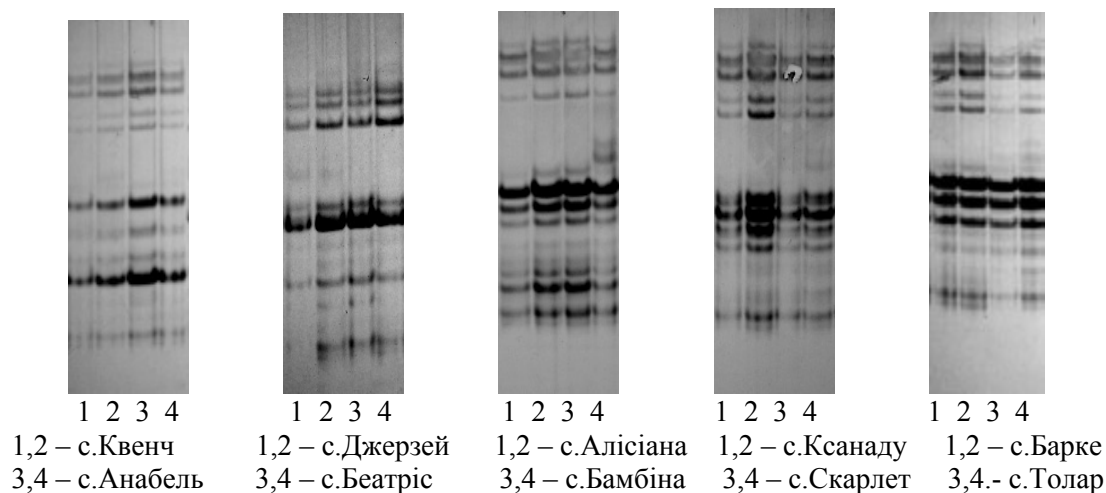


Рис. 1 (а, б). Електрофореграми гордеїнів ячменю за різними методиками

Література

1. Brzezinski W., Mendelewski P., Improved PAGA procedure for identification of wheat, triticale, barley and cultivar // XII Eucarpia Congress. – Göttingen, 1989. – P. 28.
2. Попереля Ф.А., Можаренко М.Н. Генетическая классификация гордеинов с помощью электрофореза в ПААГ // Цитология и генетика. – 2001. – 35, № 5. – С. 20–24.
3. Алтухов Ю.П., Пухальский В.А., Политов Д.В., Калабушкин Б.А., Упельник В.П. Динамика популяционных генофондов растений // В кн. Динамика популяций генофондов при антропогенных воздействиях / под ред. Ю.П. Алтухова. – М.: Наука, 2004. – С. 295–413.

DYKUN M.O., SIRANT L.V., POCHINOK V.M., ZAVALNA G.V.

Institute of Plant Physiology and Genetics,

Ukraine, 03022, Kyiv, Vasylykivska str., 31/17, e-mail: bal.mascha@yandex.ua

THE COMPARATIVE EFFECTIVENESS OF TWO ELECTROPHORESIS PROCEDURES OF BARLEY HORDEINS FOR DETECTION OF BREWING VARIANTS

Aims. It is known a lot of methods of the monitoring the genotypes peculiar features. The protein spectrum is often used as hybrid index in scientific selection procedures and in the practical experience. With the help of the electrophoresis the possibility to detect the distinct object appears. But there are various types of electrophoresis. So it is necessary to choose the most adequate among them. The effectiveness of two types

of electrophoresis (Brzezinski vs. Popereya) for the barley hordeins analysis was investigated. **Methods.** The original electrophoretic procedures were created. Hordeins were extracted from individual grain of several variants of brewing barley. **Results.** The hordein spectra were obtained after both procedures. There were no differences between electrophoregrams. Three protein zones were marked on each electrophoregram. But the brewing electrophoresis is less expensive. **Conclusion.** Electrophoresis of proteins is an effective method of laboratory quality control of barely grain.

Key words: hordeins, electrophoresis.

УДК 576.34:576.311.34:582.282.31

ДМИТРУК О.В.¹, СИБІРНИЙ А.А.^{1,2}

¹ Інститут біології клітини НАН України,

Україна, 79005, м. Львів, вул. Драгоманова, 14/16, e-mail: verbaolena@gmail.com

² Факультет біотехнології і мікробіології, Жешівський університет,

Польща, 35-601, м. Жешів, вул. Зелверовіца, 4, e-mail: sibirny@cellbiol.lviv.ua

КАТАБОЛІТНА ДЕГРАДАЦІЯ ФРУКТОЗО-1,6-БІСФОСФАТАЗИ У МЕТИЛОТРОФНИХ ДРІЖДЖІВ *PICHA PASTORIS* І *HANSENULA POLYMORPHA*

Глюконеогенез є високорегульованим клітинним процесом, шляхом якого дріжджі можуть продукувати глюкозу з альтернативних неферментативних джерел вуглецю, таких як ацетат, лактат, етанол, метанол, гліцерин. При перенесенні дріжджів на середовище, що містить глюкозу, утворення більшості глюконеогенезних ферментів репресуються на транскрипційному рівні, а вже наявні у клітині ферменти піддаються швидкій деградації і протеолізу, а вуглецевий метаболізм клітини

переходить на гліколітичний шлях [1].

Фруктозо-1,6-бісфосфатаза (ФВР) є ключовим ферментом глюконеогенезу, вона каталізує перетворення фруктозо-1,6-бісфосфату до фруктозо-6-фосфату, який згодом метаболізує до глюкозо-6-фосфату (рис. 1). ФВР синтезується, якщо клітини дріжджів ростуть на неферментативних джерелах вуглецю, на середовищі з глюкозою фермент швидко інактивується і деградує. Цей процес носить назву катаболітна деградація [2].

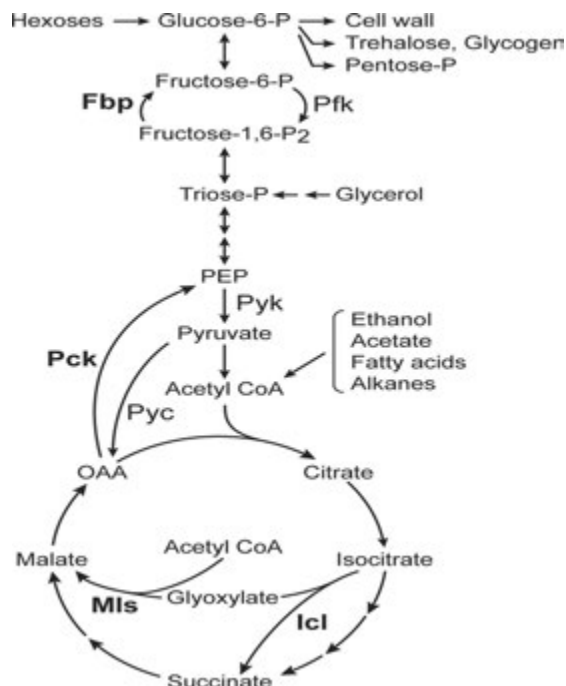


Рис. 1. Схема глюконеогенезу і гліколізу у дріжджів

У метилотрофних дріжджів, таких як *P. pastoris* і *H. polymorpha*, FBP також залучена у шляху метаболізму метанолу, тому дослідження катаболітної деградації FBP у цих дріжджів має значний науковий інтерес [3].

Матеріали і методи

Нуклеотидні послідовності досліджуваних дріжджових генів *P. pastoris* і *H. polymorpha* були знайдені в геномних базах даних: www.yeastgenome.org, <http://ergo.integratedgenomics.com/ERGO> і <http://genomeportal.jgi-psf.org/Hanpo2/Hanpo2.home.html>. Делеція гену FBP1 *P. pastoris* була отримана з допомогою використання ауксотрофного маркерного гена ZeoR. Підтвердження наявності делецій генів буде здійснено шляхом полімеразної ланцюгової реакції згідно стандартних протоколів дослідження [4]. Процедури клонування генів і підтвердження їхньої експресії будли проведені з використанням типових молекулярно-біологічних підходів: електрофорез нативних хромосомних ДНК (молекулярне каріотипування), рестрикційний аналіз, лігування ДНК, трансформація бактерій та дріжджів [4].

Приготування зразків для Вестерн-блот аналізу для дослідження деградації фруктозо-1,6-бісфосфатази було здійснено використовуючи попередньо описані протоколи досліджень [5]. Вестерн-блот аналіз було проведено згідно стандартних методик [4].

Визначення активності фруктозо-1,6-бісфосфатази було здійснено в безклітинних екстрактах дріжджів за умов індукції деградації згідно [6].

Результати та обговорення

На першому етапі роботи було визначено активність FBP у диких штамів дріжджів *P. pastoris* і *H. polymorpha*. Було показано, що після перенесення клітин із середовища, що містить метанол або етанол на середовище з глюкозою, FBP активність *P. pastoris* і *H. polymorpha* зменшувалася у 4,5 і 2 рази відповідно (рис. 2). Оскільки FBP метилотрофних дріжджів також задіяна у процесі утилізації метанолу, активність цього фермента на метанолі була у 3 і у 2 рази вищою, ніж на етанолі для *P. pastoris* і *H. polymorpha* відповідно. Активність FBP на глюкозі була у 10–13 разів нижчою, ніж на етанолі (рис. 3).

Дикі штами *P. pastoris* і *H. polymorpha* були проаналізовані шляхом Вестерн-блот гібридизації, використовуючи антитіла для FBP *S. cerevisiae* (рис. 4). Клітини дріжджів вирощували на середовищі з етанолом або метанолом у якості єдиного джерела вуглецю протягом 48 год, а потім переносили на середовище з глюкозою для індукції деградації FBP. Було показано, що FBP повністю деградує на середовищі з глюкозою після 5 годин інкубації клітин, попередньо-підрощених на глюконеогенезних субстратах (метанолі і етанолі) (рис. 2).

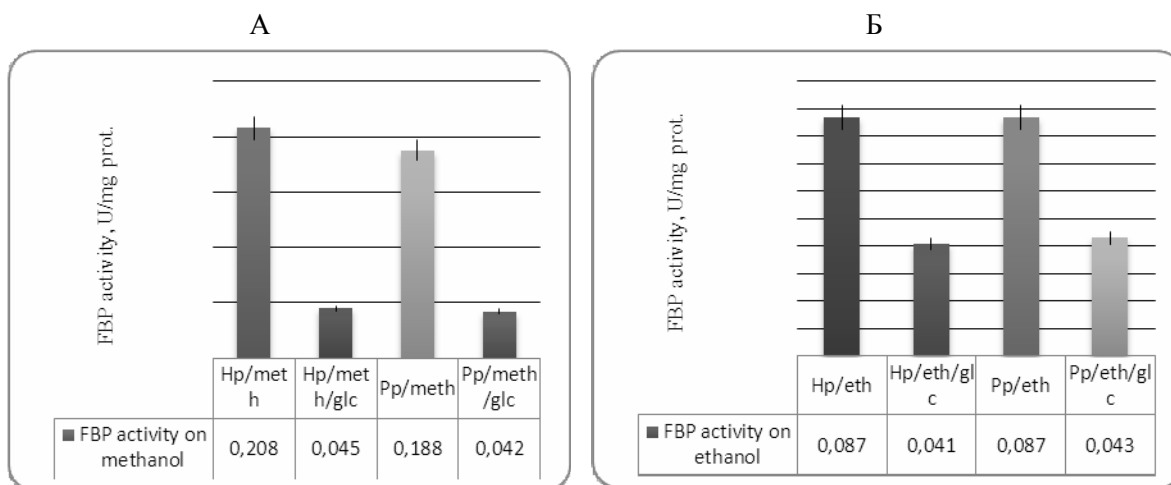


Рис. 2. Активність FBP у диких штамів дріжджів *P. pastoris* і *H. polymorpha* на середовищах, що містять метанол (А) або етанол (Б) у якості основного джерела вуглецю

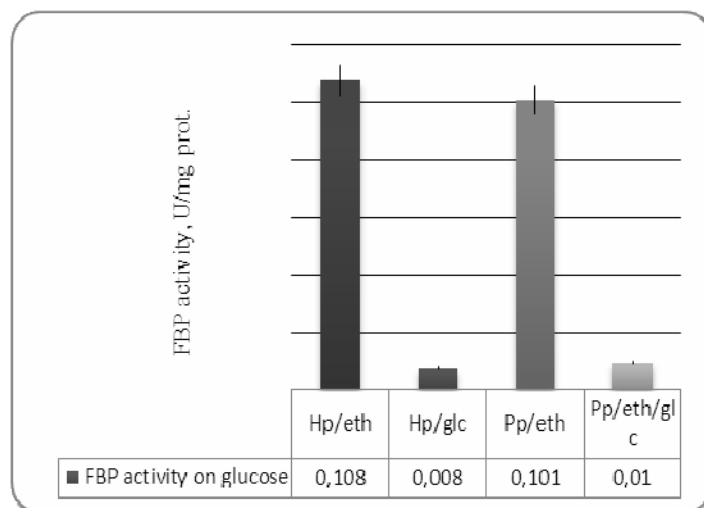


Рис. 3. Активність FBP у диких штамів дріжджів *P. pastoris* і *H. polymorpha* на середовищі, що містить етанол у якості основного джерела вуглецю

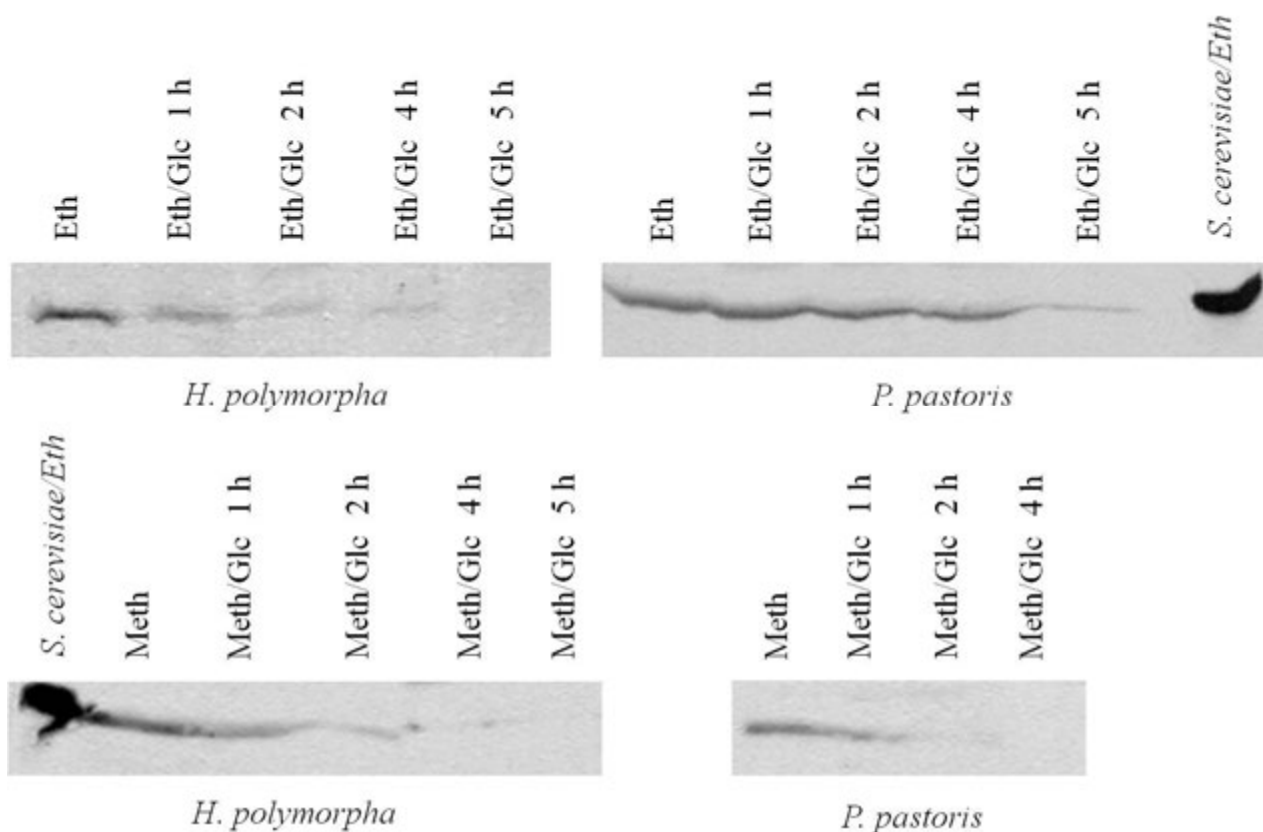


Рис. 4. Результати Вестерн-блот гібридизації диких штамів дріжджів *P. pastoris* і *H. polymorpha*

Наступним етапом роботи було конструювання плазмиди для делеції гена *FBP1* (рис. 5). Для цього ліву і праву фланкуючі ділянки гена *FBP1* було ампліфіковано за допомогою ПЛР і клоновано у плазмиду pUC57. Ген резистентності до норзеотречину було клоновано між фланкуючими ділянками. Цією плазмідною було трансформовано у дикий штам

P. pastoris GS200 і отримано норзеотречин-резистентні колонії дріжджів. Коректність делеції гена було підтверджено за допомогою ПЛР (рис. 6). Штами $\Delta fbp1$ не росли на середовищі з неферментативними джерелами вуглецю. Активність FBP у штамів $\Delta fbp1$ на гліцеролі і етанолі зменшилася у 2 рази, порівняно з диким штамом.

Для вивчення механізмів катаболічної деградації FBP було сконструйовано плазмиду для експресії гібридного гена *FBP* з геном *GFP* (ген, що кодує зелений флуорисцентний білок) під контролем власного FBP-промотора (рис. 7). Цією плазмидою, було трансформовано штам $\Delta fbp1$ і отримано колонії, здатні рости на середовищі без додавання гістидину. Отримані трансформанти були проаналізовані шляхом ПЛР, активність FBP у даних трансформантів становила 20% від активності фермента у дикого штаму дріжджів *P. pastoris* (рис. 8).

Висновки

1. Було показано, що FBP *P. pastoris* і *H. polymorpha* повністю деградує на середовищі з глюкозою після 5 годин інкубації клітин, попередньо підрощених на глюконеогенезних субстратах (метанолі і етанолі). Після

перенесення клітин із середовища, що містить метанол або етанол на середовище з глюкозою, FBP активність *P. pastoris* і *H. polymorpha* зменшувалася у 4,5 і 2 рази відповідно.

2. Було сконструйовано та проаналізовано штами дріжджів *P. pastoris* з делецією гена, що кодує *FBP1*. Активність FBP у штамі $\Delta fbp1$ на гліцеролі і етанолі зменшилася у 2 рази порівняно із диким штамом.

3. Для вивчення механізмів катаболічної деградації FBP було сконструйовано плазмиду для експресії гібридного гена *FBP1* з геном *GFP* (ген, що кодує зелений флуорисцентний білок) під контролем власного FBP-промотора. Активність FBP у цих трансформантів становила 20% від активності фермента у дикого штаму дріжджів *P. pastoris*.



Рис. 5. Схема плазмиди для делеції гена *FBPI* *P. pastoris*

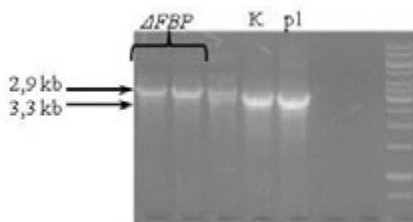


Рис. 6. Підтвердження коректності делеції гена *FBPI* у трансформантів штаму *P. pastoris* GS200 за допомогою ПЛР-аналізу

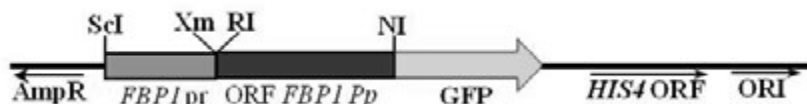


Рис. 7. Схема плазмиди для експресії гібридного гена *FBPI* з геном *GFP* під контролем власного FBP-промотора

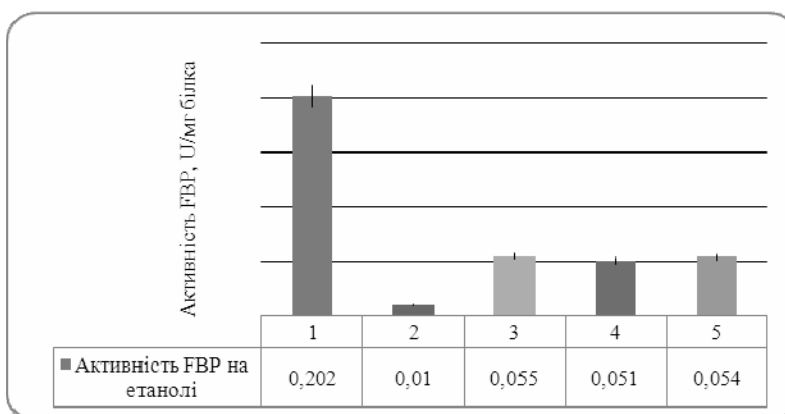


Рис. 8. Активність FBP у трансформантів штаму $\Delta fbp1$ плазмидою, для експресії гібридного гена *FBPI* з геном *GFP* під контролем власного FBP-промотора

Література

1. Regelman J., Schüle T., Josupeit F.S., Horak J., Rose M., Entian K.D., Thumm M., Wolf D.H. Catabolite degradation of fructose-1,6-bisphosphatase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: a genome-wide screen identifies eight novel GID genes and indicates the existence of two degradation pathways // *Mol Biol Cell*. – 2003. – 14 (4). – P. 1652–1663.
2. Shieh H.L., Chen Y., Brown C.R., Chiang H.L. Biochemical analysis of fructose-1,6-bisphosphatase import into vacuole import and degradation vesicles reveals a role for UBC1 in vesicle biogenesis // *J Biol Chem*. – 2001. – 276 (13). – P. 10398–10406.
3. Hung G.C., Brown C.R., Wolfe A.B., Liu J., Chiang H.L. Degradation of the gluconeogenic enzymes fructose-1,6-bisphosphatase and malate dehydrogenase is mediated by distinct proteolytic pathways and signaling events // *J. Biol Chem*. – 2004. – 279 (47). – P. 49138–49150.
4. Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual* [2nd ed.]. – Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. – 510 p.
5. Nazarko V.Y., Futej K.O., Thevelein J.M., Sibirny A.A. Differences in glucose sensing and signaling for pexophagy between the baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae* and the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* // *Autophagy*. – 2008. – 4 (3). – P. 381–384.
6. Gancedo C. Inactivation of 1,6-diphosphatase by glucose in yeast // *Journal of Bacteriology*. – 1971. – 107 (2). – P. 401–405.

DMYTRUK O.V.¹, **SIBIRNY A.A.**^{1,2}

¹ *Institute of Cell Biology, National Academy of Sciences of Ukraine, Ukraine, 79005, Lviv, Drahomanov str., 14/16, e-mail: verbaolena@gmail.com*

² *Department of Biotechnology and Microbiology, Rzeszow University, Poland, 35-601, Rzeszow, Zelwerowicza str., 4, e-mail: sibirny@cellbiol.lviv.ua*

CATABOLITE DEGRADATION OF FRUCTOSE-1,6-BISPHOSPHATASE IN METHYLOTROPHIC YEASTS *PICHA PASTORIS* AND *HANSEULA POLYMORPHA*

Aim. Fructose-1,6-bisphosphatase (FBPase) which is synthesized when cells are grown on non-fermentable carbon sources. When yeast cells are subsequently shifted to a glucose-containing medium, FBPase is rapidly inactivated and degraded. This process is called catabolite degradation. **Methods.** Standard molecular biological and biochemical methods were used. **Results.** The wild type strains of *P. pastoris* and *H. polymorpha* were analyzed by Western blot, using the antibodies for FBP protein of *S. cerevisiae*. It was shown that FBPase is mostly degraded after 5 hours of incubation of cells in glucose-containing medium. After shifting the cells from methanol or ethanol-containing media on glucose medium, FBPase activity of *P. pastoris* and *H. polymorpha* wild-type strains decreased 4.5–5 and 2–2.5 times, respectively. **Conclusions.** The recombinant strains of *P. pastoris* with the deletion of *FBP* gene were constructed and analyzed. Δfbp strains did not grow in the medium with non-fermentable carbon sources. To study the mechanisms of catabolite degradation, plasmids for the expression of *FBP* fused with GFP were constructed. The recombinant strains with the expression of these plasmids were obtained and analyzed.

Key words: yeasts, fructose-1,6-bisphosphatase, catabolite degradation.

УДК 575.222.7:581.1

ДРОБОТ К.О., МАТВЄЄВА Н.А., КВАСКО О.Ю., ШАХОВСЬКИЙ А.М.

Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, Україна, 03680, м. Київ, вул. Заболотного, 148, e-mail: joyna56@gmail.com

СТВОРЕННЯ КУЛЬТУРИ «БОРОДАТИХ» КОРЕНІВ РОСЛИН АЛТЕЇ ЛІКАРСЬКОЇ *ALTHAEA OFFICINALIS* L. З ВИКОРИСТАННЯМ РІЗНИХ ВЕКТОРНИХ КОНСТРУКЦІЙ З ГЕНОМ *ifn- α 2b* ЛЮДИНИ

Алтея лікарська (*Althaea officinalis* L., Malvaceae), багаторічна трав'яниста рослина, поширена у Європі, є лікарською та використовується як у нетрадиційній медицині,

так і у фармакології для створення лікарських препаратів. Рослини алтеї мають ряд лікувальних властивостей завдяки наявності мукополісахаридів та інших сполук. Її листки та

корені є джерелом флавоноїдів, глікозидів, кумаринів і використовуються як протизапальний, відхаркувальний засіб. У медичній практиці алтею вживають у вигляді відвару коренів при захворюваннях органів дихання, шлунку та ін. [1].

Не зважаючи на широке використання рослин алтеї у народній медицині та фармакології, ця рослина залишається недостатньо вивченою у культурі *in vitro*. Поряд із цим, використання лікарських рослин у якості об'єктів досліджень є перспективним напрямком біотехнології, у тому числі генетичної інженерії. Перш за все, лікарські рослини є природними продуцентами цінних біологічно активних сполук, які використовуються для лікування та профілактики низки захворювань. Методи генетичної інженерії дозволяють створити рослини, які синтезують одночасно як природні, так і невластиві їм сполуки, що обумовлено перенесенням відповідних цільових генів. Використання таких рослин, передусім культивованих у ферментерах «бородатих» коренів може бути менш затратним та економічно вигідним. Використання рослинної сировини у лікувальних цілях є більш безпечним, порівняно з синтетичними медичними препаратами [2].

На даний час існують лише поодинокі публікації з уведення алтеї в асептичну культуру [3]. Останнім часом з'явилася публікація щодо генетичної трансформації алтеї з уведенням до її геному гена синтезу білка циановірина [4].

Одним з часто застосовуваних способів уведення генетичної інформації у рослини класу Двудольних є трансформація за допомогою ґрунтових бактерій роду *Agrobacterium*. Завдяки природній здатності інфікувати рослини та переносити частину свого геному ці бактерії широко використовуються у біотехнології, зокрема для отримання культури «бородатих» коренів [5].

Створення культури «бородатих» коренів алтеї з використанням *Agrobacterium rhizogenes* викликає інтерес, оскільки культивування трансгенних коренів має низку переваг. По-перше, культура «бородатих» коренів характеризується необмеженим та швидким ростом на живильному середовищі, що не містить екзогенних регуляторів росту; по-друге, «бородаті» корені є невибагливими до умов вирощування та не потребують освітлення, отже отримані корені можна культивувати у ферментерах, що не суперечить законодавчо встановленим нормам вирощування генетично

модифікованих рослин. По-третє, культурі трансгенних коренів притаманна більш висока генетична стабільність порівняно з культурою клітин [6]. Все це робить культивовані *in vitro* «бородаті» корені зручним об'єктом для біотехнологічних маніпуляцій.

Отже, досі є актуальним проведення досліджень з генетичної трансформації алтеї лікарської, у тому числі отримання культури «бородатих» коренів. Відомо, що в результаті генетичної трансформації можуть змінюватись фізіологічні та біохімічні характеристики рослин, а також є дані, що процес трансформації як стресовий чинник може призводити до підвищення синтезу запасних сполук [7]. Тому на часі є дослідження біохімічних особливостей трансформованих коренів, зокрема, накопичення у них запасних сполук.

В даній роботі досліджували можливість отримання «бородатих» коренів *A. officinalis* з геном інтерферону $\alpha 2b$ людини, використовуючи вектори, які відрізнялися за промотором гена *ifn- $\alpha 2b$* , а також вміст фруктозозамісних цукрів у отриманих трансгенних коренях.

Матеріали і методи

Вихідним матеріалом слугувало насіння рослин *A. officinalis* (виробництво фірми «Насіння України»). Для уведення рослин у культуру *in vitro* насіння стерилізували розчином комерційного препарату «Білізна» (у співвідношенні з водою 1:3) протягом 10 хвилин, після чого промивали тричі по 5 хвилин стерильною дистильованою водою та переносили насіння на поверхню агаризованого середовища Мурасіге та Скуга (SMS) [8] зі зменшеним вдвічі вмістом макросолей. Культивування проводили при температурі 24°C та 16-годинному освітленні.

Експлантами для генетичної трансформації слугували 14-денні проростки алтеї, від яких відокремлювали листя, сім'ядолі, стебло та корені. Генетичну трансформацію проводили з використанням *Agrobacterium rhizogenes*, що містили ген інтерферону *ifn- $\alpha 2b$* людини під контролем конститутивного 35S промотору вірусу мозаїки цвітної капусти (*pCB124* [9]) або під контролем коренеспецифічного MII промотору цукрового буряку (*pCB161* [10]). Також для трансформації використовували дикий штам *A. rhizogenes* A4. Трансформацію проводили за описаною нами раніше методикою [11]. Після кокультивування з агробактеріями експланти вирощували в чашках Петрі на агаризованому середовищі S MS протягом

двох діб, потім переносили на середовище S MS з 600 мг/л цефатоксиму. Оскільки використані вектори мали ген *nptII*, селекцію трансгенних коренів проводили у присутності 25 мг/л канаміцину, який додавали до живильного середовища через 9 діб після трансформації. Вирощування коренів, отриманих після трансформації диким штамом *A. rhizogenes* A4, проводили на середовищі S MS з 600 мг/л цефатоксиму.

Для визначення вмісту фруктанів використовували пробу Селіванова [12], яка базується на здатності кетоцукрів давати забарвлення з резорцином у кислому середовищі. Оптичну густина вимірювали при довжині хвилі $\lambda = 550$ нм.

Результати та обговорення

Ріст коренів на експлантах починався через 12–15 діб після кокультивування з агробактеріями. Корені формувалися лише на листових експлантах, частота коренеутворення становила 50 % для експлантів з векторними конструкціями *pCB* 124 та A4 і 75 % для *pCB* 161. Корені мали характерні для «бородатих» коренів ознаки – росли на безгормональному середовищі, мали від’ємний геотропізм та значну розгалуженість. При використанні інших типів експлантів (стебло, сім’ядолі, корені) не було отримано позитивних результатів.

Проведені молекулярно-генетичні аналізи з використання полімеразної ланцюгової реакції підтвердили наявність цільового та селективного генів (відповідно *ifn- α 2b* та *nptII*),

а також *rolB* гена агробактерій (рис.). Отже, «бородаті» корені алтеї було отримано як з використанням дикого штаму агробактерій, так і з використанням агробактерій, що несли векторні конструкції, у яких ген інтерферону знаходився під контролем або 35S або M11 промоторів.

Генетична трансформація алтеї лікарської призводила до достовірного збільшення рівня накопичення фруктозовмісних цукрів. Корені контрольних рослин алтеї містили близько 13 мг фруктанів на один грам сухої маси коренів. В той же час, лінія, отримана за допомогою векторної конструкції *pCB* 124, мала найвищий вміст фруктанів – близько 41 мг/г сухої маси. Вміст фруктанів у лініях, отриманих після трансформації векторами *pCB* 161 та A4, також перевищував вміст фруктанів у коренях контрольних рослин та становив відповідно 28 мг/г та 35 мг/г сухої маси.

Відомо, що процес генетичної трансформації є стресовим фактором, тому, можливо, підвищення рівня фруктозовмісних цукрів у отриманих транс генних коренях було обумовлено саме процесом трансформації: пораненням, контактом з патогеном. Також, можливим є зміна синтезу фруктанів у зв’язку з перенесенням чужорідних генів до генома рослин. Аналогічне підвищення вмісту фруктанів у культурах «бородатих» коренів ми спостерігали у рослин інших видів, зокрема, у цикорію, ендівію та салату.

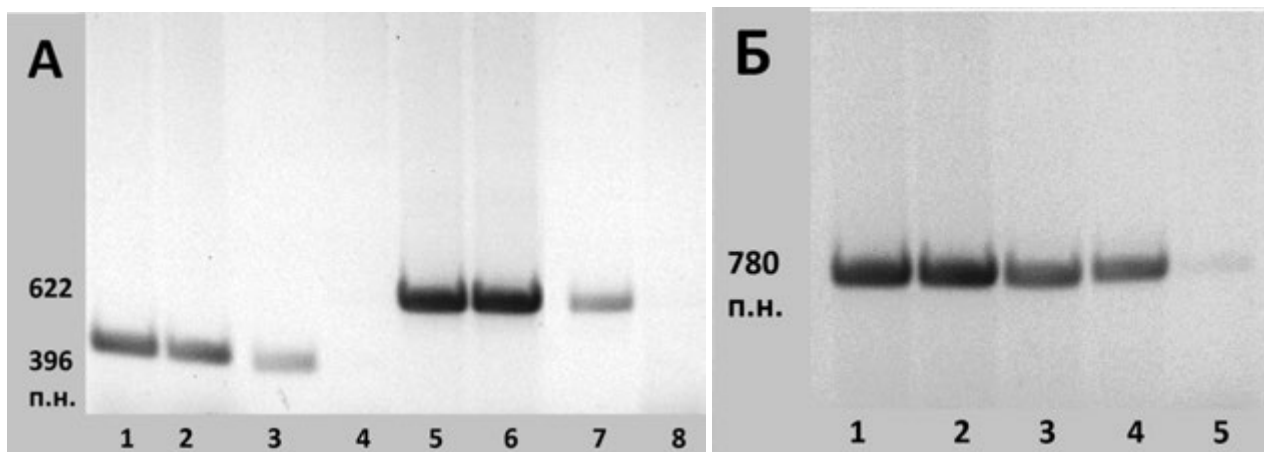


Рис. Електрофореграма результатів ПЛР аналізу присутності генів *ifn- α 2b* (А, 1–3) та *nptII* (А, 4–6), *rolB* (1–3) у трансгенних коренях алтеї; треки А4, А8 та Б5 – ДНК контрольних рослин; трек Б4 – ДНК *A. rhizogenes*

Висновки

Показано, що є можливим отримання трансгенних коренів алтеї з геном інтерферону $\alpha 2b$ людини при використанні векторних конструкцій, у яких ген *ifn- $\alpha 2b$* знаходиться під контролем 35S або MII промоторів. Отримати «бородаті» корені алтеї також можна, трансформуючи рослини диким штамом *A. rhizogenes* A4.

Найкращим типом експлантів виявилися листки, оскільки при використанні у якості

експлантів коренів та сім'ядоль «бородаті» корені отримати не вдалося.

Дослідження вмісту фруктанів показало, що генетична трансформація призводила до достовірного збільшення накопичення фруктанів у порівнянні з вмістом цих сполук у коренях контрольних нетрансформованих рослин.

Література

1. Кунах В.А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. – К.: Логос, 2005. – С. 3–6.
2. Лікарські рослини: Енциклопедичний довідник / Відп. Ред.. А.М. Гродзинський. – К.: Голов. ред. УРЕ – 1989. – С. 37.
3. Ionkova I., Hu Z., Alfermann A. Polysaccharide production by hairy root cultures of some higher medicinal plants // *Planta Med* 59. – 1993. – P. 658–659.
4. Pascal M., Drake W., Luisa M. M., Tim H. Szeto, J. K-C. Ma. Transformation of *Althaea officinalis* L. by *Agrobacterium rhizogenes* for the production of transgenic roots expressing the anti-HIV microbicide cyanovirin-N [Електронний ресурс] // *Transgenic Research*. – 2013. – 22. – Режим доступу: <http://link.springer.com/journal/11248/22/6/page/1P.1225-1229>.
5. Zhou M-L., Xue-Mei ZhuX-M., Shao J-R., Tang Y.X., Wu Y.M. Production and metabolic engineering of bioactive substances in plant hairy root culture // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2011. – 90, N 4. – P. 1229 – 1239.
6. Roychowdhury D., Majumder A., Jha S. *Agrobacterium rhizogenes*-Mediated Transformation in Medicinal Plants: Prospects and Challenges // *Biotechnology for Medicinal Plants*. – 2013. – P. 29–68.
7. Livingston D.P., Hinch D.K., Heyer A.G. Fructan and its relationship to abiotic stress tolerance in plants // *Cell Molecular Life Science*. – 2009. – 66, N 13. – P. 2007–2023.
8. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture // *Phys. Plant*. – 1962. – 15, N 3. – P. 473–497.
9. Luchakivskaya Yu., Kishchenko O., Gerasymenko I. et al. High-level expression of human interferon alpha-2b in transgenic carrot (*Daucus carota* L.) plants // *Plant Cell Rep*. – 2011. – 30. – P. 407–415.
10. Luchakivskaya Yu., Kishchenko O., Gerasymenko I., Olevinskaya Z., Simonenko Yu., Spivak M., Kuchuk M. High-level expression of human interferon alpha-2b in transgenic carrot (*Daucus carota* L.) plants // *Plant Cell Reports*. – 2011. – 30, N 3. – P. 407–415.
11. Матвеева Н.А., Кіщенко О.М., Шаховський А.М., Кучук М.В. Синтез інуліну в «бородатих» коренях цикорію, трансформованого за допомогою *Agrobacterium rhizogenes* // *Біотехнологія*. – 2011. – 4. – С. 56–63.
12. Рево А.Я. Практикум по органической химии (Качественные микрохимические реакции). – М.: Высшая школа, 1971. – 208 с.

DROBOT K.O., MATVIEIEVA N.A., KVASKO O.YU., SHACHOVSKY A.M.

*Institute of Cell Biology and Genetic Engineering NAS of Ukraine,
Ukraine, 03680, Kyiv 143, Zabolotno str., 148, e mail: joyna56@gmail.com*

CONSTRUCTION OF *ALTHAEA OFFICINALIS* L. «HAIRY» ROOTS WITH HUMAN INTERFERON ALPHA 2B GENE USING DIFFERENT TRANSFORMATION VECTORS

Aim. The obtaining of marshmallow *Althaea officinalis* L. “hairy” root culture with human interferon $\alpha 2b$ gene (*ifn- $\alpha 2b$*) was the aim of this work. **Methods.** We used *Agrobacterium rhizogenes* and different transformation vectors (*pCB 124* and *pCB 161*) with *ifn- $\alpha 2b$* gene under constitutive 35S CaMV promoter or MII rootspecific sugar beet promoter respectively. Also we used *A. rhizogenes* wild strain A4 for marshmallow genetic transformation. The genes were transferred into leaf, roots, stems and cotyledones explants via *A. rhizogenes*-mediated transformation. The presence of transgenes was determined by PCR analysis. Fructan content in “hairy” roots extracts was analyzed by Selivanoff-Probe. **Results.** Transformation frequency was up to 50 % if leaf explants was used for transformation (*pCB124* vector or

A. rhizogenes A4) and transformation frequency was up to 75 % for explants transformed using *pCB161* vector. PCR analysis proved the presence of *nptII*, *ifn- α 2b* and *rolB* genes in marshmallow roots obtained after *A. rhizogenes*-mediated transformation. The clones of transgenic roots differed in fructan synthesis. So the genetic transformation has led to increasing of the level of fructan content up to 41 mg/g dry weight. Fructan content was 13 mg/g dry weight in roots of control untransformed plants. **Conclusions.** Thus, we obtained the transgenic *A. officinalis* “hairy” roots using *A. rhizogenes*-mediated transformation. Extracts from “hairy” root culture were characterized by the higher level of fructan content in comparison with the fructan content in extracts from the roots of control plants.

Key words: genetic transformation, *Agrobacterium rhizogenes*, hairy root, *Althaea officinalis* L., fructans.

УДК 633.81:57.085.2

ЕГОРОВА Н.А., СТАВЦЕВА И.В., ЯКИМОВА О.В., КАМЕНЕК Л.И., КРИВОХАТКО А. Г.

Институт сельского хозяйства Крыма НААН Украины,

Украина, 95493, г. Симферополь, ул. Киевская, 150, e-mail: yegorova.na@mail.ru

РОЛЬ НЕКОТОРЫХ ФАКТОРОВ В ПРОЦЕССЕ ИНДУКЦИИ КАЛЛУСОГЕНЕЗА *IN VITRO* У ЭФИРОМАСЛИЧНЫХ РАСТЕНИЙ

Повышение эффективности растениеводства предполагает использование новых методических подходов, в том числе методов клеточной инженерии. Для разработки многих биотехнологий необходимы хорошо воспроизводимые методы получения каллусных культур, которые являются одним из основных объектов биотехнологических манипуляций. И хотя на настоящий момент получение каллусной ткани не представляет существенных сложностей у многих видов растений, тем не менее, у отдельных генотипов нередко возникают проблемы. При этом важно не только достижение высокой частоты индукции каллуса и его хорошей пролиферации, но и получение его из различных типов эксплантов. Происхождение каллусных тканей из разных органов растения влияет на их дальнейшую регенерационную способность, что нужно учитывать при разработке методов создания генетического разнообразия в селекции (индукции соматоклональной вариабельности, клеточной селекции и др.), а также на интенсивность синтеза биологически активных веществ, что важно для альтернативных биотехнологий получения вторичных метаболитов *in vitro* [1, 3]. Разработка таких биотехнологий является актуальной задачей для многих эфиромасличных растений, широко используемых в медицине, пищевой, парфюмерно-косметической промышленности и других отраслях. Для большинства изучаемых нами эфиромасличных растений в литературе имеются данные о получении каллусных культур, используемых в дальнейшем для

индукции морфогенеза, получения суспензий или в исследованиях вторичных метаболитов *in vitro* [5–11]. Их анализ показывает большое разнообразие предлагаемых разными авторами питательных сред, ограниченность используемых типов эксплантов, а также недостаточную изученность многих факторов, лимитирующих процесс каллусогенеза. Представленные в этих публикациях методики получения каллусных культур не всегда воспроизводимы при работе с новыми видами и сортами, что обусловлено влиянием многих экзогенных и эндогенных факторов на индукцию каллусообразования и, прежде всего, генетической обусловленностью этого процесса [3].

Целью нашей работы было изучение влияния некоторых факторов (генотипа и происхождения донорного растения, типа экспланта, сезона, состава питательной среды) на индукцию каллусогенеза у видов и сортов основных и перспективных эфиромасличных растений, возделываемых в Украине.

Материалы и методы

Материалом для исследований служили ткани и органы эфиромасличных растений: лаванды (*Lavandula angustifolia* Mill.) – сорта Степная, Синевя, Вдала, Ранняя, Крымчанка, Галлея, образцы №№ 58-1, 75-11, 61-1; шалфея (*Salvia sclarea* L.) – сорта С-785, С-1122, Тайган; кориандра (*Coriandrum sativum* L.) – сорта Янтарь, Ранний, Мисхор, Нектар, Медун; фенхеля (*Foeniculum vulgare* Mill.) – сорта Мэрцишор, Оксамит Крыма, Крымский; розы эфиромасличной (*Rosa spp.*) – сорта Радуга,

Лань, Крымская Красная, Мичуринка, Весна, Белая, Кооператорка, Свежен, Фестивальная, образцы № 215, №7806, С-13А; тысячелистника (*Achillea millefolium* L., *A. filipendulina* Lam., *A. setacea* Waldst. et Kit., *A. nobilis* L.); мелиссы (*Melissa officinalis* L.) сорт Цитронелла; полыни эстрагон (*Artemisia dracunculus* L.) – № 5р. 24, № бр. 17; монарды (*Monarda fistulosa* L., *M. citriodora* Cerv. ex Lag., *M. didyma* L., *M. x hybrida* hort.). В качестве эксплантов для получения каллусных культур использовали сегменты стебля, листа, черешка, соцветия, зародыши, почки, а также различные органы проростков, полученных из семян *in vitro*. Введение в асептическую культуру и культивирование проводили с применением традиционных биотехнологических методов на различных модификациях среды Мурасиге и Скуга (МС) [2]. Экспланты и каллусы культивировали при +26°C, влажности 70 % и освещенности 600 люкс. В каждом варианте анализировали не менее 20 эксплантов в 3-х кратной повторности, а данные обрабатывали статистически с использованием пакета программ Microsoft Office.

Результаты и обсуждение

При проведении исследований особое внимание мы обратили на использование широкого спектра выращиваемых в Украине сортов и перспективных селекционных образцов, а также различных типов эксплантов. Показано, что практически у всех изученных видов эфиромасличных растений при культивировании большинства анализируемых тканей и органов возможна индукция каллусогенеза. Однако частота этого процесса и характеристика каллусной ткани в значительной степени зависели от многих факторов. Для всех эфиромасличных растений было установлено влияние на индукцию каллусогенеза генотипа – вида, сорта, сортообразца. Разные генотипы порой различались не только по частоте образования каллуса, но и составу оптимальной питательной среды, при этом наблюдалось взаимодействие этих факторов. Так, для 4-х видов тысячелистника при культивировании сегментов листьев было показано, что максимальная частота образования каллуса на большинстве питательных сред была у *A. filipendulina* (100 %) и *A. millefolium*, *A. nobilis* (92–94 %). Меньшей способностью к индукции каллусогенеза характеризовались экспланты *A. setacea*, у которых каллус формировался с частотой до 33 % и отличался очень слабым

приростом. У 3-х видов монарды (*M. fistulosa*, *M. citriodora*, *M. x hybrida*) максимальная частота каллусогенеза из эксплантов листа (66,6–94,7 %) была достигнута при введении в среду 2,4,5-Т (1,0 мг/л) и БАП (0,5 мг/л). В то же время на этой среде у *M. didyma* каллус формировался только у 21,4 % эксплантов. Для этого вида оптимальной была среда МС с добавлением 2,4-Д (1,0 мг/л) и БАП (0,5 мг/л), на которой каллусообразование достигало 68,2 %.

Влияние сортовых особенностей особенно ярко проявилось при введении в культуру *in vitro* лепестков цветков розы эфиромасличной (рис. 1). Установлено, что у большинства сортов и образцов частота каллусообразования составила 70–85 %, хотя у некоторых не превышала 25–40 %, а у № 7806 на испытанных средах каллус не формировался. Выявлены различия генотипов и по потребности в гормонах для индукции каллуса. Так, у сортов Лань и Радуга максимальная частота каллусогенеза отмечена на среде МС с 4,0 мг/л 2,4-Д и 0,5 мг/л кинетина, тогда как у ‘Весны’ – с 2,0 мг/л 2,4-Д и НУК и 0,1 мг/л кинетина, а у №215 и С13А – с 2,0 мг/л НУК и 0,5 мг/л БАП. Такие существенные различия по способности к каллусогенезу у изученных сортов розы, по-видимому, объясняются тем, что при их создании часто использовали сложные межвидовые комбинации скрещивания [4]. Для лаванды также была отмечена важная роль генотипа – у сорта Степная и №75-11 частота каллусообразования из листьев достигала 100 %, у сорта Галлея 33,3 %, а у №61-1 каллус на изученных средах не формировался, лишь изредка наблюдали начальные этапы пролиферации.

Установлено, что у некоторых перекрестноопыляющихся растений, в частности у фенхеля, индивидуальные растения в пределах сорта различались между собой по частоте индукции каллуса и интенсивности его роста (рис. 2). У изученных растений частота каллусообразования варьировала от 0 до 100 %, при этом у большинства из них частота индукции каллуса была достаточно высокой – от 72,4 % до 100 %. В то же время у растения № 1 каллус на испытанных средах не образовывался, что свидетельствует о том, что в сортовой популяции фенхеля, в целом характеризующейся высокой способностью к каллусогенезу, могут быть растения, у которых этот признак не проявляется.

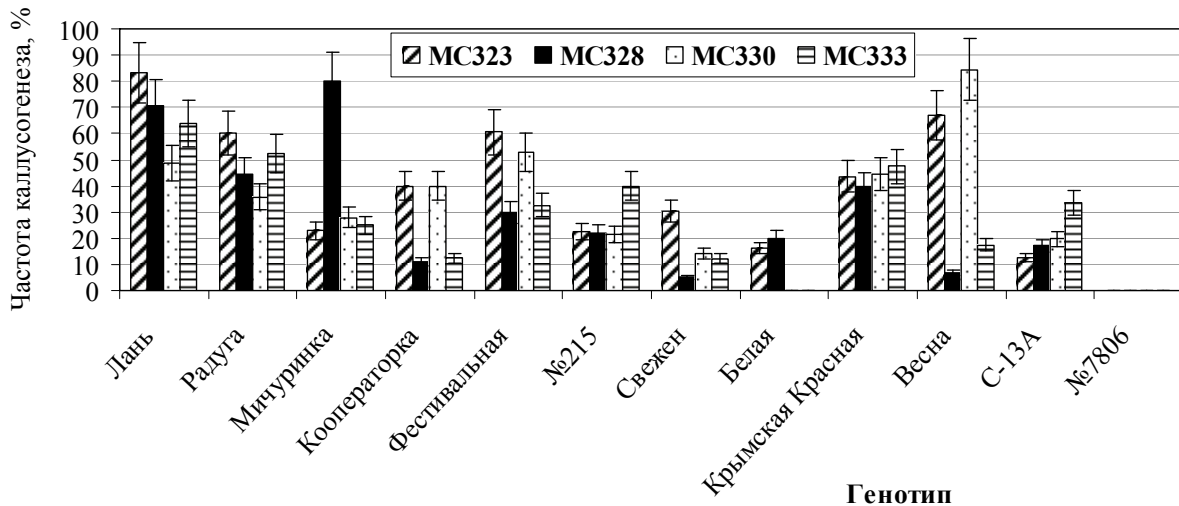


Рис. 1. Влияние генотипа и состава питательной среды на индукцию каллусогенеза у розы эфиромасличной. Гормональные добавки в среде МС (мг/л): МС323 – 2,4-Д (4,0), кинетин (0,5); МС328 – 2,4-Д (2,0), кинетин (0,5); МС330 – 2,4-Д (2,0), НУК (2,0), кинетин (0,1); МС333 – НУК (2,0), БАП (0,5)

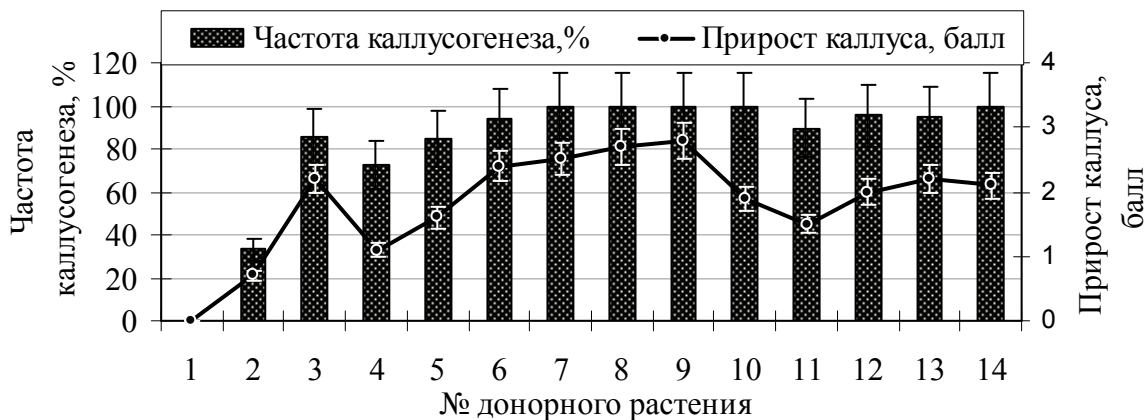


Рис. 2. Влияние генотипа донорного растения фенхеля сорта Мэрцишор на индукцию каллусогенеза *in vitro*

Что касается гормонального состава питательных сред, то для большинства эксплантов у многих изученных видов (лаванда, шалфей, тысячелистник, кориандр, полынь) оптимальным для получения каллуса у многих сортов было сочетание НУК (1–2 мг/л) и БАП (0,5 мг/л). Хотя у фенхеля и Melissa лучшие результаты были при использовании 2,4-Д и БАП (0,5–1,0 мг/л), а у монарды – 2,4,5-Т или 2,4-Д и БАП. Как уже указывалось, особенно варьировали составы питательных сред для разных сортов розы (рис. 1).

В результате проведенных исследований установлено, что индукция каллусогенеза возможна у всех изученных типов эксплантов, однако ее частота значительно варьировала, в зависимости от используемого органа и генотипа. Максимальная частота образования

каллуса при введении в культуру *in vitro* вегетативных органов зрелого растения у лаванды, тысячелистника, полыни, монарды была при эксплантации листьев (до 85–100 %), а у фенхеля – стебля (100 %).

Высокую эффективность показало применение в качестве эксплантов органов, изолированных из полученных *in vitro* проростков. Так, при анализе 11 различных типов эксплантов (из вегетативных и генеративных органов растений и проростков) кориандра сорта Янтарь максимальная частота каллусогенеза (100 %) была выявлена у сегментов гипокотыля. У шалфея сорта С-785 все изученные экспланты из проростков (гипокотиль, семядоля, корешок, лист, почка, стебель) продемонстрировали высокую каллусообразующую способность (до 84–

100 %), тогда как частота каллусогенеза из листьев растений закрытого грунта не превышала 35–52 %. У Melissa было исследовано влияние на формирование каллуса из трех типов эксплантов (листа, стебля, черешка) происхождения донорных растений, в качестве которых использовали растения, выращенные в теплице, а также пробирочные растения, полученные из семян *in vitro*. Установлено, что для эксплантов растений, полученных *in vitro*, на большинстве испытанных питательных сред показатели каллусообразования были в 2–2,5 раза выше, чем у эксплантов, выделенных из растений *in situ*. По-видимому, это обусловлено ювенильным состоянием органов проростков и их культивированием на питательных средах, что могло повлиять на уровень эндогенных гормонов, играющих важную роль в процессах пролиферации и дифференциации клеток. Некоторые авторы также указывали на эффективность использования органов проростков в качестве эксплантов у отдельных эфиромасличных видов растений [5, 6, 8, 10]. Получение исходного растительного материала из проростков *in vitro* может быть более предпочтительным, так как осуществимо в течение всего года, а в некоторых случаях способствует не только лучшей индукции каллусогенеза, но и морфогенеза.

Важную роль в индукции процесса каллусогенеза играет физиологическое состояние экспланта и донорного растения, которое зависит от условий выращивания, возраста растения, сезона. На примере лаванды было исследовано влияние времени года, когда проводилось введение в культуру *in vitro*, на способность листовых эксплантов к индукции каллуса. В этом опыте в течение пяти лет анализировали одни и те же исходные растения, выращиваемые в условиях закрытого грунта. Установлено, что в летний период отмечалась наименьшая частота образования каллуса – у изученных трех сортов этот показатель был в 2–2,5 раза ниже, чем в остальное время года.

Литература

1. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнология на их основе. Учебное пособие. – М.: ФБК – ПРЕСС, 1999. – 160 с.
2. Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полицук В.Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. – К.: Наук. думка, 1980. – 488 с.
3. Кунах В.А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. – К.: Логос, 2005. – 730 с.
4. Назаренко Л.Г. Селекция розы эфиромасличной. – Симферополь: Изд-во ИЭЛР, 1997. – 418 с.

Максимальная частота каллусогенеза (92,2–96,7 % у ‘Степной’, 90,1–90,9 % у ‘Синева’ и 79,5–86,7 % у ‘Вдалой’) выявлена весной и осенью, что может быть связано с активным отрастанием побегов в эти периоды и изменением уровня эндогенных фитогормонов.

Известно, что значительную роль в каллусообразовании играют условия культивирования *in vitro* [1, 3]. В наших экспериментах для лаванды было показано влияние на частоту формирования каллуса ориентации листового экспланта на поверхности питательной среды. Частота каллусообразования на всех изученных средах при помещении листа адаксиальной стороной на агар была в 1,5–2,0 раза выше по сравнению с абаксиальной стороной. В то же время у полыни эстрагон расположение листового экспланта на поверхности среды не влияло на частоту каллусогенеза (в обоих вариантах 100 %), однако при помещении листовой пластинки адаксиальной стороной на агар отмечали индукцию прямого органогенеза с частотой до 23,8 %, тогда как при абаксиальном размещении морфогенез проявлялся в единичных случаях. Выявленная разница пролиферативной и морфогенетической активности в зависимости от расположения экспланта может быть связана с анатомо-морфологическими особенностями строения листовой пластинки и физиологической полярностью, обусловленной градиентом эндогенных физиологически активных веществ.

Выводы

Оптимизированы условия получения каллусных культур у видов и сортов ряда эфиромасличных растений, возделываемых в Украине. Выявлены особенности влияния генотипа, типа экспланта, гормонального состава питательной среды, условий выращивания донорного растения, сезона и расположения экспланта на поверхности питательной среды на индукцию каллусогенеза у лаванды, розы, кориандра, шалфея, фенхеля, полыни, монарды, тысячелистника, Melissa *in vitro*.

5. Anzidei M., Bennici A., Schiff S. et al. Organogenesis and somatic embryogenesis in *Foeniculum vulgare*: histological observations of developing embryogenic callus // Plant Cell, Tissue Organ Culture. – 2000. – 61, N 1. – P. 69–79.
6. Figueiredo A.C., Pais M.S. *Achillea millefolium* (yarrow) cell suspension cultures: establishment and growth conditions // Biotechnology Lett. – 1991. – 13, N. 1. – P. 63–68.
7. Ghiorghita G., Maftai D.E., Nicuta D. Some aspects concerning the in vitro reaction of *Lavandula angustifolia* L. // Propag. Ornament. Plants. – 2009. – 9, N 1. – P. 47–49.
8. Iola-Boldura O.M., Radu F., Popescu S., Borozan A. Regeneration, micropropagation, callus cultures and somatic embryogenesis of common sage (*Salvia officinalis* L.) // Bull. UASVM Hort. – 2010. – 67, N 1. – P. 308–313.
9. Ishioka N., Tanimoto S. Plant regeneration from Bulgarian rose callus // Plant Cell, Tissue and Organ Cult. – 1990. – 22, N 3. – P. 197–199.
10. Meftahzade H., Lotfi M., Moradkhani H. Optimization of micropropagation and establishment of cell suspension culture in *Melissa officinalis* L. // African J. of Biotechnology. – 2010. – 9, N 28. – P. 4314 – 4321.
11. Murthy H.N., Hahn E.J., Paek K.Y. Recurrent somatic embryogenesis and plant regeneration in *Coriandrum sativum* L. // Sci. Hort. – 2008. – 118, N. 2. – P. 168–171.

YEGOROVA N.A., STAVTZEVA I.V., YAKIMOVA O.V., KAMENYOK L.I., KRIVCHATKO A.G.

Institute of Agriculture Crimea, National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine, Ukraine, 95034, Simferopol, Kievskaya str., 150, e-mail: yegorova.na@mail.ru

ROLE OF SOME FACTORS IN THE PROCESS OF CALLUSOGENESIS INDUCTION *IN VITRO* IN ESSENTIAL OIL PLANTS

Aims. The influence of some factors on callus formation for main and perspective for growing in Ukraine species of essential oil plants was investigated. **Methods.** Cell, tissue and organ culture *in vitro*, statistics.

Results. The conditions for obtaining callus cultures using a wide range of explants, varieties and samples of essential oil plants – lavender (*Lavandula angustifolia*), sage (*Salvia sclarea*), coriander (*Coriandrum sativum*), fennel (*Foeniculum vulgare*), essential oil rose (*Rosa spp.*), yarrow (*Achillea millefolium*, *A. filipendulina*, *A. setacea*, *A. nobilis*), melissa (*Melissa officinalis*), tarragon (*Artemisia dracunculus*), monarda (*Monarda fistulosa*, *M. citriodora*, *M. didyma*, *M. x hybrida*) have been optimized. The peculiarities of the influence on the callusogenesis of some factors (genotype and donor plant origin, season, hormonal composition of nutrient medium, type of explant and its orientation to the surface of the medium) were revealed. In particular, for fennel variability in the callus formation frequency of plants within ‘Martsishor’ variety (from 0 to 100 %) were detected, for lavender it was shown an increased frequency of callusogenesis at 1.5–2.0 times when leaf placed adaxial side on agar compared with abaxial. **Conclusions.** The important role of some endogenous and exogenous factors in the induction of callus formation in lavender, sage, coriander, fennel, essential oil rose, yarrow, melissa, tarragon, monarda was shown.

Key words: essential oil plants, callusogenesis, explant, *in vitro*.

УДК 633.111.1; 632.4; 661.743.1

ЖУК І.В., ДМИТРИЄВ О.П.

Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, Україна, 03680, м. Київ, вул. Заболотного, 148, e-mail: iren_zhuk@mail.ru

УЧАСТЬ ЦАВЛЕВОЇ КИСЛОТИ В ІНДУКЦІЇ СИСТЕМНОЇ СТІЙКОСТІ ПШЕНИЦІ ДО ЗБУДНИКА СЕПТОРІОЗУ

Грибні захворювання пшениці призводять до значних втрат урожаю. До найбільш поширених грибних хвороб належить септоріоз. Втрати врожаю за помірного розвитку септоріозу становлять 10–15 %, а при епіфітотійному, яке трапляється раз в 2–3 роки – 30–50 % [1] Збудник цього захворювання гриб

Septoria tritici уражує листки пшениці, зменшуючи їх асиміляційну поверхню та здатність до фотосинтезу. Дефіцит фотоасимілятів у свою чергу викликає затримку розвитку колоса, зниження кількості та маси зерен у колосі. Підвищення імунітету рослин до патогенів здійснюється за допомогою

елісаторів, перелік яких постійно поповнюється новими речовинами [2].

Нами в якості елісатора для індукції неспецифічної стійкості рослин пшениці до септоріозу була використана щавлева кислота. Відомо, що ця кислота здатна індукувати програмовану загибель рослинних клітин шляхом посилення утворення активних форм кисню (АФК), що є однією з відповідей рослин на біотичний стрес [3–5]. Нами показано, що щавлева кислота індукувала підвищення активності фенольних пероксидаз, які беруть участь у формуванні клітинних стінок, утилізації пероксиду водню, що обумовлює індукцію неспецифічної стійкості рослин озимої м'якої пшениці до збудника септоріозу [2].

Метою роботи було вивчення дії щавлевої кислоти на первинні реакції відповіді рослинних клітин на проникнення патогена.

Матеріали і методи

Об'єктом досліджень були сорти озимої м'якої пшениці *Triticum aestivum* L. – Поліська 90 та Столична, які вирощували в умовах дрібноділянкових польових дослідів на сірому лісовому ґрунті в Київській області з використанням типової для зони агротехніки. Обробка рослин водним розчином щавлевої кислоти 0,1 мМ проводилась у фазі виходу в трубку з одночасною інокуляцією збудником септоріозу *Septoria tritici*. Саме ця фаза є найбільш чутливою до дії елісаторів, регуляторів росту і септоріозу. В попередніх дослідженнях нами встановлено, що саме ця концентрація розчину щавлевої кислоти є найбільш ефективною. В якості маркера індукованої стійкості спектрофотометрично визначали активність фенольних пероксидаз (КФ 1.11.1.7) в листках за методом Сіверс [6], аскорбатпероксидази (АПО) по Накано і Асада [7], каталази по Люку [8]. Відбір зразків проводили через добу після зараження і в подальшому протягом періоду колосіння-цвітіння та дозрівання зерна. Оцінку ураження та ступеню розвитку захворювання проводили у фазу молочно-воскової стиглості зерна з використанням 9-бальної шкали Саарі та Прескотта [1]. У цей же період визначали морфометричні параметри – висоту рослин, довжину колоса та прапорцевого листка. Після

дозрівання зерна проводили аналіз структури врожаю. Повторність досліду триразова. Результати обробляли статистично з використанням ANOVA.

Результати та обговорення

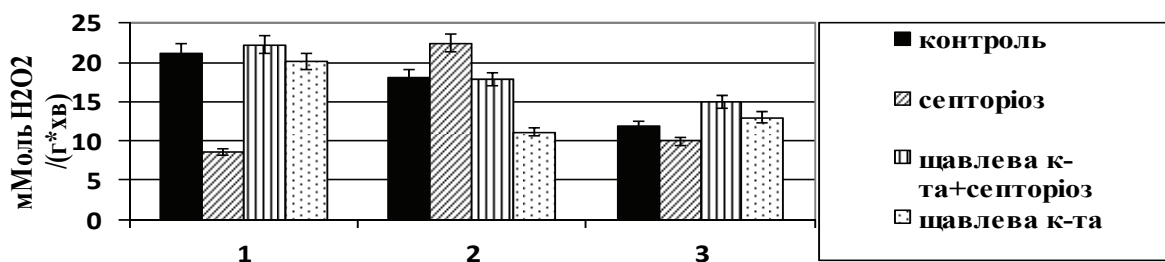
Однією з первинних реакцій відповіді рослинної клітини на патоген є зміни активності пероксидаз. Одним з утилізаторів пероксиду водню у рослинних клітинах є АПО. Нами показано, що після обробки рослин пшениці щавлевою кислотою у фазі виходу в трубку активність АПО зростала на 50 % в листках чутливого до септоріозу сорту Поліська 90, оброблених щавлевою кислотою та інфікованих збудником септоріозу, порівняно з необробленими та інфікованими рослинами цього сорту (рис. 1, А).

Показано, що у сорту Столична дія щавлевої кислоти у фазі виходу в трубку та колосіння-цвітіння у заражених септоріозом рослин зменшувала активність АПО, порівняно з варіантом, де рослини були заражені септоріозом. В фазі молочної стиглості зерна активність АПО в усіх варіантах досліду була близькою, що обумовлено старінням листового апарату (рис. 2, Б).

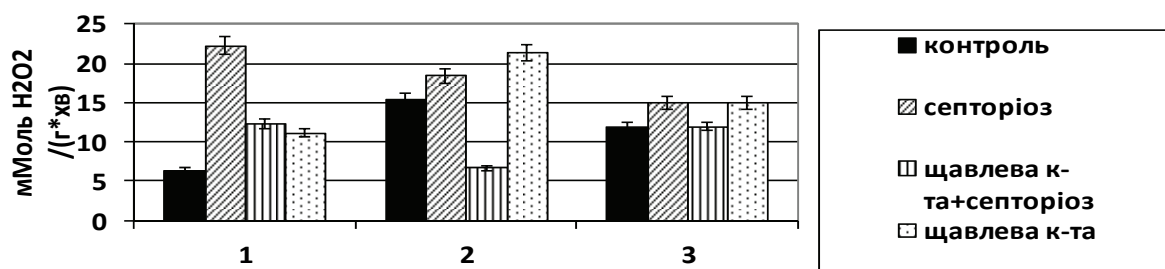
Вивчена нами активність фенольних пероксидаз, що беруть участь в процесах лігніфікації клітинних стінок зростала в період колосіння-цвітіння і обумовлювалась посиленням розвитку гриба і активації захисту клітин рослин від проникнення патогену. Реакція сортів на патоген та дію щавлевої кислоти була близькою, що вказує на незначні відмінності в їх природному фітоімунитеті (рис. 2, А, Б).

У обох сортів озимої пшениці встановлено підтримання активності пероксидаз на високому рівні у заражених септоріозом та оброблених щавлевою кислотою рослин до фази молочної стиглості зерна (рис. 2, А, Б).

Одночасно нами була досліджена активність каталази, яка функціонує в пероксисомах і утилізує пул пероксиду водню, утворений внаслідок процесів катаболізму. Обробка щавлевою кислотою зменшувала активність каталази у сорту Поліська 90, що свідчить про затримку розвитку захворювання. (рис. 3, А).

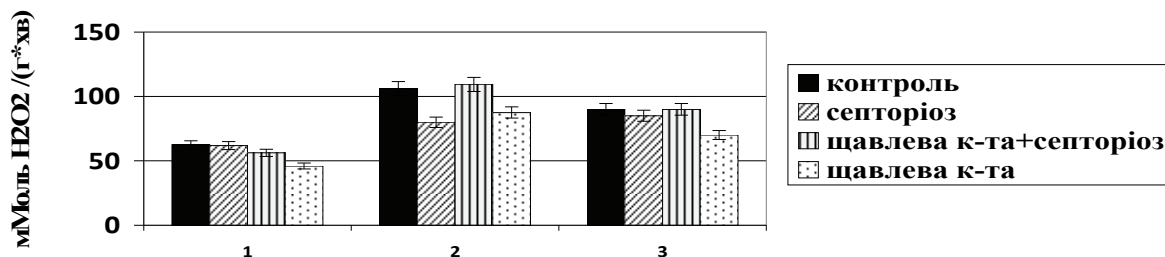


А

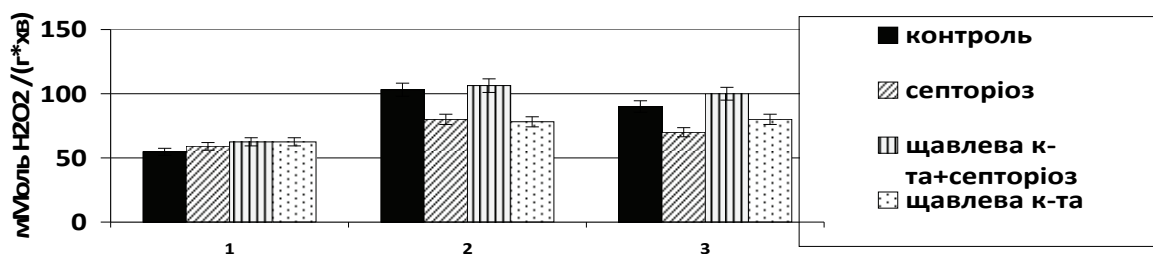


Б

Рис. 1. Вплив обробки щавлевою кислотою за умов ураження збудником септоріозу на активність аскорбатпероксидази у листках озимої пшениці сорту Поліська 90 (А) та Столична (Б): 1 – фаза виходу в трубку, 2 – фаза колосіння-цвітіння, 3 – молочної стиглості зерна

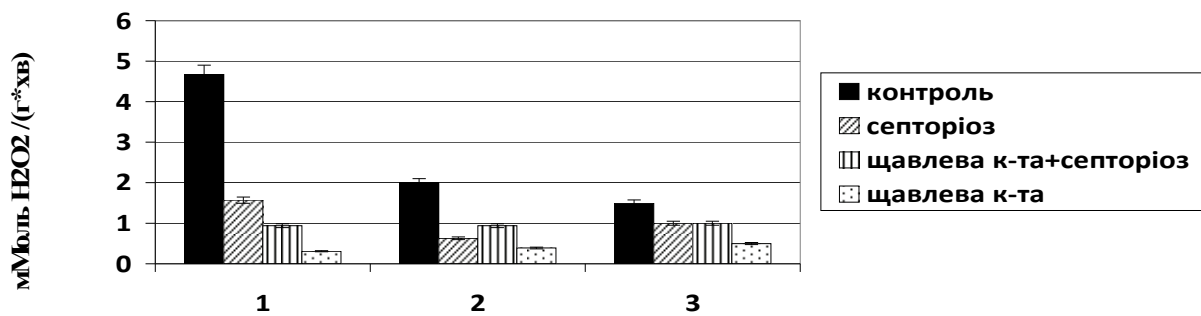


А

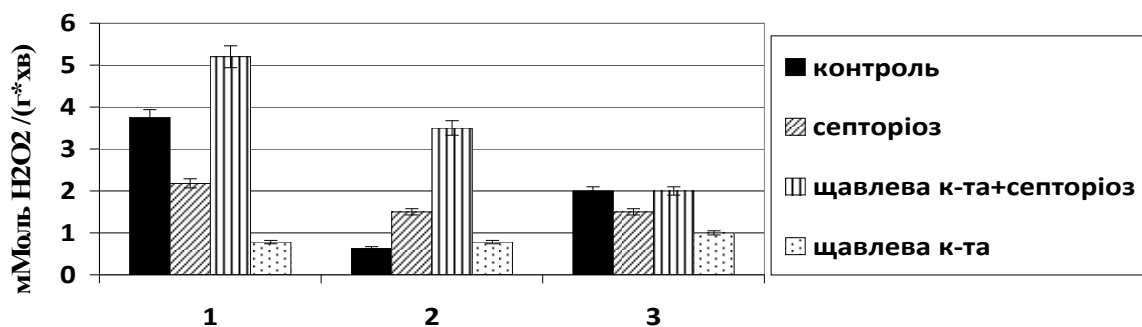


Б

Рис. 2. Вплив обробки щавлевою кислотою за умов ураження збудником септоріозу на активність фенольних пероксидаз у листках озимої пшениці сорту Поліська 90 (А) та Столична (Б): 1 – фаза виходу в трубку, 2 – фаза колосіння-цвітіння, 3 – молочної стиглості зерна



А



Б

Рис. 3. Вплив обробки щавлевою кислотою за умов ураження збудником септоріозу на активність каталази в листках озимої пшениці сорту Поліська 90 та Столична (Б): 1 – фаза виходу в трубку, 2 – фаза колосіння-цвітіння, 3 – молочної стиглості зерна

У сорту Столична обробка щавлевою кислотою заражених септоріозом рослин підвищувала активність каталази на 30 % порівняно з контролем і бівдвічі порівняно з зараженням септоріозом у фазі виходу в трубку, що може бути обумовлено реакцією запрограмованої загибелі у відповідь на проникнення гриба і спробу його розповсюдження по рослині. У фазах колосіння-цвітіння та молочної стиглості зерна активність каталази зменшувалась, що вказує на підвищення стійкості сорту до розвитку грибного захворювання.

Аналіз структури врожаю показав, що у оброблених щавлевою кислотою зменшувалось ступеня ураження рослин у обох сортів озимої пшениці, що сприяло росту стебла та прапорцевого листка, підвищувало кількість зерен в колосі (табл.).

Внаслідок ураження септоріозом формувались невивонені зернівки, що знижувало продуктивність рослин та якість отриманого зерна. Однак дія щавлевої кислоти зменшувала кількість неповноцінних зерен.

Висновки

Дослідження активності АПО, фенольних пероксидаз і каталази прапорцевих листків озимої пшениці сортів, Поліська 90 та Столична в умовах зараження септоріозом і обробки щавлевою кислотою в якості елісатора показали, що дія щавлевої кислоти підвищувала неспецифічну стійкість рослин до патогена. Аналіз структури врожаю підтвердив позитивний ефект щавлевої кислоти на реалізацію потенційної продуктивності рослин озимої пшениці в умовах зараження септоріозом.

Таблиця. Вплив щавлевої кислоти на морфометричні параметри рослин озимої пшениці сорту Столична за умов ураження септоріозом

Сорт, варіант	Висота рослин, см	Довжина прапорцевого листка	Довжина колоса, см	Кількість колосків в колосі	Кількість зерен в колосі, шт
Поліська 90, контроль	86,3 ± 2,0	19,4 ± 0,4	8,7 ± 0,3	16 ± 2	45 ± 2
Поліська 90, септоріоз	74,0 ± 2,0	16,0 ± 0,3	9,0 ± 0,3	15 ± 2	40 ± 2
Поліська 90, щавлева к-та	83,0 ± 2,0	18,7 ± 0,4	9,5 ± 0,3	18 ± 2	56 ± 3
Поліська 90, щавлева к-та+септоріоз	80,7 ± 2,0	19,8 ± 0,4	9,5 ± 0,3	17 ± 2	51 ± 2
Столична, контроль	82,5 ± 2,0	17,4 ± 0,4	9,0 ± 0,4	16 ± 2	48 ± 2
Столична, септоріоз	78,0 ± 2,0	15,3 ± 0,3	8,3 ± 0,3	15 ± 2	42 ± 3
Столична, щавлева к-та	85,1 ± 2,0	17,3 ± 0,4	9,0 ± 0,4	17 ± 2	50 ± 3
Столична, щавлева к-та+септоріоз	87,5 ± 3,0	18,1 ± 0,4	9,0 ± 0,4	17 ± 2	48 ± 2

Література

1. Бабаянц Л.Т., Мештерхази А., Вехтер Ф. и др. Методы селекции и оценки устойчивости пшеницы и ячменя к болезням в странах-членах. – Прага: СЭВ. – 1988. – 321 с.
2. Жук І.В. Дмитрієв О.П. Індукція захисних реакцій пшениці, інфікованої збудником септоріозу // Фактори експериментальної еволюції організмів. – К.: Логос, 2013. – 12. – С. 219–223.
3. Van Breusegem F., Vranova E., Dat J.F., Inze D. The role of active oxygen species in plant signal transduction // Plant Science. – 2001. – 161. – P. 405–414.
4. Kamilova F, Kravchenko L.V, Shaposhnikov A.I, Makarova N., Lugtenberg B. Effects of the tomato pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* and of the biocontrol bacterium *Pseudomonas fluorescens* WCS365 on the composition of organic acids and sugars in tomato root exudate // Mol. Plant. Microbe Interact. – 2006. – 19, N 10. – P. 1121–1126.
5. Mittler R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. TRENDS in Plant Science. – 2002. – 7, N 9. – P. 405–410.
6. Seevers P.M., Daly J.M., Catedral F.F. The role of peroxidase isozymes in resistance to wheat stem rust disease // Plant Physiol. – 1971. – 48, N 3. – P. 353–360.
7. Nakano Y., Asada K. Hydrogen Peroxide Is Scavenged by Ascorbate-Specific Peroxidase in Spinach Chloroplasts // Plant Cell Physiol. – 1981. – 22. – P. 867–880.
8. Luck H. Catalase. In HU Bergmeyer, Methods of Enzymatic Analysis. Academic Press. – New York, 1965. – P. 885–894.

ZHUK I.V., DMITRIEV A.P.

*Institute of Cell Biology and Genetic Engineering,
Ukraine, 03680, Kyiv, Acad. Zabolotnoho str., 148, e-mail: iren_zhuk@mail.ru*

THE EFFECT OF OXALIC ACID ON OF WHEAT DEFENSE RESPONSES AGAINST *SEPTORIA TRITICI* AGENT

Aims. The usage of biological elicitors for plant defense responses against plant pathogenic fungi may initiate tolerance of plants and prevent environmental pollution. The aim of research was to investigate the effect and oxalic acid in induction of wheat defense responses against *Septoria tritici* agent during ontogenesis. **Methods.** The phenol peroxidases, catalase and ascorbateperoxidase were measured in leaves of winter wheat plants varieties Poliska 90 and Stolychna upon treatment of oxalic acid and leaf blotch infection during ontogenesis. The morphometric parameters, degree of plant lesion and yield structure were

analyzed. **Results.** Results obtained suggest that biotic elicitor – oxalic acid induces two wheat cultivars (Stolychna and Poliska 90) defense responses against leaf blotch agent *Septoria tritici*. Initiation of defense responses in elicitor-treated plants occurs in a short period of time. The effect of oxalic acid treatment increased the activity of APO, phenol peroxidases and decreased the catalase activity. The effect of oxalic acid also increased the grain quantity in ear and plant height. **Conclusions.** Biochemical nature of defense responses elicitation revealed an increase activity of cytoplasmic peroxidase (CP) which induces lignin synthesis for mechanical strengthening of the cell wall. It is also shown that changes in activity of ascorbateperoxidase (APO) reflect the functioning of the photosynthetic metabolism in leaves cells mesophyllous.

Key words: wheat, *Septoria tritici*, oxalic acid, plant defense responses, antioxidant enzymes.

УДК 633.112.1;602.6:58

ЗАМБРИБОРЩ І.С., ДОБРОВА Г.О., ШЕСТОПАЛ О.Л., ПАЛАМАРЧУК А.І.

Селекційно-генетичний інститут – Національний центр насіннізнавства та сортовивчення, Україна, 65036, м. Одеса, Обідіопольська дорога, 3, e-mail: izambriborsh@gmail.com

ВПЛИВ ІНДУКЦІЙНОГО ЖИВИЛЬНОГО СЕРЕДОВИЩА НА ФОРМУВАННЯ НОВОУТВОРЕНЬ У КУЛЬТУРІ ПИЛЯКІВ *IN VITRO* ПШЕНИЦІ ТВЕРДОЇ

Тверда пшениця *Triticum durum* має велике значення в сільськогосподарській промисловості як сировина для виробництва макаронних та кондитерських виробів. Основним завданням селекції тетраплоїдної пшениці на сьогодні є створення холодостійких і посухостійких сортів з стабільним високим врожаєм якісного зерна. Отримання подвоєних гаплоїдів – це один з найпоширеніших біотехнологічних прийомів, який дозволяє істотно скоротити селекційний процес. Одним з основних методів отримання гаплоїдних рослин є культура пиляків *in vitro*, першим етапом якого є індукція новоутворень [1].

Мета даної роботи – дослідження впливу живильних середовищ на показник індукції новоутворень та розробка оптимальних умов для індукції новоутворень в культурі пиляків *in vitro* сортів і гібридів пшениці твердої Одеського регіону.

Матеріали і методи

До роботи були залучені 13 гібридів другого покоління пшениці твердої яро-озимої та 5 сортів пшениці твердої ярої.

Рослини вирощували на дослідних польових ділянках СГІ-НЦНС. Добір пагонів з колоссям зрізали з донорних рослин, коли вакуолізовані мікроспори пиляків знаходились у середньо-пізній одноядерній фазі розвитку. Попередню обробку зрізаних пагонів проводили у водному розчині АБК (0,5 мг/л) протягом 3-5 діб при +2 – +4 °С у темряві [2]. Колосся поверхнево стерилізували насиченим розчином

гіпохлориту кальцію за прийнятою методикою [3]. Пиляки експлантували на дев'ять варіантів агаризованих поживних середовищ для індукції новоутворень: 190-2 [4], ВAD-1 [5], С17 [6] та М42 [7] та їх модифікації. Модифікацію середовищ проводили за вмістом і складом амінокислот, органічних кислот та вітамінів [8].

Результати і обговорення

Для біотехнологів, що займаються методом культури пиляків *in vitro*, пшениця твердої є досить складним об'єктом дослідження. Насамперед, це пов'язано із низьким рівнем індукції новоутворень на першому етапі технологічного процесу отримання подвоєних гаплоїдів.

За результатами наших попередніх досліджень відмічено низький або нульовий рівень індукції новоутворень з пиляків сортів та гібридів пшениці твердої регіону Півдня України за використання стандартних для культивування пиляків *Triticum durum* живильних середовищ [9]. Тому наше дослідження було спрямоване на модифікацію складу живильних середовищ з метою підвищення досліджуваного показника. За складом і концентрацією гормонів (2,4-Д в концентрації 2 мг/л та кінетин в концентрації 0,5 мг/л [10]) та джерел вуглецю (сахароза в концентрації 60 г/л та глюкоза в концентрації 17,5 г/л [11]) всі експериментальні середовища були ідентичними. Модифікували лише вміст вітамінів, органічних та амінокислот.

Середовище 190-2 використовують як

індукційне для культури пиляків пшениці м'якої [2, 3]. Середовища BAD-1, C17 та M42 за літературними даними [5–7] є оптимальними для індукції новоутворень в культурі пиляків пшениці твердої. Модифікацію середовищ CM, CMн, C17н, C17В та M42н проводили на основі сольового складу стандартних середовищ (табл. 1).

Відомо, що для найбільш ефективного відгуку будь-якого експланту в культурі *in vitro* досліднику необхідно перш за все підібрати оптимальний склад живильного середовища. Як бачимо з таблиці 1, дослідні середовища істотно відрізняються як за загальною концентрацією мінеральних солей, так і за співвідношенням окремих елементів. Так, загальна мінералізація середовищ збільшується в ряду M42 – 190-2 – C17 – BAD-1. Оскільки занизька або завелика концентрація солей у живильному середовищі є лімітуючим фактором, що пригнічує формування новоутворень, а за результатами тогорічних досліджень середовища 190-2 і BAD-

1 виявились не прийнятними для генотипів пшениці твердої нашої зони, в подальшому ми зосередилися на модифікації живильних середовищ C17 та M42 (табл. 2).

Для покращення рівня індукції новоутворень на першому етапі культивування пиляків на основі мінерального складу середовища C17 розробили нове живильне середовище CM (власна назва), яке за складом вітамінів та органічних кислот аналогічне середовищу M42, а також додатково містило пролін та глютамін. З літературних джерел відомо, що вміст саме проліну та глютамінової кислоти стимулює індукцію новоутворень у пшениці м'якої [12]. Додавання даних амінокислот в середовище підвищує рівень індукції і для тетраплоїдних генотипів. Пролін та глютамін також додавали в живильні середовища CMн і C17В. Останнє додатково містило повний набір амінокислот за прописом BAD -1.

Таблиця 1. Сольовий склад індукційних живильних середовищ

Поживне середовище	Загальна концентрація солей, мг/л	Вміст мікроелементів, мг/л			
		К	N	P	Ca
C17	2418,56	655,41	299,06	91,11	132,85
M42	1505,89	147,88	223,56	55,59	179,73
190-2	1830,3	493,28	189,91	68,33	17,37
BAD-1	3216,88	667,11	356,79	77,47	244,80

Таблиця 2. Модифікації індукційних живильних середовищ

Середовище	Макро- та мікроелементи	Вітаміни	Органічні кислоти	Амінокислоти
CM	C17	M42	M42	+Глутамінова кислота – 400 мг/л +Пролін – 400 мг/л
CMн	C17	M42	S M42 - піруват	+Глутамінова кислота – 400 мг/л +Пролін – 400 мг/л
M42н	M42	M42	S M42 - піруват	_____
C17н	C17	C17	S C17 - піруват	_____
C17В	C17	C17	S C17 - піруват	BAD-1 +Глутамінова кислота – 400 мг/л +Пролін – 400 мг/л

У результаті роботи було відмічено, що за рахунок відносно великої концентрації аміно- та органічних кислот у складі дібраних середовищ, після автоклавування вони характеризувались низьким значенням рН (близько 4,9–5,1 рН). Завдяки модифікації середовищ СМн, С17н, С17В та М42н (половинний набір амінокислот та відсутність пірвіноградної кислоти) рН середовища було нормалізовано.

У результаті дослідження 18 генотипів пшениці твердої, які вирощували в умовах Одеського регіону, протестовані на здатність формувати новоутворень на першому етапі культури пиляків *in vitro*. Рівень індукції новоутворень різних генотипів пшениці широко варіював (від 0 до 10,53 шт./100 пиляків) в

залежності від складу індукційного живильного середовища. Оскільки отримана велика кількість експериментальних даних – кожен з 18 генотипів на 5 варіантах живильних середовищ, – показати всі результати дослідження у рамках однієї статі проблематично, наводимо найбільш типові дані для п'яти з протестованих генотипів (табл. 3).

Аналіз даних показав, що на модифікованих середовищах рівень індукції новоутворень вищий, порівняно із стандартними середовищами для більшості генотипів. Максимальну індукцію новоутворень майже для всіх досліджених генотипів спостерігали на модифікованих середовищах СМн та С17В.

Таблиця 3. Вплив складу живильного середовища на індукцію новоутворень в культурі пиляків сортів і гібридів пшениці твердої

Генотип	Середовище	Кількість пиляків, шт.	Кількість новоутворень	
			шт.	шт./100 пиляків
Т1	190-2	104	2	1,92 ± 1,35
	М42н	193	2	1,04 ± 0,73
	С17В	96	3	3,13 ± 1,78
	С17н	122	1	0,82 ± 0,82
	СМ	80	0	0
	СМн	304	19	6,25 ± 1,39
Т4	190-2	45	0	0
	М42 н	55	0	0
	С17	34	0	0
	С17В	116	0	0
	СМ	28	1	2,07 ± 0,50
	СМн	98	1	1,02 ± 1,02
Т5	190-2	91	0	0
	М42	55	0	0
	М42н	307	0	0
	С17	83	0	0
	С17н	479	5	1,04 ± 0,46
	СМн	95	10	10,53 ± 3,15
Т8	190-2	46	0	0
	М42	149	0	0
	М42н	281	1	0,36 ± 0,36
	С17В	193	7	3,63 ± 1,35
	С17н	158	4	2,53 ± 1,25
	СМ	123	2	1,63 ± 1,14
СМн	376	8	2,13 ± 0,74	
Т10	190-2	110	0	0
	М42	107	0	0
	М42н	225	3	1,33 ± 0,76
	С17	106	0	0
	С17В	117	5	4,27 ± 1,87
	С17н	188	4	0,53 ± 0,53
СМн	152	2	1,32 ± 0,92	

Максимальний рівень індукції для різних генотипів на цих середовищах становив: $10,53 \pm 3,15$ (СМн), $6,25 \pm 1,39$ (СМн), $4,27 \pm 1,87$ (С17В) шт./100 пиляків. На стандартних живильних середовищах індукція була нульовою або достовірно нижчою.

Показано, що загалом перші етапи андрогенезу більш інтенсивно (результативно) проходять на живильних середовищах з мінеральним складом, аналогічним середовищу С17 (табл. 1–3). Таким чином, можна зробити висновок, що дане живильне середовище містить збалансований склад макро- та мікроелементів, який є найоптимальнішим серед досліджених для культивування пиляків

пшениці твердої, вирощеної в умовах Півдня України.

Висновки

1. У результаті модифікацій стандартних живильних середовищ розроблено нові середовища СМ, СМн і С17В для індукції новоутворень в культурі пиляків *in vitro* пшениці твердої. Рівень індукції новоутворень на розроблених живильних середовищах вищий, ніж на базових.

2. Виявлено залежність рівня індукції новоутворень від складу індукційного середовища. Цей показник коливався в від 0 до $10,53 \pm 3,15$ шт./100 пиляків у межах одного генотипу залежно від середовища.

Література

1. Игнатова С.А. Клеточные технологии в растениеводстве, генетике и селекции возделываемых растений: задачи, возможности, разработки систем *in vitro*. – Одесса: Астропринт, 2011. – 224 с.
2. Игнатова С.О., Лобанова К.И., Шестопал О.Л. Способ підвищення регенераційного потенціалу в культурі пиляків озимої м'якої пшениці. Патент України МПК № від 10.04.07. Бюл. № 4.
3. Игнатова С.О., Жосонар М.В., Лобанова К.И., Шестопал О.Л. Отримання подвоєних гаплоїдів м'якої пшениці в культурі пиляків. Методичні рекомендації / Півден. біотехнолог. центр в рослин-ві УААН. – Одеса, 2008. – 12 с.
4. Trottier M.C., Collin J., Comeau A. Comparison of media further aptitude in wheat anther culture // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. – 1993. – N 35. – P. 59–67
5. Touraev A., Forster B.P., Jain S.M. Advances in haploid production in higher plants. // *Springer Science + Business Media B.V.: The Netherlands*. – P. 1–208.
6. Foroughi-Wehr B., Zeller F.J. *In vitro* microspore reaction of different German wheat cultivars // *Theor. Appl. Genet.* – 1990. – 79. – P. 77–80.
7. Kao K.N.; Saleem M., Abrams S., Pedras S., Horn D., Mallard C. Culture conditions for induction of green plants from barley microspores by anther culture methods // *Plant Cell Reports*. – 1991. – 9. – P. 595–607.
8. Замбриборщ І.С., Доброва Г.О., Шестопал О.Л., Ружицька О.М. Індукція новоутворень в культурі пиляків тетраплоїдної пшениці *Triticum dicoccum* (schrank) schuebl *in vitro*. – Сборник научных трудов SWorld. – Ивовоно: Маркова А.Д., 2013. – 50. – С. 28–32.
9. Замбриборщ І.С., Доброва А.А. Изучение способности сортов и гибридов твердой пшеницы к андрогенезу *in vitro* // Сборник тезисов международной Пущинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века», 16–21 апреля 2012 г. – Пущино: РАН, 2012. – С. 253.
10. Saidi N., Cherkaoui S., Chlyah A., Chlyah H. Embryo formation and regeneration in *Triticum turgidum* ssp. *durum* anther culture // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1997. – 51. – P. 27–33.
11. Maluszynski M., Kasha K.J., Forster B.P., Szarejko I. Doubled haploid production in crop plant // *Double haploid production in Crop plants*. – Netherland: Kluwer Academic Publisher, 2003. – P. 167–172.
12. Chu C.C., Hill R.D. An improvement improved anther culture method for obtaining higher frequency of pollen embryoids in *Triticum aestivum* L. // *Plant Sci.*, 1988. – 55. – P. 175–181.

ZAMBRIBORSH I.S., DOBROVA H.O., SHESTOPAL O.L., PALAMARCHUK A.I.

The Plant Breeding and Genetics Institute – National Center of Seed & Cultivar Investigation, Ukraine, 65036, Odessa, Ovidiopol'ska road, 3, e-mail: izambriborsh@gmail.com

CULTURE MEDIA INFLUENCE ON THE INDUCTION OF NEW FORMATION CREATION IN *IN VITRO* DURUM WHEAT ANTHER CULTURE

Aims. Durum wheat is the important wide spread agricultural crop. Double haploid obtaining is a biotechnological method in durum wheat breeding. The aims of this work were investigation of culture media influence on the process of induction in durum wheat anther culture and formation of the optimal for Odessa region durum wheat varieties and hybrids induction cultural media. **Methods.** We used the standard protocol of an anther culture method and modified the media composition. **Results.** We used 190-2, C-17,

M42 and BAD-1 basic media and modified the vitamins, amino and organic acids media composition. Standard media cannot be used as induction media for Odessa region durum wheat genotypes since the level of induction on that media was low. Embryo formation frequency on modified media was higher. **Conclusions.** New induction culture media were developed. The induction media composition impacted on the embryo formation frequency.

Key words: durum wheat, anther culture *in vitro*.

УДК 57.088 + 616.7:616-018.1”712.4”

КОВАЛЬЧУК М.В.¹, ГУЛЬКО Т.П.¹, ДРАГУЛЯН М.В.¹, ШУВАЛОВА Н.С.²,
ДЕРЯБИНА Е.Г.², КОРДИУМ В.А.^{1,2}

¹ Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины,

Украина, 03143, г. Киев, ул. Заболотного, 150, e-mail: kovmv@ukr.net

² ГУ «Институт генетической и регенеративной медицины НАМН Украины»,

Украина, 04114, г. Киев, ул. Вишгородская, 67

ИЗМЕНЕНИЯ В ПОПУЛЯЦИЯХ ЛЕЙКОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЖИВОТНЫХ С ИНДУЦИРОВАННЫМ ОСТЕОАРТРИТОМ ПОСЛЕ ВНУТРИСУСТАВНОГО ВВЕДЕНИЯ МСК

Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) вызывают в последнее время повышенный интерес, поскольку они имеют способность мигрировать в сайты повреждения тканей, могут дифференцироваться в разные типы клеток, имеют иммуномодулирующие свойства, легко выделяются и масштабируются в условиях *ex vivo*. МСК модулируют иммунные ответы в организме и изменяют течение различных воспалительных заболеваний, поэтому часто терапевтический эффект МСК осуществляется через их иммунорегуляторные функции [1–3].

Тот факт, что МСК *in vitro* могут ингибировать пролиферацию как сингенных, так и аллогенных лимфоцитов, а также уходить от иммунного надзора при трансплантациях, дал надежду на то, что МСК можно использовать в клинике как «универсальные» иммунопривилегированные доноры биологически активных веществ, игнорируя отличия по главному комплексу гистосовместимости (ГКГ). С другой стороны, исследования на лабораторных животных показали, что аллогенные МСК запускают донор-специфические иммунные реакции у реципиента [4, 5].

В частности, МСК человека и ряда других млекопитающих, не экспрессируют антигены II класса ГКГ при нормальных физиологических условиях, тогда как индукция их экспрессии определяется при дифференциации клеток [6]. При введении МСК в поврежденные ткани может наблюдаться их дифференциация, что ведет к появлению или усилению экспрессии антигенов I и II классов ГКГ и синтезу донор-

специфических алло-антител в сыворотке экспериментальных животных, что способствует удалению клеток из тканей реципиента. Встает вопрос о пересмотре концепции иммунопривилегированной природы МСК при алло- и ксенотрансплантациях. Этому также способствуют факты лишь кратковременного выживания трансплантированных МСК у иммунокомпетентного реципиента, а также ряд изменений в субпопуляциях клеток иммунной системы реципиента под действием донорных МСК.

Так как МСК обладают противовоспалительными свойствами и принимают участие в репарации тканей, мы исследовали влияние МСК Вартонового студня пуповины человека на процесс восстановления хрящевой ткани при индуцированном остеоартрите у крыс. Остеоартрит – наиболее частое ревматическое заболевание, которое характеризуется дегенерацией суставного хряща, в основном, благодаря изменениям в сторону катаболической активности и уменьшению количества хондроцитов. Способность последних восстанавливать матрикс снижается как с возрастом, так и при ряде повреждений [7]. Если происходит восстановление, то часто образуется неполноценный хрящ с пониженным содержанием коллагена второго типа и агрекана. Показано, что МСК защищают хондроциты от дегенерации, связанной с развитием остеоартрита [8].

Целью нашего исследования было

установление времени пребывания МСК в поврежденном суставе (выживаемость донорных МСК на фоне динамики восстановления хрящевой ткани) и выявление изменений в популяциях лейкоцитов в периферической крови реципиента при локальном введении МСК.

Материалы и методы

Лабораторные животные. В качестве экспериментальных животных использовались крысы линии Wistar, самцы, вес 180–200 г. Животные содержались в стандартных условиях (температура 21–23 °С, влажность 30–70 %, 12 часовой период освещения, корм и вода – ad libitum).

Выделение МСК. МСК были получены из матрикса (Вартоновского студня) пупочного канатика человека методом эксплантов. МСК культивировали до 2-го пассажа, в среде DMEM с низким содержанием глюкозы (РАА, Австрия), с добавлением бензилпеницилина (100 ед/мл среды), стрептомицина (100 мкг/мл среды), 2 mM L-глутамина (Sigma-Aldrich, США), FGF2 (2,5 нг/мл среды («Рефиброл», Интерфармбиотек, Украина) и 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (РАА), в пластиковых флаконах для культивирования (75 см²) (РАА, Австрия). На каждом пассаже клетки подсчитывали и анализировали экспрессию поверхностных маркерных белков CD90, CD73 и CD105, с помощью антител, меченных флуоресцентными метками, на проточном цитофлуориметре FACSAria [9]. Процент клеток, несущих маркерный белок на 2-м пассаже, во всех опытах был выше 89 %.

Получение модели остеоартрита у крыс. Животным (в возрасте 1,5 мес.) внутрисуставно вводили 0,1 мл йодуксусной кислоты (3 мг йодуксусной кислоты в 50 мкл 0,9 % NaCl) [10]. На 7-е сутки животным с индуцированным остеоартрозом проводили инъекцию $1,5 \times 10^6$ МСК человека в 50 мкл ФБР.

Выделение ДНК. Тотальную ДНК из внутрисуставных смывов и МСК выделяли по Гринбергу [11]. ДНК из внутрисуставных соскобов выделяли по Брейну и соавт. [12]. Концентрацию и качество ДНК определяли на спектрофотометре NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Berlin, Germany).

Полимеразная цепная реакция. Детекцию клеток, содержащих ДНК человека у крыс, проводили с помощью праймеров, амплифицирующих альфа-сателлитную ДНК

человека, расположенную в участках центромерного хроматина всех хромосом человека [13]. Полимеразную цепную реакцию проводили в 0,5 мл-микропробирках на приборе ТП4 – ПЦР01 «Терцик» («ДНК-технология», РФ) по следующей программе: денатурация при 95 °С – 30с, отжиг при 60 °С – 30с и элонгация при 72 °С – 30с. Реакционная смесь объемом 20 мкл содержала: 10x ПЦР буфер, 0,2 mM нуклеотидтрифосфаты, (каждого dNTP), 3 mM хлорид магния, Taq-полимеразу «Fermentas» (Литва), ДНК и праймеры к альфа-ДНК человека («Синпол», Россия):

Для ПЦР использовали следующие олигонуклеотиды:

Cr17_1a f(5'-GGG ATA ATT TCA GCT GAC TAA ACA G-3') 15..39

Cr17_2b r(5'-TTC CGT TTA GTT AGG TGC AGT TAT C-3') 867..891 [13].

Размер ампликона составляет 867 bp.

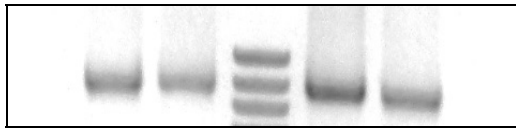
Разделение продуктов амплификации проводили в 1,2 % агарозе в ТАЕ с последующей визуализацией в ультрафиолетовом освещении с использованием бромистого этидия. В качестве маркеров длины фрагментов продуктов ПЦР использован маркер GeneRuler™ 50 п. н. («Fermentas», Lithuania).

Результаты и обсуждение

Развитие экспериментального остеоартрита у крыс путем инъекции в коленный сустав йодоуксусной кислоты сопровождалось как разрушением хрящевой поверхности сустава, так и воспалительными процессами в окружающих тканях. После введения МСК проводили детекцию ксеногенного материала с использованием метода ПЦР. Вследствие многокопийности альфа-сателлитной последовательности метод обладает высокой чувствительностью.

Для изучения выживаемости донорных МСК и динамики тканевых изменений в месте их введения (поврежденном коленном суставе) через 0,5, 2, 24 часа и 7 суток получали смывы и соскобы с хрящевой поверхности сустава, которые использовали для выделения ДНК, служащей матрицей для ПЦР (рис. 1).

Как видно из результатов ПЦР, альфа-ДНК человека выявляется в полости сустава по крайней мере на протяжении суток. Через 7 суток альфа-ДНК МСК в реакции амплификации не выявлялась при чувствительности метода в наших опытах 1 клетка донора на 10000 клеток реципиента.



1 2 3 4 5 6 7

Рис. 1. Результаты ПЦР на наличие альфа-ДНК человека в образцах из полостей поврежденных суставов крыс после введения МСК матрикса пуповины человека через разные промежутки времени. 1 – смыв из сустава после введения физиологического раствора (контроль) 30 мин; 2 – смыв после 30 мин; 3 – хрящевая поверхность сустава после 30 мин; 4 – маркер молекулярного веса 100 bp DNA Ladder (Fermentas); 5 – ДНК МСК; 6 – смыв после 24 часов; 7 – смыв после 7 суток

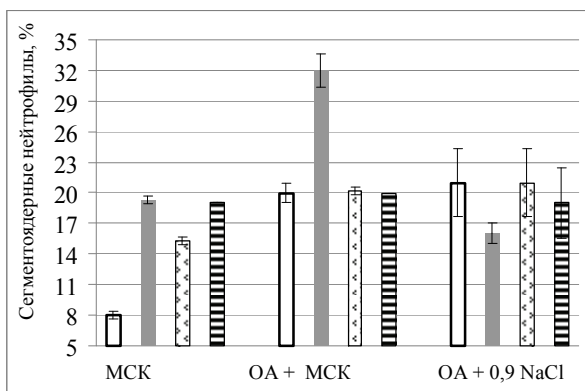
Исходя из непродолжительности существования ксеногенных клеток в пораженном суставе, можно предположить, что последние элиминировались иммунной системой животного. Для того, чтобы оценить иммуногенность МСК пуповины в экспериментальных животных, мы определяли ответ иммунной системы по изменению пулов клеток белой крови. Анализировались образцы периферической крови, собранные в день введения МСК, и на 7, 14, 21 день после внутрисуставной инъекции МСК. Оценивались следующие группы животных: 1) интактные

животные + МСК; 2) животные с индуцированным остеоартритом + МСК; 3) животные с индуцированным остеоартритом + ФБР (рис 2).

Полученные результаты показали однозначное узнавание МСК клетками иммунной системы реципиента, о чем свидетельствует увеличение пула нейтрофилов в периферической крови, что было отмечено и в других работах [14]. Наблюдалось достоверное увеличение лимфоцитов в группе интактных животных после введения МСК (рис. 2). В обеих группах животных с индуцированным остеоартритом не обнаруживалось существенных количественных изменений после введения МСК, что могло быть связано с первичной воспалительной реакцией иммунной системы животных на «собственно» повреждение тканей при внутрисуставной инъекции.

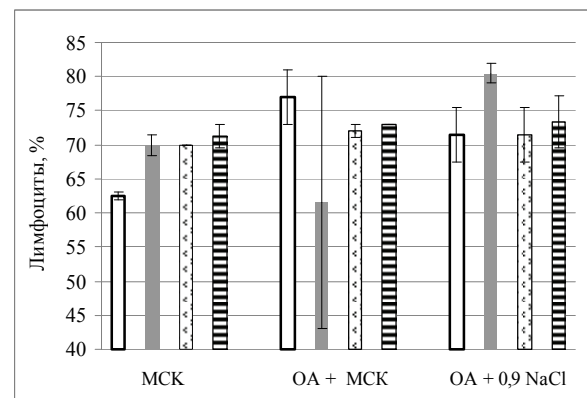
Выводы

По результатам ПЦР, ДНК человека, введенная с трансплантированными МСК, выявлялась в течение первых суток после инъекции. После введения МСК отмечались достоверные изменения в популяциях лейкоцитов периферической крови модельных животных, что свидетельствует об иммуногенности МСК человека для животных с индуцированным остеоартритом.



А

□ точка введения МСК; ■ 7 день после введения МСК;
 ××××× 14 день после введения МСК; ▨ 21 день после введения МСК.



Б

Рис. 2. А – количество нейтрофилов (%) в периферической крови трех групп животных в день введения МСК и через 7, 14 и 21 дней после инъекции. ($p < 0,05$). Б – количество лимфоцитов (%) в периферической крови трех групп животных в день введения МСК и через 7, 14 и 21 день после инъекции ($p < 0,05$)

Литература

1. English K. Mechanisms of mesenchymal stromal cell immunomodulation // *Immunol. Cell Biol.* – 2013. – 91. – P. 19–26.
2. Le Blanc K, Ringden O. Immunobiology of human mesenchymal stem cells and future use in hematopoietic stem cell transplantation // *Biol. Blood Marrow Transplant.* – 2005. – 11. – P. 321–334.
3. Lindolfo da Silva Meirelles, Aparecida Maria Fontes, Dimas Tadeu Covas, Arnold I. Caplan Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells // *Cytokine Growth Factor Rev.* – 2009. – 20. – P. 419–427.
4. Schu S., Nosov M., Lisa O’Flynn L., Shaw G., Treacy O., Barry F., Murphy M., O’Brien T., Ritter T. Immunogenicity of allogeneic mesenchymal stem cells // *J. Cel. Mol. Med.* – 2012. – 16, N 9. – P. 2094–2103.
5. Nauta A.J., Westerhuis G., Kruisselbrink A.B., Lurvink E.G., Willemze R., Fibbe W.E. Donor-derived mesenchymal stem cells are immunogenic in an allogeneic host and stimulate donor graft rejection in a nonmyeloablative setting // *Blood.* – 2006. – 108. – P. 2114–2120.
6. Huang X.P., Sun Z., Miyagi Y., McDonald Kinkaid H., Zhang L., Weisel R.D., Li R.K. Differentiation of allogeneic mesenchymal stem cells induces immunogenicity and limits their long-term benefits for myocardial repair // *Circulation.* – 2010. – 122. – P. 2419–2429.
7. Loeser R.F., Goldring S.R., Scanzello C.R., Goldring M.B. Osteoarthritis: a disease of the joint as an organ // *Arthritis Rheum.* – 2012. – 64. – P. 1697–1707.
8. Ter Huurne M., Schelbergen R., Blattes R., Blom A., de Munter W., Grevers L.C., Jeanson J., Noel D., Casteilla L., Jorgensen C., van den Berg W., van Lent P.L. Antiinflammatory and chondroprotective effects of intraarticular injection of adipose-derived stem cells in experimental osteoarthritis // *Arthritis Rheum.* – 2012. – 64. – P. 3604–3613.
9. Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D., Deans R., Keating A., Prockop D., Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement // *Cytotherapy.* – 2006. – 8. – P. 315–317.
10. Bendele A.M. Animal models of osteoarthritis // *Musculoskel Neuron Interact.* – 2001. – 1, N 4. – P. 325–329.
11. Grimberg J., Nawoschik S., Belluscio L., McKee R., Turck A., Eisenberg A. A simple and efficient non-organic procedure for the isolation of genomic DNA from blood // *Nucleic Acids Res.* – 1989. – 17. – P. 8390.
12. Biase F.H., Franco M.M., Goulart L.R., Antunes R.C. Protocol for extraction of genomic DNA from swine solid tissues // *Genet. Mol. Biol.* – 2002. – 25. – N 3–4. – P. 313–315.
13. Becker M., Nitsche A., Neumann C., Aumann J., Junghahn I., Fichtner I. Sensitive PCR method for the detection and real-time quantification of human cells in xenotransplantation systems // *Br. J. Cancer.* – 2002. – 87, N 11. – P. 1328–1335.
14. Samoa I.A., Dufour J., Lanclos C., Brunt J., Phinney D.G. Cell-dose-dependent increases in circulating levels of immune effector cells in rhesus macaques following intracranial injection of allogeneic MSCs // *Exp. Hematol.* – 2010. – 38, N 10. – P. 957–967.

KOVALCHUK M.V.¹, GYLKO T.P.¹, DRAGULJAN M.V.¹, SHUVALOVA N.S.², DERYABINA O.G.², KORDUM V.A.^{1,2}

¹*Institute of Molecular Biology and Genetics National Academy of Sciences of Ukraine, Ukraine, 03143, Kiev, Zabolotnogo str., 150, e-mail: kovmv@ukr.net*

²*State Institute “Institute of Genetic and Regenerative Medicine NAMS Ukraine”, Ukraine, 04114, Kiev, Vyshgorodska str., 67*

CHANGES IN CIRCULATING LEUKOCYTE POPULATIONS FOLLOWING INTRAARTICULAR INJECTION hMSC IN ANIMAL OSTEOARTHRITIS MODEL

Aim. To investigate the transplanted human Wharton’s Jelly MSC survival in rat model of experimental osteoarthritis, and changes in circulating leukocyte populations following MSC injection. **Methods.** Culturing of MSC *in vitro*. PCR analysis of DNA from animal tissue. Blood cell count and calculation of circulating lymphocyte subpopulations **Results.** It has been shown by PCR that human alpha-DNA can be detected during one day in the wounded hosts inside injured stifle joint. Blood cell count revealed reliable changes in lymphocyte subpopulations in peripheral blood. **Conclusions.** Detection of MSC donor DNA was negatively correlated with time from MSC injection to sample collection. MSC transplantation induced transient reliable increases in circulating white blood cells, lymphocytes, and neutrophils in most transplant recipients but not control animals. This study demonstrates that hMSCs are weakly immunogenic *in vivo* in animal osteoarthritis model.

Key words: hMSC, survival, immunogenicity, osteoarthritis model.

ВМІСТ ВІЛЬНОГО ПРОЛІНУ ПРИ РЕАЛІЗАЦІЇ МОРФОГЕНЕТИЧНОГО ПОТЕНЦІАЛУ СОНЯШНИКА ЗА *AGROBACTERIUM*-ОПОСЕРЕДКОВАНОЇ ТРАНСФОРМАЦІЇ

Важливий напрямок метаболічної інженерії пов'язаний із дослідженням ролі проліну в процесах реалізації морфогенетичного потенціалу і варіабельності його вмісту під впливом обеззброєних штамів *Agrobacterium tumefaciens*. Оскільки морфогенетичний потенціал клітини є динамічною характеристикою, логічно передбачити, що його зміни поєднані із змінами загального метаболізму. Вочевидь найбільший ефект буде відображатись у найбільш варіабельних участках біохімічного синтезу.

Серед ендогенних амінокислот, які постійно присутні в рослинах, особливий інтерес привертає пролін (*Pro*). Набуває актуальності уява про пролін як сигнальну/регуляторну молекулу в процесах росту, диференціювання клітин та їх запрограмованої загибелі, а також про роль проліну в реалізації морфогенетичного потенціалу при культивуванні *in vitro* [1–4].

Встановлено, що система *in vitro* здійснює багатофакторний вплив на культивовані тканини, корінним чином змінюючи їх анатомічну будову, метаболізм, гормональний статус [5].

При культивуванні *in vitro*, використання екзогенного проліну може підвищувати частоту регенерації пагонів ряду культур, існують дані про підвищення вмісту ендогенного *Pro* в ході соматичного ембріогенезу [6].

Раніше ми відзначали, що динамічні зміни вмісту ендогенного проліну можуть бути пов'язані з процесами органогенезу рослин *in vitro* [7]. Оскільки, показано, що *Agrobacterium tumefaciens* може викликати зміни в метаболізмі ряду амінокислот [8], постало питання порівняльного вивчення вмісту проліну в експлантатах, різних за здатністю до індукції пагоноутворення, і регенерантах після інфікування *Agrobacterium tumefaciens*.

Матеріали та методи

Об'єктом дослідження був соняшник (*Helianthus annuus* L.) сорту Прометей (Інституту олійних культур НАН України, Запорізької обл.). Стерильні сім'янки пророщували на агаризованому безгор-

мональному середовищі Мурасіге-Скуга. Індукцію пагоноутворення здійснювали на регенераційному середовищі Мурасіге-Скуга [9]. Для визначення вільного проліну відбирали тканини різного терміну культивування, які відрізнялися здатністю до реалізації морфогенетичного потенціалу (рис. 1).

Рослинний матеріал культивували при температурі 25–26 °С, 16-годинному фотоперіоді та освітленні 3–4 клк. Проби для аналізу відбирали та фіксували в один і той же час доби. Рівень вільного *Pro* вимірювали в кожному окремому експлантаті та відповідному регенеранті (якщо морфогенез відбувався), проби відбирали не менш ніж у трьохкратній аналітичній повторності.[10].

Agrobacterium-опосередковану трансформацію здійснювали з використанням штаму LBA4404, який містив бінарний вектор рВі2Е із дволанцюговим РНК-супресором гена проліндегідрогенази, отриманим на основі гена арабідопсису ProDH1, а також селективний ген неоміцинфосфотрансферази (*nptIII*) *E. coli* [11]. Векторна конструкція люб'язно надана к.б.н. Кочетовим А.В. (Інститут цитології і генетики Сибірського відділення РАН, м. Новосибірськ, Росія). Для порівняльного аналізу обирали регенеранти одного і того ж віку.

Результати та обговорення

Адекватні швидкі реакції з боку рослинних тканин у відповідь на умови культивування *in vitro* та їх зміни проявляються перед усім у найбільш чутливих ділянках. Такими є області проліферації, ділянки з додатковими пораненнями, сегменти з активним метаболізмом та зміненним гормональним статусом. Внаслідок цього, як було вказано вище, інформативною характеристикою даних областей може бути підвищений рівень вільного проліну. Вміст вільного *Pro* вимірювали у зразках тканин соняшника, наведених на рисунку 1.

Як видно із даних, представлених на рис. 2 (№ 1–3), із збільшенням тривалості культивування відбувалось підвищення вмісту вільного проліну в сім'ядолях та в експлантаті, потенційно здатному до індукції паго-

ноутворення. Однак, у той же час вміст проліну у тканинах достовірно відрізнявся. Найвищий рівень амінокислоти фіксували у сегменті проростка, який містив частину сім'ядолі із гіпокотилем (№ 3), що могло бути відображенням існування градієнта концентрації амінокислоти.

На 4–5 добу проростання рівень *Pro* суттєво підвищувався, після чого тримався на достатньо високому рівні. При перенесенні потенційно здатних до морфогенезу експлантатів соняшника на середовище для регенерації, кількість *Pro* в них майже чотирьохразово знижувалась. Вже на 6 добу культивування спостерігались суттєві відмінності за рівнем вільного проліну між

тканинами, у яких індукувалось пагоноутворення та тканинами, де воно було відсутнє (рис. 2, № 4 та № 5, відповідно). В експлантаті, де відбувалась регенерація пагона, акумулювалась приблизно в 2 рази більша кількість *Pro*.

У сформованих 6-добових пагонах (рис. 2, № 6) вміст проліну суттєво перевищував рівень амінокислоти, який вимірювали в експлантатах, з яких ініціювалась регенерація. Більш того, в експлантатах, від яких були відокремлені пагони, рівень цієї амінокислоти достовірно не відрізнявся від показників нерегенеруючих тканин (№ 7, № 8). У подальшому в таких культивованих експлантатах, кількість проліну залишалась стабільно низькою.

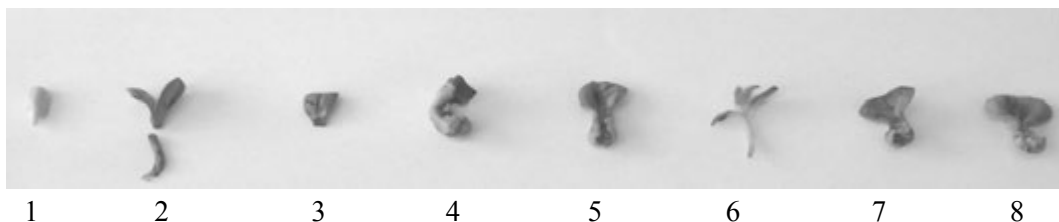


Рис. 1. Тканини соняшника, в яких вимірювали вміст вільного проліну

1. Сім'янка через 24 години культивування пророщування. Перед проведенням аналізу сім'янку розділяли на 2 сім'ядолі, які аналізували окремо.

2. Сім'ядолі проростків через 4 доби пророщування. Перед проведенням аналізу відокремлювали корінець та апікальну бруньку. Кожну сім'ядолу аналізували окремо.

3. Первинний експлантат, потенційно здатний до індукції пагоноутворення: ~ 2/3 сім'ядолі з розщепленою верхньою частиною гіпокотила, розміром 1–2 мм, сформований із 4-х добових проростків.

4. Первинний експлантат на початковій стадії регенерації; 6 діб на середовищі для регенерації.

5. Первинний експлантат із відсутністю регенерації; 6 діб на середовищі для регенерації.

6. Регенерант після відокремлення від експлантату; культивування протягом 16-ти діб на середовищі для регенерації.

7. Експлантат після відокремлення від регенеранта; 16 діб на середовищі для регенерації.

8. Експлантат через 10 діб після відокремлення регенеранта; 26 діб на середовищі для регенерації.

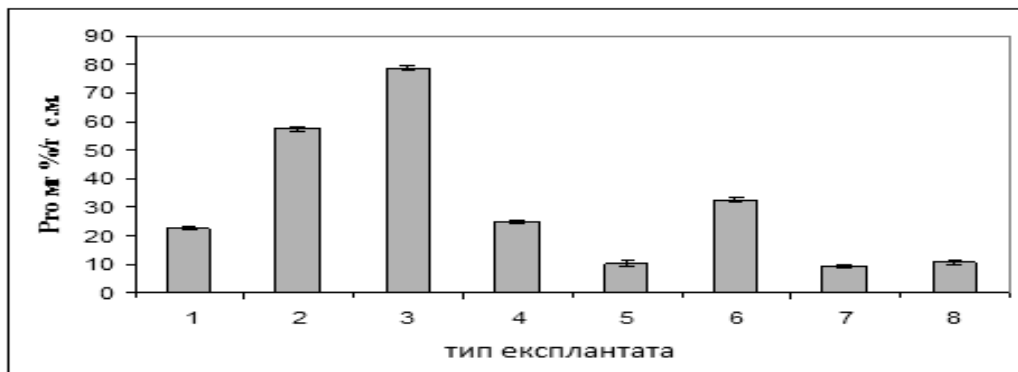


Рис. 2. Вміст вільного проліну в тканинах соняшника із різною здатністю до реалізації морфогенетичного потенціалу

Порівняння вмісту вільного проліну в культивованих тканинах соняшника виявили два показових моменти. По-перше, відбувалось активне зниження вмісту амінокислоти в експлантатах при культивуванні *in vitro* на регенераційному середовищі. По-друге, спостерігалась спряженість подій: пагоноутворення / рівень *Pro*, що свідчить на користь можливої участі проліну в загальній системі регуляції процесу органогенезу соняшника *in vitro*.

Феномен динамічного варіювання вмісту вільного проліну загальновідомий. Причини цього явища різні. У конкретному випадку зниження вмісту проліну може виникати із ряду причин. Із збільшенням віку культури швидкість процесів синтезу уповільнюється (в системі *in vitro* це явище посилюється, внаслідок вичерпання ресурсів). При цьому старіють швидше неморфогенні тканини. На це вказують і інші автори [3, 5]. Не виключають також і вплив середовища культивування, зокрема регуляторів росту НУК і БАП, які були присутні в регенераційному середовищі.

Встановлено, що при культивуванні *H. annuus in vitro* максимальний рівень накопичення вільного *Pro* спостерігався тільки в експлантатах, здатних до індукції пагоноутворення. Це свідчить про те, що вільний пролін може бути одним із факторів, який бере участь у процесах росту та диференціювання клітин соняшника *in vitro*. Більш того, показник вмісту вільного проліну може бути застосований для первинного скринінгу експлантатів соняшника.

Оскільки рівень вільного проліну є динамічним показником, проводили порівняльний аналіз його вмісту в регенерантах

соняшника одного віку, отриманих від експлантів, які піддавалися та не піддавалися *Agrobacterium*-опосередкованій трансформації.

Оскільки, *A. tumefaciens* може викликати зміни метаболізму ряду амінокислот [8], досліджували вплив конкретного штаму на синтез вільного проліну. Показано, що інокуляція обеззброєним штамом *LBA4404* не впливала на метаболізм проліну в процесі індукції пагоноутворення (рис. 3). Так, у регенерантів, у геном яких не був інтегрований дЛРНК-супресор гена проліндегідрогенази, рівень *Pro* за нормальних умов був суттєво нижчий, ніж у трансформантів, які містили даний ген. Це може бути результатом часткової супресії гена проліндегідрогенази (рис. 4). Аналогічними властивостями характеризувалися трансформанти тютюну, які несли таку ж конструкцію [12].

Підвищений рівень проліну в трансгенних регенерантах соняшника (відносно рослин контролю) зберігався протягом культивування *in vitro* (14- та 28 доба), що свідчить на користь зменшення рівня транскрипції ендогенних генів проліндегідрогенази.

Висновки

1. Рівень вільного проліну може бути маркером тотипотентності тканин при культивуванні соняшника *in vitro*.

2. Інокуляція суспензією клітин агробактерії (штам *LBA4404*) не впливає на вміст вільного проліну в регенерантах та експлантатах, в яких здійснюється індукція пагоноутворення.

3. Трансформанти соняшника відзначались підвищеним рівнем вільного проліну протягом пасажу.

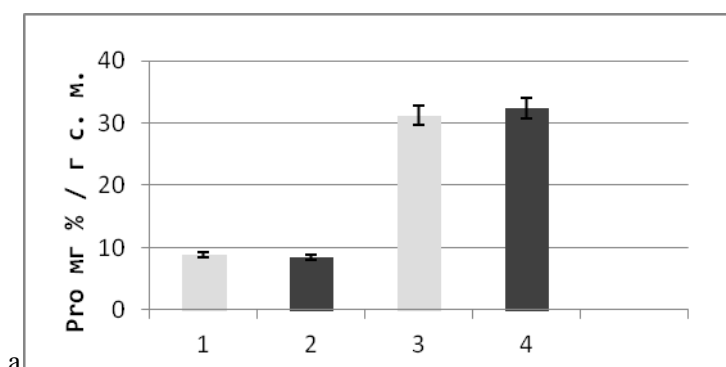


Рис. 3. Вміст вільного проліну в експлантатах (1, 2) та отриманих із них регенерантах (3, 4) соняшника.

Примітка: 1,3 – без інокуляції; 2, 4 – інокуляція штамом *LBA4404*.

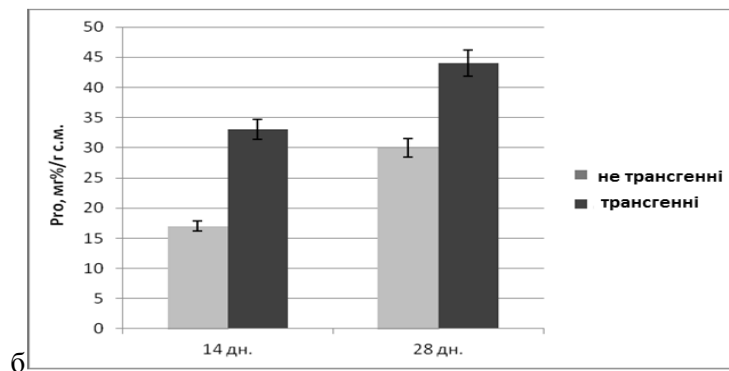


Рис. 4. Вміст вільного проліну в трансгенних та нетрансгенних рослинах-регенерантах соняшника при культивуванні *in vitro*

Література

1. Verbruggen N., Hermans C. Proline accumulation in plants: A review // *Amino Acids*. – 2008. – 35, № 4. – P. 753–759.
2. Kavi Kishor P.B., Sangam S., Amrutha R.N. Laxmi P.S., Naidu K.R., Rao K.R.S.S., Rao S., Reddy K.J., Theriappan P., Sreenivasulu N. Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: Its implication in plant growth and abiotic stress tolerance // *Current Sci*. – 2005. – 88, N 3. – P. 424–438.
3. Maggio A., Miyazaki I.S., Veronese P., Fujita T., Ibeas J.I., Damsz B., Narasimhan M.L., Hasegawa P.M., Joly R.J., Bressan R.A. Does proline accumulation play an active role in stress-induced growth reduction // *Plant J*. – 2002. – 31, N 6. – P. 699–712.
4. Szabados L.O., Savoure A. Proline: a multifunctional amino acid // *Trends in Plant Science*. – 2009. – 15, N 2. – P. 89–97.
5. Maliga P. Isolation and characterization of mutants in plant cell culture // *Ann. Rev. Plant Physiol*. – 1984. – 35. – P. 519–542.
6. Rastagi S., Rizvi S.M.H., Singh R.P., Dwivedi A.N. *In vitro* regeneration of *Zeucaena leucocephala* by organogenesis and somatic embryogenesis // *Biologia Plantarum*. – 2008. – 52, N 4. – P. 743–748.
7. Сергеева Л.Є., Михальська С.І., Комисаренко А.Г., Броннікова Л.І., Тищенко О.М. Спосіб оцінки морфогенетичного потенціалу тканин соняшника за рівнем ендogenous проліну. Патент України на корисну модель № 64611 від 2011. Бюл № 21.
8. Simoh S., Quitana N., Kim H.K., Choi Y.H., Verpoorte R. Metabolic changes in *Agrobacterium tumefaciens* infected *Brassica rapa* // *J. Plant Physiol*. – 2009. – 166, N 10. – P. 1005–1014.
9. Михальская С.И., Комисаренко А.Г., Малина А.Э., Сергеева Л.Е., Тищенко Е.Н. Оптимизация метода индукции регенерации *in vitro* инбредных линий и гибридов подсолнечника // *Физиология и биохимия культ. растений*. – 2009. – 41, № 3. – С. 255–261.
10. Андрищенко В.К., Саянова В.В., Жученко А.А. и др. Модификация метода определения пролина для выявления засухоустойчивых форм *Lycopersicon Tourm.* // *Изв. АН МССР*. – 1981. – № 4. – С.55–60.
11. Комисаренко А.Г., Михальская С.И., Кочетов А.В., Тищенко Е.Н. Индукция регенерации *in vitro* при *Agrobacterium* – опосредованной трансформации инбредных линий подсолнечника // *Biotech. Acta*. – 2013. – 6, № 1. – P. 113–118.
12. Ибрагимова С.С., Колодяжная Я.С., Герасимова С.В., Кочетов А.В. Частичная супрессия гена пролиндегидрогеназы увеличивает устойчивость растений к различным видам абиотических стрессов // *Физиол. раст.* – 2012. – 59. – С. 99–107.

KOMISARENKO A.G., MYKHALSKA S.I., SERGEEVA L.E., KURCHII V.M., TISHCHENKO E.N.

Institute of Plant Physiology and Genetics of National Academy of Science of Ukraine, Ukraine, 03022, Kyiv, Vasylykivska str., 31/17, e-mail: svetlana_mykhalska@mail.ru

THE FREE PROLINE CONTENTS VIA THE MORPHOGENESIS SUNFLOWER *AGROBACTERIUM*-MEDIATED TRANSFORMATION

Aim. Plant tissue totipotency – is the essential ability that is used in biotechnology. This peculiar feature responds to various changes of the total metabolism as well as fluctuations of some substances. Proline takes part in diverse functions of the plant both under normal and stress conditions. Proline has a concern in morphogenesis and genetic transformation. The levels of free proline in sunflower tissues with different

morphogenetic abilities and in tissues of transformed plant were investigated. **Methods.** *Agrobacterium*-mediated transformation with LBA 4404 strain with pBi2E suppressor proline dehydrogenase gene was created. The sunflower transformants were regenerated. The free proline contents were estimated in different tissues of normal and transformed plants. **Results.** The levels of free proline raise in tissues with high totipotency (initial explants and regenerants at the early stages of morphogenesis). The proline contents in transformed plants exceeded those parameters of controls during whole cultivation *in vitro*.

Key words: sunflower, *Agrobacterium*-mediated transformation, morphogenesis, proline.

УДК 581.132

КОСОБРЮХОВ А.А., КРЕСЛАВСКИЙ В.Д., ШИРШИКОВА Г.Н.

Институт фундаментальных проблем биологии РАН,

Россия, 142290, Московская область, г. Пушкино, ул. Институтская, 2, e-mail: kosobr@rambler.ru

РОЛЬ ФИТОХРОМА В РЕГУЛЯЦИИ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА АРАБИДОПСИСА ДИКОГО ТИПА И МУТАНТА *hy2*

Система регуляторных фоторецепторов, в число которых входят фитохромы, играет важную роль в процессах роста и фотоморфогенеза растений, и их роль в этих процессах во многом изучена [1, 2], в частности действие фитохрома В (ФхВ) [3, 4]. Однако о его роли как регулятора метаболизма и, в частности, о взаимосвязи активности отдельных звеньев фотосинтетического аппарата с состоянием ФхВ и его содержанием известно мало. Ранее нами показано, что существует связь между состоянием фитохромной системы и устойчивостью фотосинтеза к действию стрессоров различной природы. Повышение содержания активной формы фитохрома В путем облучения растений после темнового периода импульсом красного света $\lambda = 660$ или 625 нм приводило к увеличению стресс-устойчивости фотосистемы 2 (ФС 2) растений шпината, салата к УФ-В а также к УФ-А радиации [5, 6]. Однако механизм стресс-защитного действия активной формы фитохрома остается мало изученными и для исследований такого рода в настоящее время используют растения с недостатком или с избытком отдельных типов фитохрома, в частности, трансгенные растения арабидопсиса, огурца, картофеля [7, 8].

В задачу данной работы входило исследование роли фитохрома В в регуляции метаболических реакций фотосинтетического аппарата при облучении растений УФ-А радиацией.

Материалы и методы

Объектами служили растения арабидопсиса дикого типа (ДТ) и мутант *hy2*.

Мутант по гену *HY2* относится к группе НУ-мутантов *Arabidopsis thaliana*, имеющих удлинённый гипокотиль. Ген *HY2* кодирует фермент фитохромобилин-синтазу (ФХБ-синтазу), ферредоксин-зависимую биливердинредуктазу. В результате мутант дефицитен по ФхВ.

Для облучения растений УФ-А использовали лампу Т8 18W BLB (Selecta) с основным диапазоном излучения в области длин волн 300–400 нм и с максимумом 365 нм. Интенсивность УФ-облучения на уровне листьев была 12 Вт м^{-2} , время облучения 2 ч. Газообмен CO_2 измеряли с помощью инфракрасного газоанализатора LCP⁺ фирмы ADC BioScientific Ltd., соединенного с листовой камерой площадью $6,25 \text{ см}^2$. Для построения углекислотных кривых с помощью микропроцессора газоанализатора устанавливали концентрацию углекислоты в воздухе от 0 до $1600 \text{ мкмоль CO}_2 \text{ моль}^{-1}$. Анализ углекислотной кривой CO_2 -газообмена проводили по модели Фаркьюхара [9] в модификации [10–12].

Результаты и обсуждение

Облучение растений арабидопсиса УФ-А в течение 2 ч. приводило к снижению скорости фотосинтеза в течение нескольких часов в последствии фактора. Вместе с тем, растения дикого типа и мутант по разному реагировали на стрессовое воздействие. Снижение скорости процесса у растений дикого типа составляло около 27 % от начальных значений (табл. 1). В большей степени влияние УФ-А проявлялось на мутанте и снижение скорости фотосинтеза составляло до 67 %.

С целью выяснения активности отдельных звеньев работы фотосинтетического аппарата – реакции карбоксилирования при действии стрессового фактора на растения дикого типа и мутанта, дефицитного по фитохрому В был проведен анализ углекислотных кривых, полученных до и после облучения растений УФ-А (табл. 2).

В условиях не лимитирующих фотосинтез по CO_2 (при повышенной концентрации углекислоты) скорости газообмена у растений дикого типа и мутанта не различались до и после облучения их УФ-А. Для дикого типа наблюдаемая реакция могла быть связана с отсутствием действия стрессового фактора на активность РБФК/О, эффективность карбоксилирования, скорость электронного транспорта и утилизации триозофосфатов. У растений мутанта наблюдалось снижение эффективности карбоксилирования, скорости электронного транспорта и утилизации триозофосфатов, однако изменения скорости фотосинтеза не происходило. Отсутствие эффекта у мутанта могло быть связано с кратковременностью действия повышенной концентрации CO_2 на растения. В этом случае снижение эффективности карбоксилирования, т. е. увеличение сопротивления потоку CO_2 внутрь листа не успевает сказаться на скорости газообмена, поскольку активность фермента остается высокой. В этом случае нехватки углекислого газа на протяжении короткого периода времени, по-видимому, нет. Объяснением этому могут служить данные работы [13], в которой показано, что

тилакоидные мембраны содержат некоторое количество (до 1 мкмоль $\text{HCO}_3^-/\text{мг}$ Хл) связанного бикарбоната, который под действием карбоангидразы может высвобождать свободный CO_2 вблизи центров карбоксилирования РБФК/О. Предположение о возможной концентрирующей роли рКА, сложившееся на основании исследований ее роли у водорослей [14], высказывалось рядом исследователей и в отношении высших растений [15].

Вместе с тем у мутанта *hy2*, по видимому, наблюдаются изменения на уровне первичных процессов фотосинтеза, что сказывается на снижении скорости электронного транспорта. Отсюда снижение скорости фотосинтеза при естественной концентрации углекислоты, в последствии УФ-А облучения, вполне оправдано, поскольку уменьшение скорости переноса электронов, приводит к соответствующему изменению синтеза АТФ и НАДФН, используемых в цикле Кальвина.

Выводы

На основании полученных данных мы предполагаем, что в формировании механизмов повышенной устойчивости фотосинтетического аппарата *Arabidopsis* к УФ-А излучению участвует активная форма фитохрома. Наряду с изменениями на уровне антиоксидантной системы растений, индукции транскрипционной активности генов некоторых факторов транскрипции и антиоксидантных ферментов [7], происходят изменения ряда метаболических реакций, определяющих ответ растений на действие стрессовых факторов.

Таблица 1. Скорость фотосинтеза Арабидопсиса дикого типа и мутанта *hy2*, выращиваемых при облученности 160 мкмоль фотонов $\text{м}^{-2}\text{с}^{-1}$, температуре 20 °С. Растения облучали УФ-А в течение 2 часов. Измерение скорости фотосинтеза проводили при интенсивности света 1000 мкмоль фотонов $\text{м}^{-2}\text{с}^{-1}$ и естественной концентрации углекислоты

Вариант	Дикий тип, скорость фотосинтеза, мкмоль CO_2 $\text{м}^{-2}\text{с}^{-1}$	Дикий тип, скорость фотосинтеза, % к контролю	<i>Hy 2</i> , скорость фотосинтеза мкмоль CO_2 $\text{м}^{-2}\text{с}^{-1}$	<i>Hy 2</i> , скорость фотосинтеза, % к контролю
До облучения	4,8 ± 0,3	100	9,5 ± 0,5	100
Сразу после облучения	4,0 ± 0,2	83,3	7,2 ± 0,4	75,8
1 час после облучения	3,8 ± 0,1	79,2	4,0 ± 0,3	42,1
2 часа после облучения	3,6 ± 0,1	75,0	3,3 ± 0,3	34,7
3 часа после облучения	3,5 ± 0,1	72,9	3,1 ± 0,2	32,6

Таблица. 2. Параметры аппроксимации углекислотных кривых фотосинтеза листьев арабидопсиса дикого типа и мутанта *hy2*, выращиваемых при облученности 160 мкмоль фотонов м²с⁻¹, температуре 20 °С после облучения растений УФ-А в течение 2 часов, рассчитанные с помощью модели Фаркьюхара

Параметры	Вариант облучения UV- А			
	Дикий тип, скорость фотосинтеза, мкмоль СО ₂ м ⁻² с ⁻¹ (до облучения)	Дикий тип, скорость фотосинтеза, мкмоль СО ₂ м ⁻² с ⁻¹ (3 часа после облучения)	<i>Hy 2</i> , скорость фотосинтеза мкмоль СО ₂ м ⁻² с ⁻¹ (до облучения)	<i>Hy 2</i> , скорость фотосинтеза, мкмоль СО ₂ м ⁻² с ⁻¹ (3 часа после облучения)
Максимальная скорость поглощения СО ₂ , мкмоль СО ₂ м ⁻² с ⁻¹	9,8 ± 0,8	9,3 ± 1,4	20,18 ± 1,9	19,828 ± 5,9
Скорость темнового выделения СО ₂ мкмоль СО ₂ м ⁻² с ⁻¹	-0,57 ± 0,12	-0,50 ± 0,14	-1,45 ± 0,32	-1,08 ± 0,36
Максимальная скорость карбоксилирования РБФ, мкмоль м ⁻² с ⁻¹	13,08 ± 1,6	13,88 ± 0,4	19,18 ± 1,2	17,41 ± 1,6
Эффективность карбоксилирования, мкмоль СО ₂ м ⁻² с ⁻¹ Па ⁻¹	0,12 ± 0,03	0,10 ± 0,02	0,20 ± 0,03	0,14 ± 0,02
Скорость электронного транспорта при световом насыщении, мкмоль м ⁻² с ⁻¹	25,28 ± 3,2	21,88 ± 1,2	56,18 ± 3,4	33,38 ± 2,5
Скорость утилизации триозофосфатов, мкмоль м ⁻² с ⁻¹	3,43 ± 0,23	3,17 ± 0,17	3,99 ± 0,19	2,96 ± 0,13

Литература

1. Гродзинский Д.М. Биофизические механизмы фитохромной системы. В кн. Фоторегуляция метаболизма и морфогенеза растений. – М.: Наука, 1975. – С. 66–81.
2. Тохвер А.К. Фитохром, его основные формы и их свойства. В кн. Фоторегуляция метаболизма и морфогенеза растений. – М.: Наука, 1975. – С. 56–65.
3. Синещков А.В. Система фитохромов: фотобиофизика и фотобиохимия *in vivo* // Биологические мембраны. – 1998. – 15. – С. 549–572.
4. Синещков В.А., Синещков А.В. Флуоресценция фмирхрома в клетках этилированных проростков гороха // Биофизика. – 1987. – 32. – С. 110–115.
5. Kreslavski V.D., Ivanov A.A., Kosobryukhov A.A. Low energy light in the 620–660 nm range reduces the UV-B-induced damage to photosystem II in spinach leaves // Biophysics. – 2004 – 49. – P. 767–771.
6. Vladimir D. Kreslavski, Valery Yu. Lyubimov, Galina N. Shirshikova, Alexander N. Shmarev, Anatoly A. Kosobryukhov, Franz-Josef Schmitt, Thomas Friedrich, Suleyman I. Allakhverdiev. Preillumination of lettuce seedlings with red light enhances the resistance of photosynthetic apparatus to UV-A. // Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. – 2013 – 122. – P. 1–6.
7. Vladimir D. Kreslavski, Galina N. Shirshikova, Valery Yu. Lyubimov, Alexander N. Shmarev, Akexander Boutanaev, Anatoly A. Kosobryukhov, Franz-Josef Schmitt, Thomas Friedrich, Suleyman I. Allakhverdiev. Effect of pre-illumination with red light on photosynthetic parameters and oxidant-/ antioxidant balance in *Arabidopsis thaliana* in response to UV-A // J. of Photochem. and Photobiol. B: Biology. – 2013 – 127. – P. 229–236.
8. Сысоева М.И., Марковская Е.Ф., Шерудило Е.Г. Роль фитохрома В в холодовом закаливании и раззакаливании растений огурца на свету и в темноте // Физиология растений. – 2013. – 60, № 3. – С. 393–398.
9. Farquhar G.D., von Caemmerer S., Berry J.A. A biochemical model of photosynthetic CO₂ assimilation in leaves of C₃ plants // Planta. – 1980. – 149, N 1. – P. 78–90.
10. Harley P.C., Sharkey T.D. An improved model of C₃ photosynthesis at high CO₂: Reserved O₂ sensitivity explained by lack of glycerate re-entry into the chloroplast // Photosynthesis Research. – 1991. – 27. – P. 169–178.

11. Harley P.C., Thomas R.B., Reynolds J.F., Strain B.R. Modelling photosynthesis of cotton grown in elevated CO₂ // *Plant Cell and Environment*. – 1992. – 15. – P. 271–282.
12. Von Caemmerer S., Farquhar G.D. Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange rates of leaves // *Planta*. – 1981. – 153. – P. 376–387.
13. Stemler A.B.L., Harlan J.R., J. M. J. de Wet. The Sorghums of Ethiopia // *Economic Botany*. – 1977. – 31. – P. 446–460.
14. Badger M.R., Price G.D. The Role of Carbonic Anhydrase in Photosynthesis // *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* – 1994. – 45. – P. 369–392.
15. Meyer M., Griffiths H. Origins and diversity of eukaryotic CO₂-concentrating mechanisms: lessons for the future // *J. Exp. Bot.* – 2013. – 64, N 3. – P. 769–786.

KOSOBRYUKHOV A.A., KRESLAVSKI V.D., SHIRSHIKOVA G.N.

Institute of Basic Biological Problems, Russian Academy of Sciences,

Russia, 142290, Pushchino, Moscow region, Institutskaya str., 2, e-mail kosobr@rambler.ru

ROLE OF PHYTOCHROM B IN REGULATION OF METABOLIC REACTION OF WILD TYPE AND MUTANT *hy2* ARABIDOPSIS PHOTOSYNTHETIC APPARATUS

Aims. To improve understanding of the roles of phytochrom B in the regulation of metabolic reactions of photosynthetic apparatus of *Arabidopsis thaliana* wild type and mutant *hy2* upon treatment of UV-B radiation. **Methods.** The activity of photosynthesis apparatus was measured by LCPro+ Portable Photosynthetic System. The rate of different stages carboxylation reaction were estimated according Farquhar model. **Results.** *Arabidopsis thaliana* wild type showed higher resistance to UV-A radiation compared with *hy2* mutant. **Conclusions.** The formation of mechanisms of higher resistance to UV-A is due to active participation of PhyB form.

Key words: *Arabidopsis thaliana*, UV-A tolerance, net photosynthetic rate, carboxylation rate, maximum electron transport rate, TPU utilization.

УДК 57.085.23

ЛЁШИНА Л.Г.¹, БУЛКО О.В.¹, РОГАЛЬСКИЙ С.П.¹, ТАРАСЮК О.П.¹, ЕГОРОВ О.А.²

¹ *Институт биоорганической химии и нефтехимии НАН Украины,*

Украина, 02160, г. Киев, Харьковское ш., 50, e-mail: llioshina@ukr.net

² *Химическая компания «СПОЛУКА»,*

Украина, 02660, г. Киев, ул. Мурманская, 5, e-mail: oleg.iegorov@gmail.com

ВЛИЯНИЕ КЛАТРАТНЫХ КОМПЛЕКСОВ β-ЦИКЛОДЕКСТРИНА С РЕГУЛЯТОРАМИ РОСТА НА МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ БАРВИНКА МАЛОГО *VINCA MINOR L.*

Циклодекстрины (ЦД) – это циклические олигосахариды, внутренняя гидрофобная полость которых способна образовывать комплексы включения (клатраты) с другими молекулами органической и неорганической природы, изменяя свойства последних. Так, нерастворимые в воде вещества приобретают большую растворимость, становятся стабильными в процессах окисления и гидролиза, меняют вкус, цвет и запах, уменьшают токсичность, приобретают свойство пролонгированного выделения в среду [1].

Также опубликовано ряд работ по влиянию клатратных комплексов циклодекстринов с регуляторами роста (РР) на рост и развитие растений и культур клеток.

Соединение α-циклодекстрина с производными циклопропена (ингибитора дозревания и старения плодов) показало снижение уровня этилена в плодах яблони и повышение ее урожайности [2]. Создание комплекса β-циклодекстрина с 6-бензиламинопурином (БАП) позволило в 4 раза повысить растворимость РР [3]. Добавление в среду α и β-циклодекстринов с 3 мг/л нафтилукусной кислоты в три раза ускорило укоренение и в два раза увеличивало количество дифференцированных корней у артишока [4]. Совместное использование ЦД и метилжасмоната, при коротком воздействии УФ, повлияло на внеклеточное накопление аймалицина в суспензионной культуре барвинка розового *C. roseus*. Установлено, что ЦД не

только индуцировал биосинтез аймалицина, но и способствовал формированию аддукта, что удаляет аймалицин из среды, уменьшает ретроингибирование и деградацию аймалицина и позволяет накапливать его в культуральной среде [5]. Добавление химически модифицированных гептакис(2,6-ди-О-метил)- β -циклодекстрина и 2-гидроксипропил- β -циклодекстрина в культуральную среду супензионной культуры *Artemisia annua* в 300 раз увеличило выход артемизина [6]. Создан водорастворимый комплекс 24-эпибрассинолида с циклодекстрином, что позволяет повысить его биодоступность при создании пестицидных препаратов [7].

Целью нашей работы было исследование влияния комплексов циклодекстринов с традиционными регуляторами роста на морфофизиологические и биохимические характеристики барвинка малого в культуре *in vitro*.

Материалы и методы

Материалом для исследования служили полученные нами ранее *in vitro* растения и каллусная культура барвинка малого [8]. Для получения комплексов включения регуляторов роста с β -циклодекстрином их эквимоллярные смеси перемешивали в 50 %-м водном этаноле в течение 12 часов, после чего растворитель упаривали, а сухой остаток сушили при 130°C в течение 24 часов. Растения и каллус культивировали на среде МС [9] с добавлением комплексов ЦД с бензиламинопурином (6-БАП); 2,4-дихлорфеноксисукусной кислотой (2,4-Д); гиббереллиновой кислотой (ГК₃) в концентрации 1 мг/л. Для сравнения использовали растения, выращенные на средах с добавлением регуляторов роста (без циклодекстрина) в такой же концентрации и растения, полученные на безгормональной среде. Условия инкубации для растений *in vitro*: световой блок, температура 24 ± 2 °С, 16-часовой фотопериод, интенсивность освещения 1600-2000 люкс; для каллуса – темное термостатирование при температуре 26 ± 1 °С.

Вторичные метаболиты определяли в кислотных экстрактах методом ВЭЖХ на хроматографе фирмы «Agilent» (США) с последующей компьютерной обработкой результатов исследования. Разделяющая колонка Rapid Resolution HT Cartige 4.6x30mm, 1.8-Micron, Zorbx SB-C18, подвижная фаза - ацетонитрил: метанол: вода (4:4:5), скорость движения – 3 мл/мин. Детектирование проводилось при длине волны 215 нм.

Хроматограмму оценивали по времени удержания и площади пика в автоматическом режиме. В качестве эталона использовали фармацевтический винкамин.

Результаты обработаны статистически по Лакину [10], компьютерная обработка данных проведена с помощью программы Excel, стандартного пакета программ Microsoft Office XP (Microsoft, США). В таблицах и на рисунках представлены среднеарифметические значения показателей и их стандартные ошибки.

Результаты и обсуждения

Для изучения действия комплексов мы испытывали их в концентрации, рекомендованной для изучения фитогормональной активности (1мг/л). Для сравнения использовали растения *in vitro* барвинка малого и его культуру клеток, выращенные на средах, содержащих гормоны в такой же концентрации.

Выращивание растений на средах МС и на МС + ЦД показало различие их морфологических показателей. Длина корней под влиянием ЦД несколько увеличивалась, тогда как их количество становилось меньше. При этом длина стебля была больше, чем в контроле. Для опыта были выбраны варианты сред, содержащих следующие комплексы: ЦД + 2,4-Д (1 мг/л); ЦД + БАП (1 мг/л); ЦД + ГК₃ (1 мг/л). В качестве контроля использованы среды с теми же гормонами, но без ЦД. Через 3 месяца были получены следующие результаты (табл.):

– у растений на среде, содержащей комплекс ЦД + 2,4-Д (1 мг/л), в отличие от растений, выращенных на среде с 2,4-Д (1мг/л), наблюдалось появление воздушных корней, средняя длина основных корней была 1,1 см. Причем на гормоне корни оставались в зачаточном состоянии.

– растения, полученные на комплексе ЦД + БАП (1 мг/л), показали усиленное ветвление (1:4) и образование утолщенного корня (средняя длина – 2,3 см). В контроле один побег делился на два, либо оставался один.

– в опыте с третьим комплексом ЦД + ГК₃ (1 мг/л) растения вытягивались за счет растяжения междоузлий (2,5 см в отличие от контрольных 2,1 см). Высота и длина корней опытного растения была в два раза больше контрольного и количество корней превышало все остальные варианты.

Влияние чистого ЦД на растение невелико и противоречиво.

Таблица. Морфологические показатели растений *V. minor*, выращенных на средах с регуляторами роста и их комплексами с циклодекстрином

Рост-регулятор / <i>V. minor</i>	Сухая масса, мг	Корень		Стебель		
		длина, см	количество, ед.	длина, см	ветвление, ед.	междоузлия, см
К	5,6±1,0	1,5±0,3	2,7±0,5	5,6±0,2	0,2±0,01	2,0±0,1
ЦД+К	7,0±0,8	1,8±0,6	2,0±0,1	4,6±0,1	-	1,8±0,1
2,4-Д	10,5±0,9	0,3±0,1	2,7±0,2	9,7±0,3	-	2,0±0,3
ЦД+2,4-Д	9,4±0,5	1,1±0,3	2,2±0,3	7,3±0,4	0,6±0,09	2,0±0,2
БАП	12,6±0,7	0,8±0,1	1,3±0,2	4,0±0,4	2,3±0,05	1,7±0,3
ЦД+БАП	19,6±1,0	2,3±0,5	0,7±0,1	5,6±0,5	3,4±0,02	2,0±0,4
ГК ₃	10,8±0,8	1,4±0,2	4,0±0,3	5,0±0,4	1,0±0,01	2,1±0,1
ЦД+ГК ₃	20,1±0,6	2,8±0,1	3,5±0,2	11,0±0,3	-	2,5±0,2

Наблюдается небольшое увеличение массы и увеличение длины корня, но длина стебля уменьшается по сравнению с контролем. Количество корней уменьшается и укорачивается междоузлие. Практически такая же картина в случае добавления 2,4-Д. В чистом виде этот гормон укорачивает корень и удлиняет стебель, но не влияет на количество образовавшихся корней (2,7 см, как у контроля) и ингибирует их рост в длину. Масса растений, выращенных на среде с комплексом ЦД-2,4Д практически равна массе растения на 2,4 Д, наблюдается удлинение корня (1,1 см по сравнению с 0,3) и стебля, который больше, чем у растений на безгормональной среде. БАП вызывает укорочение корней (0,8 см в сравнении с К), ЦД-БАП стимулирует удлинение корней. БАП в чистом виде вызывает усиленное ветвление. Комплекс ЦД-БАП еще больше увеличивают этот показатель (3,4 см по сравнению с 2,3). ГК₃ в чистом виде умножает корни. Соединение же этого гормона с ЦД стимулирует удлинение корней и увеличение стебля в длину. Наибольшая масса у растений на среде с добавлением комплекса ЦД-ГК₃.

Комплексы гормонов, добавленные в среду для культивирования каллуса, не оказали заметного влияния на культуру *V. minor*. Однако в следующем пассаже, при переносе клеточных линий на среду для субкультивирования без добавления комплексов, наблюдалось увеличение массы каллусных клеток барвинка в 1,64 раза.

Показательно то, что во всех случаях введение в циклодекстрины регуляторов роста изменило свойства последних, усилив их действие на морфологические показатели растений. Нагляднее всего это проявилось при соединении ЦД с ГК₃.

Далее нами был проведен ВЭЖХ-анализ растений на содержание в них основного

алкалоида барвинка – винкамина. Результаты показали, что добавление в среду культивирования исследуемых гормонов в концентрации 1 мг/мл уменьшает биосинтез вторичных метаболитов в растениях по сравнению с контролем (растениями, выращенными на среде без гормонов) (рис.).

Содержание в среде свободного циклодекстрина привело к снижению синтезируемого вещества на 7%. Вопреки ожиданиям, добавление в среду комплексов РРР с ЦД показало результаты, обратные морфологическим показателям. Так, если в случае комплекса ЦД с 2,4-Д масса растений, выращенных на комплексах, была несколько ниже полученных на чистом 2,4 Д, то количество винкамина в этих растениях было наибольшим – на 47% выше, чем у растений на 2,4-Д. Комплекс ЦД с БАП увеличил содержание винкамина на 29% по отношению к чистому БАП. В растениях, выращенных на среде с добавлением комплекса ЦД-ГК₃, показавших самые результативные морфологические изменения, вопреки ожиданиям, количество винкамина практически не изменилось.

Выводы

Полученные результаты свидетельствуют о том, что циклодекстрины существенно изменяют свойства соединенных с ними гормонов, вызывая и морфологические, и биохимические изменения у растений в результате введения в гидрофобную полость циклодекстрина регулятора роста, при этом уменьшается токсичность последнего, а выход неизменного активного вещества в среду происходит по мере использования его растением, что пролонгирует рострегулирующее действие гормона и улучшает рост и развитие растительного организма.

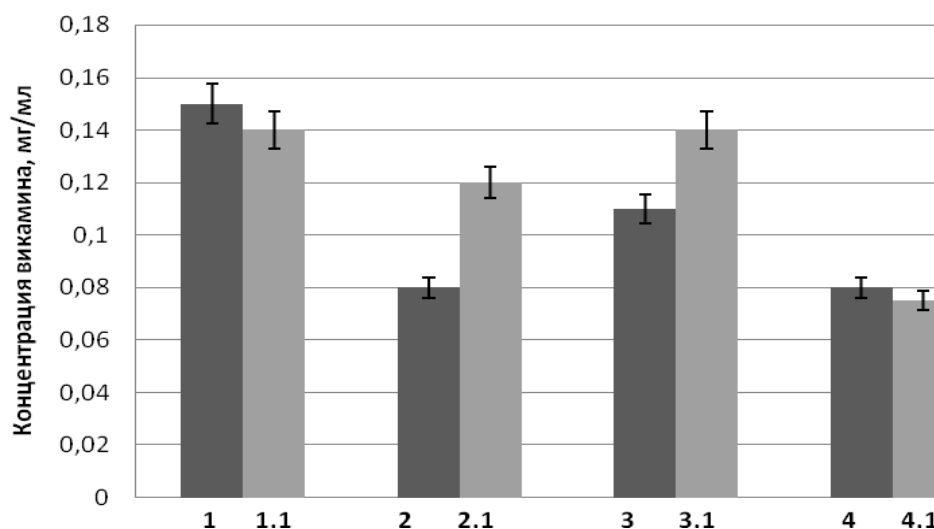


Рис. Концентрация винкамина в растениях *V. minor* L., культивируемых на средах: 1 – МС; 1.1 – МС+ЦД; 2 – МС+2,4-Д; 2.1 – МС+2,4-Д+ЦД; 3 – МС+БАП; 3.1 – МС+БАП+ ЦД; 4 – МС+ГК₃; 4.1 – МС+ ГК₃+ЦД

Литература

- Davis M.E., Brewster M.E. Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and future // Nat. Rev. Drug. Discov. – 2004. – 3, N 12. – P. 1023–1035.
- Голубев А.В. Регулятор роста растений и плодов. Патент РФ № 2491815 от 10.09.2013. Бюл. № 25.
- Xia Ge, Jiang He, Ying Yang, Fengming Qi, Zheng Huang, Ruihua Lu, Lizhen Huang, Xiaojun Yao Study on inclusion complexation between plant growth regulator 6-benzylaminopurine and β -cyclodextrin: Preparation, characterization and molecular modeling // Journal of Molecular Structure. – 2011. – 994, N 1–3. – P. 163–169.
- Brutti C., Apystolo N.M., Ferrarotti S.A., Llorente B.E., Krymkiewicz N. Micropropagation of *Cynara scolymus* L. employing cyclodextrins to promote rhizogenesis // Scientia Horticulturae. – 2000. – 83, N1. – P. 1–10.
- Almagro L., Lopez Perez A.J., Pedreno M.A. New method to enhance ajmalicine production in *Catharanthus roseus* cell cultures based on the use of cyclodextrins // Biotechnology Letters. – 2010. – 33, N 2. – P. 381–385.
- Durante M., Caretto S., Quarta A., De Paolis A., Nisi R., Mita G. β -Cyclodextrins enhance artemisinin production in *Artemisia annua* suspension cell cultures // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2011. – 90, N 6. – P. 1905–1913.
- Рукач Н.Н., Киселев П.А., Жабинский В.Н., Хрипач В.А. Получение и характеристика комплексов включения 24-эпибрассинолида (стимулятора роста растений) с циклодекстринами // Сборник материалов VII Международной конференции Radostim 2011 «Фитогормоны, гуминовые вещества и другие биорациональные пестициды в сельском хозяйстве», 2–4 ноября 2011 г. – Минск: [б. и.], 2011. – С. 148–149.
- Льошина Л.Г., Булко О.В., Галкин А.П. Отримання і характеристика калусної і суспензійної культури барвінка малого *Vinca minor* L. // Збірник наукових праць «Фактори експериментальної еволюції організмів». – К.: Логос, 2009. – 7. – С. 161–166.
- Murashige I., Scoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plantarum. – 1962. – 15, N 3. – P. 473–497.
- Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Высшая школа, 1990. – 352 с.

LIOSHINA L.G.¹, BULKO O.V.¹, ROGALSKYY S.P.¹, TARASYUK O.P.¹, IEGOROV O.A.²

¹*Institute of Bioorganic Chemistry and Petrochemistry NAS of Ukraine, Ukraine, 02160, Kyiv, Kharkivske hwy, 50, e-mail: llioshina@mail.ru*

²*Chemical company “Spoluka”,*

Ukraine, Kiev, Murmanskaja str., 5, e-mail: oleg.iegorov@gmail.com

THE INFLUENCE OF CLATHRATE COMPLEX OF β -CYCLODEXTRIN WITH ROWTH REGULATORS ON MORPHOLOGICAL AND BIOCHEMICAL PARAMETERS OF PERIWINKLE *VINCA MINOR* L.

Aims. Study of the influence of clathrate complex of β -cyclodextrin with traditional growth regulators on morphological and biochemical parameters of periwinkle in the culture *in vitro* **Methods.** Insertion of growth

regulators into β -cyclodextrin. *In vitro* cultivation. HPLC-analysis of secondary metabolites. **Results.** Periwinkle was cultivated in MC medium with addition of the complexes of plant growth regulators (2.4-D; BA; GA) with β -cyclodextrin. For comparison the plants were grown in the medium without β -cyclodextrin. It has been established that the insertion of β -cyclodextrin complexes with growth regulators stimulated plant growth by increasing the mass, lengthening of the stem and roots, increase of branching and rooting, as well as caused intensification of the biosynthesis of vincamine indole alkaloid. Moreover, the obtained complexes showed prolonged action on the culture of periwinkle callus cells. **Conclusions.** The complexes of growth regulators with β -cyclodextrin considerably change the properties of hormones, causing both morphological and biochemical changes of plants.

Key words: *Vinca minor* L., cyclodextrin complexes, plant growth regulator.

УДК 577.1+576.5:591. 111.1

ЛИХАЧЕВА Л.И., ШПИЛЕВАЯ С.П., РУБАН Т.А., ГУЛЬКО Т.П., КОРДИУМ В.А.

*Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины,
Украина, 03143, г. Киев, ул. Акад. Заболотного, 150, e-mail: kordium@imbg.org.ua*

КЛЕТочНАЯ ЭКСТРУЗИЯ ДНК ЛЕЙКОЦИТАМИ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Представления о наследственном материале клетки – ДНК непрерывно меняются. Вначале считалось, что геном почти полностью стабильный материал, который менять могут только мутации, и в норме его пребывание только внутриядерное. Позже, на основании многочисленных данных сформировалось представление о горизонтальном переносе генетической информации и была выдвинута концепция «нестабильности генома» [1]. Сегодня геном рассматривают уже как особую структуру, которой свойственна одновременно высочайшая консервативность, обеспечивающая наследственность, и столь же высокая подвижность. В литературе описаны различные варианты перемещения ядерного материала как внутри клетки, так и его за ее пределы. К наиболее часто наблюдаемым относится, например, формирование микроядер – одного или многих – что может происходить как в результате отщепления их ядром, так и вследствие нарушения митотического деления, когда вокруг не включенных во вновь сформированные ядра отдельных хромосом обособляется цитоплазма и формируется оболочка. Микроядра клеток при этом могут либо оставаться внутри клетки, либо покидать ее пределы. Все эти варианты поведения ядер наблюдались нами в культуре *in vitro* [2]. Проводимые нами в настоящее время исследования, связанные с использованием клеток белой крови в качестве одного из компонентов взаимодействующей системы для изучения переноса генетической информации, позволили наблюдать новые картины поведения

хроматина, характерные для их ядер.

В 2004 году было обнаружено, что нейтрофилы (гранулярные лейкоциты) могут формировать особые внеклеточные тяжи, состоящие из ДНК и белков, так называемые NETs (Neutrophil Extracellular Traps), с помощью которых эти гранулоциты захватывают и поражают различные бактерии [3]. Основными структурными компонентами NETs являются ДНК, гистоны (H1, H2A, H2B, H3 и H4) и гранулярные белки. Дальнейшие исследования показали, что такой способностью к катапультированию ДНК обладают также эозинофилы [4]. За годы, прошедшие с момента открытия феномена NETs, появилось много работ, подтверждающих и дополняющих первые результаты. Оказалось, что способностью к выбросу ДНК за пределы клетки обладают лейкоциты разных организмов [5, 6], а также, что не только бактерии, но и многие другие патогенные организмы стимулируют образование таких ДНК-овых ловушек и погибают от их действия [7]. Другие исследования показали, что гранулярные лейкоциты, в ответ на инфекцию, могут выбрасывать как ядерную, так и митохондриальную ДНК [8]. При этом выброс ядерной ДНК приводит к гибели клетки, в то время как при катапультировании митохондриальной ДНК клетки остаются живыми. Кроме того, образование NETs может быть спонтанным, без стимуляции, и происходить при стрессах, аутоиммунных и других патологиях [9–12].

Все это указывает на общебиологическое

значение выброса ДНК за пределы клетки и привело к появлению нового понятия «NETosis», отнесенного к еще одному выявленному типу программируемой клеточной смерти [7]. Но, так же, как и для других танатогенных систем, не понятна роль ДНК, высвобождаемой лейкоцитами в очень широких масштабах. Интересным фактом, который может пролить свет на роль вышедшей из клетки ДНК в составе NETs, являются сообщения о том, что гистонные белки могут служить эффективными векторами для переноса генов в клетки [13–15] и высказывается мнение, что гистонофекция может быть перспективным методом для невирусного переноса рекомбинантных нуклеиновых кислот при генной терапии [16].

В связи с общебиологическим значением, большим интересом и существованием многих непонятных деталей и механизмов горизонтального переноса генетической информации мы поставили ряд задач, решение которых позволило бы нам ближе подойти к пониманию рассматриваемой проблемы. Ранее нами была показана возможность переноса генетической информации по появлению свечения в эмбриональных мышечных фибробластах после их контакта с клетками периферической крови мышей, несущих ген *gfp* и синтезирующих белок GFP [17]. Одним из механизмов передачи генетического материала в описанной нами системе может быть выброс ДНК из клеток крови и поглощение ее фибробластами, который наблюдался нами при работе с клетками белой крови как животных, так и человека.

Материалы и методы

Клетки крови выделяли из цельной крови, содержащей в качестве антикоагулянта ЭДТА, путем центрифугирования крови в капиллярах. Полученный слой лейкоцитов, содержащий нейтрофилы, лимфоциты, моноциты, а также примесь эритроцитов, отбирали, промывали в среде RPMI, ресуспендировали в этой же среде, подсчитывали количество клеток, и наносили их на предметное стекло с последующей фиксацией в парах формалина, а также параллельно добавляли соответствующий объем клеток крови к клеткам культуры тканей, которые представляли собой свежесыведенные эмбриональные фибробласты мыши, пропассированные на соответствующей среде (ДМЭМ с 10 % ЭТС, по 100 ЕД /мл

пенициллина и стрептомицина,) при 37 °С, 80 % влажности и 5 % CO₂. После экспозиции (1,5–2 часа) избыток клеток крови смывали, препараты промывали питательной средой и фиксировали в парах формалина. Полученные фиксированные препараты окрашивали флуоресцентным реагент–интеркалятором Hoechst 33342. или Syber–Green. Микроскопирование окрашенных препаратов проводили на микроскопе МЛ–2 (ЛОМО, Россия) с использованием фильтров HQ 470|50 (exiter) и HQ 525|50(emitter) (Croma Technology Corp., США). Конфокальную сканирующую микроскопию осуществляли на системе CarlZeiss Laser Scanning System LSM 510 (CarlZeiss, Германия) (AXIOSKOP–2ZEISS). Для предупреждения выгорания люминесценции препарата в течение сеанса конфокальной микроскопии использовали раствор фенилендиамина в качестве антипригарного препарата (anti-bleach agents) [18].

Результаты и обсуждение

При работе с клетками белой крови, как животных (мышей), так и человека, нами наблюдался выброс ДНК за пределы этих клеток. На рис. 1 представлены лейкоциты, выделенные из крови мышей, которые выплескивают ДНК в окружающее пространство, и, как видно, в этот процесс могут вовлекаться несколько клеток белой крови.

Такие же эффекты наблюдались и в суспензии лейкоцитов человека (рис. 2).

Выбросы ДНК из клеток белой крови наблюдались как в их монокультуре, так и при добавлении лейкоцитов к клеткам культур тканей. Так, на рис. 3 представлен выброс ДНК из клеток белой крови мышей при их нанесении на мышечные эмбриональные фибробласты. Видно, что тяжи ДНК, вышедшие из клетки крови (1) направлены к ядрам клеток фибробластов (2) и контактируют с ними.

Одним из объяснений наблюдаемого нами явления – выплескивания ДНК из одних клеток и ее контакт с другими клетками может быть предположение о том, что высвобождаемый клеточный материал в виде полноценной ДНК, может поглощаться другими клетками и является одним из механизмов переноса генетической информации в горизонтальном направлении. Данные исследования очень интересные и перспективные.

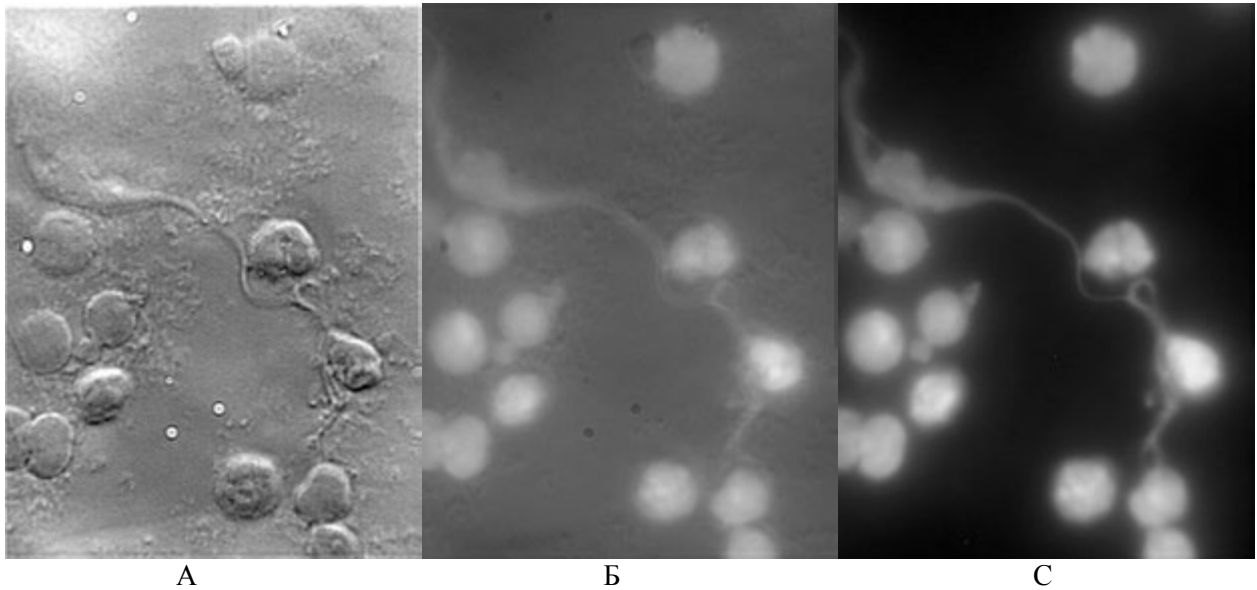


Рис. 1. Вытекание ДНК из клеток крови мыши (окраска Хекстом 33342: А – микроскопия в проходящем свете; Б – совмещенное освещение; С – люминесцентная микроскопия)

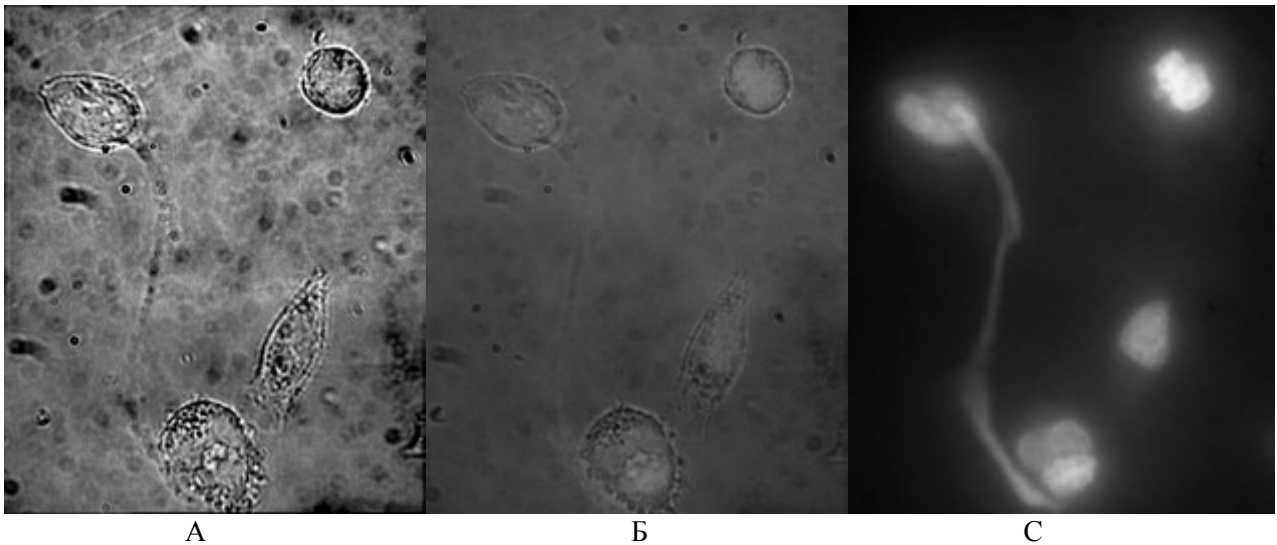


Рис. 2. Вытекание ДНК из клеток крови человека (окраска Хекстом 33342: А – микроскопия в проходящем свете; Б – совмещенное освещение; С – люминесцентная микроскопия)

Выводы

Было показано, что клетки периферической крови млекопитающих могут выбрасывать нити хроматина из ядер как в монокультуре, так и в присутствии клеток

культур тканей. Сделано предположение, что описанное явление может служить одним из механизмов передачи генетической информации между клетками млекопитающих.

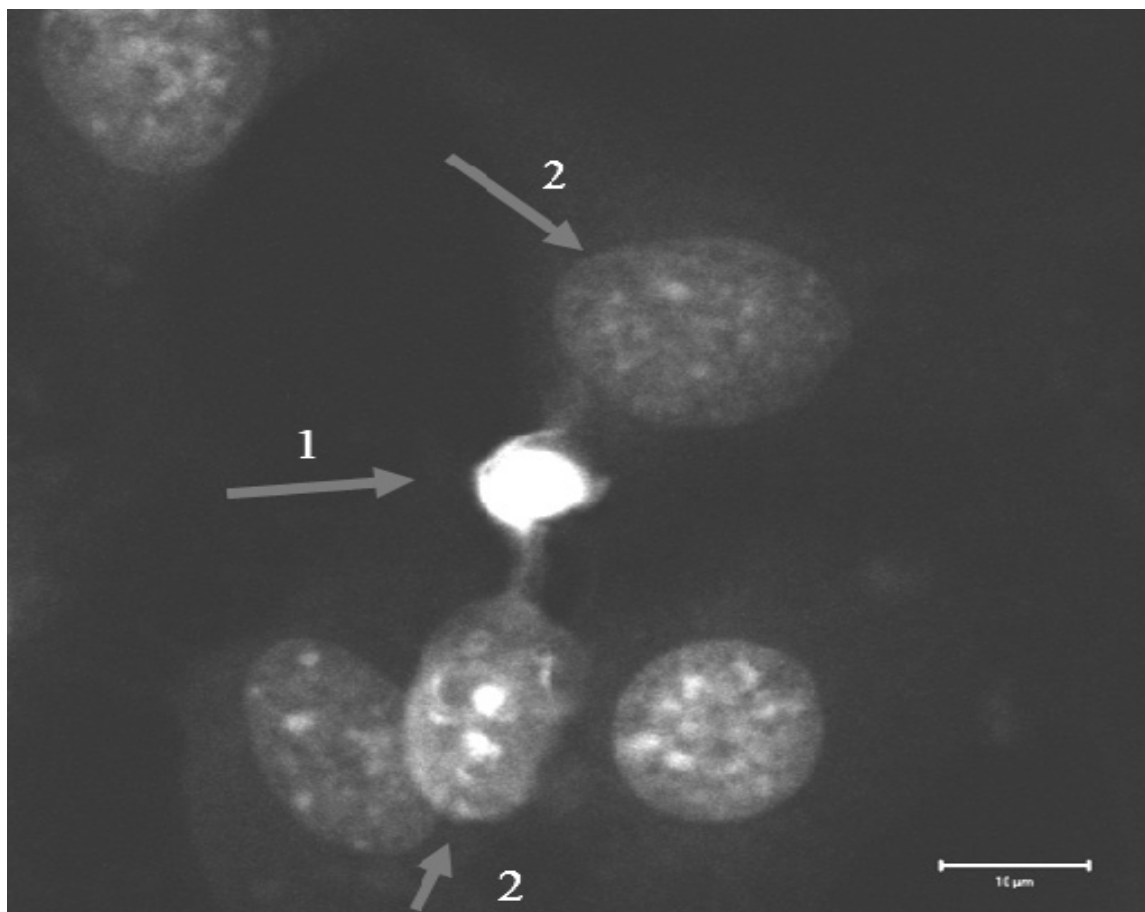


Рис. 3. Вытекание ДНК из лейкоцита мыши (1) в присутствии мышинных фибробластов (2). Конфокальная микроскопия, окраска Syber-Green

Литература

1. Golubovsky M.D. Gene Instability and Mobile Elements: A history of its Research and Discovery // *Studies in the history of Biology*. – 2011. – 3, N 4. – P. 60–78.
2. Кордюм В.А., Шпилевая С.П., Рубан Т.А., Сухорада Е.М. Концепция обмена генетическим материалом между клетками млекопитающих // *Биополимеры и клетка*. – 2005. – 21, № 4. – С. 335–345.
3. Brinkmann V., Reichard U., Goosmann C., Fauler B., Uhlermann Y., Weiss D.S. et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria // *Science*. – 2004. – 303. – P. 1532–1535
4. Yousefi S., Goid J.A., Andina N., Lee J.J., Kelly A.M. et al. Catapult-like release of mitochondrial DNA by eosinophils contributes to antibacterial defense // *Nature Medicine*. – 2008. – 14. – P. 949–953.
5. Palic' D., Ostojic' J., Andreasen CB, Roth JA Fish cast NETs: neutrophil extracellular traps are released from neutrophils // *Dev Comp Immunol*. – 2007. – 31, N 8. – P. 805–816
6. Wardini A.B., Guimara'es-Costa A.B., Nascimento MTC., Nadaes N.R. et al. Characterization of neutrophil extracellular traps in cats naturally infected with feline leukemia virus // *J. of General Virology*. – 2011. – 91. – P. 259–264.
7. Remijsen Q., Kuijpers T.W., Wirawan E., Lippens S. et al. Dying for a cause: NETosis mechanisms behind an antimicrobial cell death modality // *Cell Death Differ*. – 2011. – 18, N 4. – P. 581–588.
8. Yousefi S., Mihalache C., Kozlowski E., Schmid I., Simon HU. Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps // *Cell Death Differ*. – 2009. – 16. – P. 1438–1444.
9. Dworski R., Simon H-U., Hoskins A., Yousefi S. Eosinophil and neutrophil extracellular DNA traps in human allergic asthmatic airways // *J Allergy Clin Immunol*. – 2011. – 127, N 5. – P. 1260–1266.
10. Thomas G.M., Carbo C., Curtis B.R., Martinod K., Mazo I.B. et al. Extracellular DNA traps are associated with the pathogenesis of TRALI in humans and mice // *Blood*. – 2012. – 119, N 26. – P. 6335–6343.
11. Simon D., Hoesli S., Roth N., Staedler S., Yousefi S., Simon H-U. Eosinophil extracellular DNA traps in skin diseases // *J Allergy Clin Immunol*. – 2011. – 127, N 1. – P. 194–199.
12. Demers M., Krause D.S., Schatzberg D., Martinod K. et al. Cancer predispose neutrophils to release extracellular DNA traps that contribute to cancer-associated thrombosis // *PNAS*. – 2012. – 109, N32. – P. 13076–13081.

13. Соловьева С.С., Кудряшова Н.В., Ризванов А.А. Перенос рекомбинантных нуклеиновых кислот в клетки (трансфекция) с помощью гистонов и других ядерных белков // КТТИ. – 2011. – YI, № 3. – С. 29–40.
14. D.Balicki, E.Beutler. Histone H2A significantly enhances in vitro DNA transfection // Mol Med. –1997. – 3, N 11. – P. 782–787.
15. Y.Lucius, A. Haberland, S.Zaitsev, R.Dalluge, M.Schneider, M.Bottger. Structure of transfection–active Histone H1/ DNA complexes // Molecular Biology Reports. – 2002. – 28. – P. 157–165.
16. Каоуасс М., Beaulieu R., Balicki D. Histonefection: Novel and potent non-viral gene delivery // J. Control Release. – 2006. – 113, N 3. – P. 245–254.
17. Лихачева Л.И., Шпилева С.П., Рубан Т.А., Гулько Т.П., Кордюм В.А. К вопросу идентификации и изучения переноса генетической информации между клетками млекопитающих // Фактори експериментальної еволюції організмів. – Київ, 2013. – 12. – С. 137–140.
18. Johnson G.D., Davidson R.S., McNamee K.C., Russell G., Holborow E.J.. Fading of immunofluorescence during microscopy: a study of the phenomena and its remedy // J. Immun. Meth. – 1982 – 55 – P. 231–242.

ЛИХАЧОВА Л.І., ШПЫЛОВА С.П., ГУЛКО Т.П., РУБАН Т.А., КОРДИУМ В.А.

Institute of Molecular Biology and Genetics National Academy of Sciences of Ukraine, Ukraine, 03143, Kiev, Zabolotnogo str., 150, e-mail:kordium@imbg.org.ua

CELLULAR EXTRUSION OF DNA BY MAMMALIAN LEUKOCYTES

Aims. The study of cellular extrusion of DNA of mammalian leukocytes. **Methods.** Leukocytes were isolated from human blood and mice in the capillaries by centrifugation. Human leukocytes and part white blood cells of mice placed onto a slide and fixed. Another portion was applied to mice leukocytes embryonic fibroblasts, after 1.5–2 hour exposure preparations were fixed. The resulting specimens were stained with fluorescent dyes Hoechst 33342 DNA. or Syber-Green and analyzed by standard fluorescence microscopy.

Results. Microscopy results showed that the emissions of DNA from leucocytes into the extracellular space as observed in their monoculture or in the presence of fibroblasts, while the extracellular DNA the nuclei of leukocytes is contacted with the fibroblasts. **Conclusion.** These results demonstrate that mammalian leukocytes may release DNA into the extracellular space as in monoculture and in co-culture with tissue culture cells. It is suggested that the phenomenon described here can serve as described here can serve as.

Key words: cellular extrusion of DNA, extracellular space.

УДК 577.21:577.164.1

ЛУЖЕЦЬКИЙ Т.Б., СЕМКІВ М.В., КШАНОВСЬКА Б.В., ДМИТРУК К.В., СИБІРНИЙ А.А.

Інститут біології клітини НАН України,

Україна, 79005, м. Львів, вул. Драгоманова, 14/16, e-mail: dmytruk@cellbiol.lviv.ua

ПІДВИЩЕННЯ ТЕРМОТОЛЕРАНТНОСТІ ПРОМИСЛОВИХ СПИРТОВИХ ДРІЖДЖІВ ШЛЯХОМ ДЕРЕПРЕСІЇ ГЕНІВ СИНТЕЗУ ТРЕГАЛОЗИ

Етанол на сьогодні є найбільш поширеним рідким паливом, що отримується з поновлювальної сировини – біомаси. Упродовж останніх років об'єм промислового виробництва етанолу зростає за рахунок використання спирту у транспортному секторі. Етанол використовується в автомобільних двигунах як додаток до бензино-етанольних сумішей або у чистому вигляді в спеціалізованих двигунах.

Основним способом отримання етанолу є алкогольна ферментація цукристих субстратів за допомогою спиртових дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*. Перетворення гексоз до етанолу шляхом гліколізу – екзотермічний процес, пов'язаний з вивільненням енергії, що частково

вивільняється у вигляді теплоти. Тому бродильні апарати потребують охолодження до оптимальних температурних умов (34–35 °С) при алкогольної ферментації за участі сахароміцетів. Охолодження промислових ємностей вимагає суттєвих енергетичних затрат. Селекція або конструювання штамів дріжджів *S. cerevisiae* здатних до ефективної алкогольної ферментації при температурах, що перевищують 35 °С, здешевило би отримання спирту за рахунок зниження затрат на охолодження бродильних чанів, а також знизило б різницю температур для подальшої перегонки браги до етанолу. При підвищеній температурі продуктивність алкогольної ферментації зростає. Отже,

конструювання термотолерантних штамів *S. cerevisiae*, що є на сьогодні основними промисловими продуцентами етанолу, є актуальним завданням.

За умов теплового шоку у дріжджів відбувається накопичення дисахариду трегалози, який є стресовим протектором [1]. Синтез трегалози здійснюється ферментним комплексом, що складається з трегалозо-6-фосфатсинтази, що кодується геном *TPS1*, та трегалозо-6-фосфатфосфатази, що кодується геном *TPS2*. Трегалозо-6-фосфатсинтаза каталізує перетворення глюкозо-6-фосфату у комплексі з УДФ-глюкозою до трегалозо-6-фосфату. У свою чергу, трегалозо-6-фосфат перетворюється у трегалозу за участю фермента трегалозо-6-фосфатфосфатази. Посилення експресії одного з цих генів *TPS1* сприяло збільшенню внутрішньоклітинної концентрації трегалози та підвищенню термотолерантності дріжджів *S. cerevisiae* [2]. У даній роботі описано конструювання та біохімічна характеристика рекомбінантних штамів *S. cerevisiae* з посиленою експресією генів *TPS1* та *TPS2*.

Матеріали і методи

У роботі використовували штами дріжджів *S. cerevisiae* раса 13 із колекції мікроорганізмів Інституту біології клітини НАН України та промисловий штам *S. cerevisiae* раса У-563 отриманий з Довжоцького спиртового заводу (село Довжок Кам'янець-Подільського району Хмельницької області). Дріжджі вирощували на багатому середовищі YPD (1 % дріжджовий екстракт, 1 % пептон, 2 % глюкоза). Для селекції дріжджових трансформантів YPD середовище містило 200 мг/л генетицину.

Бактерійний штам *E. coli* DH5 α (Ц80dlacZDM15, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17*(r_k⁻, m_k⁺), *supE44*, *relA1*, *deoR*, Д(*lacZYA-argF*)U169) вирощували при 37°C на багатому середовищі LB (0,5 % дріжджовий екстракт, 1 % пептон, 1 % NaCl). Для селекції плазмідовмісних бактерій використовували ампіцилін у концентрації 100 мг/л.

У роботі були використані стандартні молекулярно-генетичні методи [3]. Трансформація дріжджів *S. cerevisiae* проводилася методом електропорації [4]. Активність трегалозо-6-фосфатсинтази, внутрішньоклітинну концентрацію трегалози та термотолерантність визначали як описано в роботах [5, 6]. Для визначення рівня алкогольної ферментації глюкози клітини дріжджів нарощували в багатому середовищі YPD

протягом доби. Біомасу (1,2 мг/мл клітин) переносили в мінеральне середовище YNB з додаванням 10 % глюкози. Ферментація проводилася при температурі 42 °C за умов обмеженої аерації (120 обертів/хв.). Концентрація етанолу в середовищі визначалася за допомогою стандартного набору «Алкотест» [7].

Результати та обговорення

Конструювання вектора для посилення експресії генів *TPS1* та *TPS2* в клітинах *S. cerevisiae* здійснювалося у декілька етапів. Базова плазмідна рUC57-delta1_2 містила д-послідовності, що забезпечує мультикопійну інтеграцію модулів експресії в геномі *S. cerevisiae*. д-послідовності *S. cerevisiae* YJRWdelta12 були ампліфіковані за допомогою ПЛР із використанням праймерів SM16(CCG GAA TTC GAC GGG CAG TCT GTT GGA ATA GAA ATC AAC TAT C)/SM17(CAT CAT TTT ATA TGT TTA TAT TCA TCT AGA CCC GGG GTC GAC TTG ATC CTA TTA CAT TAT CAA TCC) та SM18(GGA TTG ATA ATG TAA TAG GAT CAA GTC GAC CCC GGG TCT AGA TGA ATA TAA ACA TAT AAA ATG ATG)/SM19(CCC AAG CTT GAC GGG CAG TCT GAG AAA TAT GTG AAT GTT GAG), поєднані між собою за допомогою ПЛР, що перекривається, використовуючи праймери SM16/SM19. Ампліфікований фрагмент ДНК було оброблено рестриктазами EcoRI і HindIII та клоновано у відповідні сайти у вектор рUC57. Промотор гена *ADHI* (кодує алкогольдегідрогеназу) та термінатор *CYC1* (цитохром C) ампліфікували з геномної ДНК штаму *S. cerevisiae* BY4742 за допомогою праймерів Ko419(CGC GTC GAC TTA ATT AAA GTC CAA TGC TAG)/Ko420(GAT ATC GAC AAA GGA AAA GGG GCG GCC GCG GAT CCC TCG AGT GTA TAT GAG ATA GTT GAT TG) та Ko453(CAA TCA ACT ATC TCA TAT ACA CTC GAG GGA TCC GCG GCC GCC CCT TTT CCT TTG TCG ATA TC)/Ko454(CCC CCC GGG GCA AAT TAA AGC CTT CGA GC) та об'єднали з використанням праймерів Ko419/Ko454. Фрагмент, що містить промотор *ADHI* та термінатор *CYC1* було оброблено рестриктазами SalI і XmaI та клоновано у рUC57-delta1_2. Отриману плазмідну було позначено рUC57-delta1_2-ADHpr-CYCt. ВРТ гена *TPS1* *S. cerevisiae* ампліфікували з використанням праймерів Ko590(CGC GGA TCC ATG ACT ACG GAT AAC GCT AAG GCG)/Ko591(TTT GCG GCC GCT CAG TTT TTG GTG GCA GAG GAG CTT G) та клонували

у сайти *Bam*HI і *Not*I попередньо сконструйованої плазміди. Отриманий вектор позначили *pUC57-delta1_2-ADHpr-TPS1-CYCt*. Ген *kanMX4*, що забезпечує резистентність до антибіотика генетицину, у складі *Sac*I/*Sma*I-фрагмента, обробленого Т4-ДНК-полімеразою, клонували у *Xba*I-лінеаризований та оброблений Т4-ДНК-полімеразою вектор *pUC57-delta1_2-ADHpr-TPS1-CYCt*. Плазміда отримала назву *pUC57-delta1_2-ADHpr-TPS1-CYCt-kanMX*. Для конструювання касети експресії гена *TPS2* промотор *ADH1* та термінатор *CYC1* були ампліфіковані за допомогою праймерів SM23(CCC CCC GGG TTA ATT AAA GTC CAA TGC TAG)/SM24(GAT ATC GAC AAA GGA AAA GGG GAG CTC GGG CCC GGT ACC TGT ATA TGA GAT AGT TGA TTG) та SM25(CAA TCA ACT ATC TCA TAT ACA GGT ACC GGG CCC GAG CTC CCC TTT TCC TTT GTC GAT ATC)/Ko454(CCC CCC GGG GCA AAT TAA AGC CTT CGA GC), об'єднані з використанням праймерів SM23/Ko454 та клоновані в *Xma*I сайт плазміди *pUC57-delta1_2-ADHpr-TPS1-CYCt-kanMX*. ВРТ гена *TPS2* *S. cerevisiae* було ампліфіковано з використанням праймерів SM26(GGT ACC ATG ACC ACC ACT GCC CAA GAC AAT TC)/SM27(GAG CTC TCA AAC CTT TGC GCC GGT GTA AGA AG) та клоновано у сайти *Kpn*I і *Sac*I попередньо сконструйованої плазміди. Кінцева конструкція отримала назву *pdelta-TPS1-TPS2* (рис. 1, А).

Штами що містять гени *TPS1* та *TPS2* від контролем сильного конститутивного промотора гена *ADH1* було одержано шляхом трансформації штамів 13 та У-563 плазмідною *pdelta-TPS1-TPS2*, попередньо обробленою рестриктазою *Ahd*I (при цьому видаляється частина вектора, що відповідає плазміді *pUC57*). Після трансформації клітини висівали на селективне середовище YPD з генетицином (200 мг/л). Колонії здатні рости на селективному середовищі з'являлися після 3 днів інкубації з частотою 100 трансформантів на 1 мкг ДНК. Наявність в одержаних трансформантів ВРТ *TPS1* та *TPS2* під контролем промотора *ScADH1*, а також гена резистентності до генетицину була підтверджена за допомогою ПЛР.

Наступний етап роботи включав проведення фізіологічного та біохімічного аналізу отриманих рекомбінантних штамів *S. cerevisiae* з посиленою експресією генів *TPS1* та *TPS2*. У отриманих трансформантів було визначено специфічну активність трегалозо-6-фосфатсинтази. Встановлено, що штам 13/*TPS1/TPS2* виявляв підвищену в 6,5 рази активність *Tps1* у порівнянні з вихідним штамом. Активність *Tps1* штаму У-563/*TPS1/TPS2* була підвищена в 23 рази у порівнянні з батьківським штамом (табл.). Підвищена активність свідчить про ефективну експресію цільових генів.

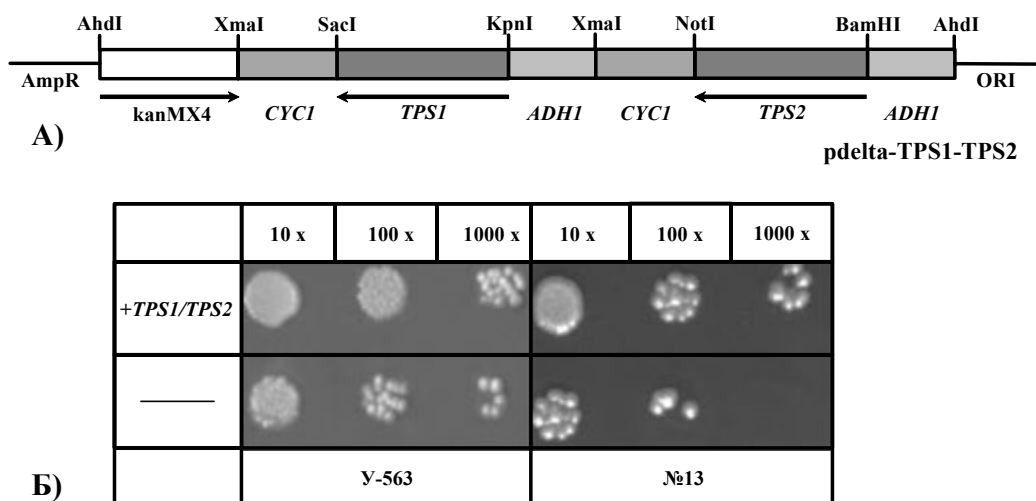


Рис. 1. А) Лінійна схема плазміди *pdelta-TPS1-TPS2*. Гени *kanMX4*, *TPS1*, *TPS2* позначено стрілками, промотор гена *ADH1* та термінатор гена *CYC1* позначено сірими відрізками, *AmpR* – ген *ble*, що забезпечує селекцію бактерійних трансформантів на середовищі в ампіциліном, *ORI* – бактерійна точка початку реплікації (пояснення у тексті). Б) Крапельний тест для визначення термотолерантності дріжджових трансформантів та вихідних штамів після інкубації клітин за умов теплового шоку при 52 °С протягом 30 хв. 10x, 100x, 1000x – розведення клітинної біомаси. Вихідна біомаса становила 0,1 ОГ

У сконструйованих штамів визначали внутрішньоклітинний вміст трегалози. Встановлено, що вміст трегалози отриманих трансформантів на основі штаму 13, підвищений на 50 % у порівнянні з вихідним штамом, тоді як підвищення внутрішньоклітинного вмісту трегалози трансформанта промислового штаму У-563, що містить гени *TPS1* та *TPS2* сягає 2,2 раза у порівнянні з батьківським штамом (табл.).

Термотолерантність сконструйованих рекомбінантних штамів визначали за здатністю до росту після інкубації клітин за умов теплового шоку при 52 °С протягом 30 хв. Було встановлено, що сконструйовані штами з дерепресією генів *TPS1* та *TPS2* виявляли підвищену термотолерантність у порівнянні з вихідними штамми (рис. 1, Б).

Алкогольна ферментація глюкози проводилася при підвищеній температурі (42 °С). Найвищий вихід спирту спостерігали на другу добу ферментації. Максимальна кількість синтезованого етанолу становила 38 г/л у штама 13/*TPS1*/*TPS2*. Підвищення сягало 17 %. Аналогічне підвищення синтезу етанолу

спостерігалося і у трансформанта, похідних штаму У-563, проте максимальна кількість синтезованого етанолу не перевищувала концентрації 31 г/л (табл.). Отримані результати були отримані без врахування випаровування.

Висновки

В результаті проведеної роботи було сконструйовано рекомбінантні штами *S. cerevisiae* з посиленою експресією генів біосинтезу трегалози *TPS1* (кодує трегалозо-6-фосфатсинтазу) та *TPS2* (кодує трегалозо-6-фосфатфосфатазу). Встановлено, що сконструйовані штами характеризуються підвищеним внутрішньоклітинним вмістом трегалози, підвищеною термотолерантністю та підвищеною ефективністю синтезу етанолу на 17 % при температурі 42 °С у порівнянні з батьківськими штамми. Сконструйовані штами є перспективними для впровадження у виробництво.

Робота виконувалась в рамках цільової комплексної програми наукових досліджень НАН України «Біологічні ресурси і новітні технології біоенергоконверсії», проект № 6–14.

Таблиця. Активність трегалозо-6-фосфатсинтази, Внутрішньоклітинний вміст трегалози та синтез етанолу штамми *S. cerevisiae*

Штам	Активність трегалозо-6-фосфат синтази (нМ/мг/хв)	Внутрішньоклітинний вміст трегалози (нМ/мг)	Етанол (г/л)
13	1,3 ± 0,06	19,9 ± 0,9	31,8 ± 1,6
13/ <i>TPS1</i> / <i>TPS2</i>	8,4 ± 0,4	44,1 ± 2,2	38,3 ± 2,1
У-563	1,5 ± 0,07	9,8 ± 0,5	25,8 ± 1,3
У-563/ <i>TPS1</i> / <i>TPS2</i>	35,2 ± 1,7	13,4 ± 0,7	31,0 ± 1,6

Література

1. Wiemken A. Trehalose in yeast, stress protectant rather than reserve carbohydrate // Antonie van Leeuwenhoek. – 1990. – 58, N 3. – P. 209–217.
2. An M.Z., Tang Y.Q., Mitsumasu K., Liu Z.S., Shigeru M., Kenji K. Enhanced thermotolerance for ethanol fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* strain by overexpression of the gene coding for trehalose-6-phosphate synthase // Biotechnol. Lett. – 2011. – 33. – P. 1367–1374.
3. Sambrook J., Fritsh E.F., Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. – New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. – 253 p.
4. Thompson J.R., Register E., Curotto J., Kurtz M., Kelly R. An improved protocol for the preparation of yeast cells for transformation by electroporation. Yeast. – 1998. – 14, N 6. – P. 565–571.
5. Guo Z.P., Zhang L., Ding Z.Y., Shi G.Y. Minimization of glycerol synthesis in industrial ethanol yeast without influencing its fermentation performance // Metabolic Engineering. – 2011. – 13, N 1. – P. 49–59.
6. Ishchuk O., Voronovsky A., Abbas C., Sibirny A. Construction of *Hansenula polymorpha* strains with improved thermotolerance // Biotechnology and Bioengineering. – 2009. – 104, N 5. – P. 911–919.
7. Gonchar M.V., Maidan M.M., Sibirny A.A. A new oxidase-peroxidase kit “Alcotest” for ethanol assays in alcoholic beverages // Food Technol. Biotechnol. – 2001. – 39. – P. 37–42.

LUZHETSKYI T.B., SEMKIV M.V., KSHANOVSKA B.V., DMYTRUK K.V., SIBIRNY A.A.

Institute of Cell Biology, NAS of Ukraine,

Ukraine, 79005, Lviv, Drahomanova str., 14/16, e-mail: dmytruk@cellbiol.lviv.ua

ELEVATION OF THERMOTOLERANCE OF INDUSTRIAL ETHANOL PRODUCING YEASTS VIA DEREPRESSION OF THE GENES FOR TREHALOSE SYNTHESIS

Aims. The aim of this work is the elevation of the thermotolerance and improvement the efficiency of high temperature alcoholic fermentation of yeast *S. cerevisiae* by overexpression of the genes *TPS1* and *TPS2*.

Methods. For overexpression of trehalose-6-phosphate synthase and trehalose-6-phosphate phosphatase the vector for multicopy integration was constructed, where ORFs of *TPS1* and *TPS2* genes were placed under the control of strong constitutive promoter *ADHI*. The resulting vector was linearized and used for transformation of *S. cerevisiae* industrial strains. **Results.** Recombinant strains overexpressing genes for trehalose synthesis possessed increased intracellular concentration of trehalose. Thermotolerance and efficiency of high temperature alcoholic fermentation of the constructed strains were increased. **Conclusions.** Recombinant strains with higher intracellular trehalose concentration produce 17 % more ethanol during fermentation at 42 °C. Constructed strains are promising for industrial implementation.

Key words: alcoholic fermentation, *S. cerevisiae*, thermotolerance, trehalose.

УДК 581.1:582.475:2

ЛУКИНА А.В.¹, ТРЕТЬЯКОВА И.Н.²

¹ *Красноярская краевая станция юннатов,*

Россия, г. Красноярск, ул. ак. Куренского, 23, e-mail: yunnatu@gmail.com

² *Институт леса им. В.Н. Сукачева,*

Россия, 660036, г. Красноярск, Академгородк, стр. 50, e-mail: culture@ksk.krasn.ru

ФАКТОРЫ ИНДУКЦИИ СОМАТИЧЕСКОГО ЭМБРИОГЕНЕЗА *PINUS SIBIRICA* DU TOUR

Соматический эмбриогенез – стремительно набирающий силу метод биотехнологии, находящий широкое применение в современном лесоводстве. За рубежом созданы плантации из генетически тестированных деревьев, полученных методами клеточной культуры. Программы селекции, сочетающие традиционные подходы и клеточные биотехнологии особенно актуальны. Многочисленными исследованиями, проведенными на разных видах рода *Pinus*, показано, что частота индукции соматического эмбриогенеза остается очень низкой, что значительно ограничивает практическое применение данного метода. Определение условий, влияющих на индукцию соматического эмбриогенеза будет способствовать увеличению числа клеточных линий из которых могут быть получены массовые регенеранты. [1]

Целью нашей работы являлось: выявить факторы, влияющие на индукцию соматического эмбриогенеза у *Pinus sibirica* Du Tour.

Задачи: оценить значение гормонального состава и сахаров в индуцирующей среде на соматический эмбриогенез *P. sibirica*; выявить роль генотипа дерева-донора для индукции

соматического эмбриогенеза

Материалы и методы

В качестве эксплантов использовали зародыши семян, полученных в результате контролируемого (6 деревьев) и свободного опыления (22 дерева). Для стерилизации семена обрабатывали водным раствором перманганата калия в течении 15 минут, затем отмывали в проточной воде и очищали твердые покровы. Далее мегагаметофиты выдерживали в течении 10 минут в гипохлорите натрия, трижды промывали в стерильной дистиллированной воде и помещали на 5 минут в 10 % раствор перекиси водорода. Интактные мегагаметофиты с заключенными в них зародышами, находящимися на предсемядольной стадии развития помещали на питательные среды. Были протестированы 5 питательных сред, различающиеся гормональным составом и сахарами (табл.).

Во все среды добавляли: глутамин 1 г/л, гидролизат казеина 0,5 г/л, мезоинозит 1 г/л, агар 6 г/л.

Результаты введения в культуру фиксировали на 21 и 42 сутки (рис. 1–3). При этом определяли изменение массы эксплантов,

после чего осуществляли цитологический контроль на давленных препаратах, приготовленных по стандартной методике (Паушева, 1990). Об успешной индукции соматического эмбриогенеза судили по наличию клеточных конгломератов (соматических зародышей) после 9 недель культивирования.

Статистическая обработка проводилась с использованием пакета программ Excel 2007.

Результаты и обсуждение

Результаты исследования показали, что все исследованные среды пригодны для индукции и пролиферации каллусной культуры. Минимальное значение частоты каллусообразования $58 \pm 4,3 \%$ получено на среде 4, максимальное – $80 \pm 5,6 \%$ на среде 5 (рис. 1).

Цитологический анализ культуры показал, что на 21 сутки каллусная масса состоит из клеточных конгломератов, представленных меристематическими клетками, формирующими

глобулу и примыкающих к ним вытянутых трубкообразных клеток. На 42 сутки отмечалась утрата эмбрионного потенциала для многих клеточных линий (рис. 2, 3). Частота формирования эмбрионально-суспензорной массы у разных генотипов варьирует от 0 до 3,9 % (в среднем 1,6 %). Низкий процент индукции соматического эмбриогенеза у представителей рода *Pinus* отмечается многими исследователями [4]. Корреляционный анализ выявил наличие умеренной связи (0,53) между генотипом материнского дерева и частотой инициации соматического эмбриогенеза. Генетическая обусловленность процессов соматического эмбриогенеза подтверждена многими исследователями. Предполагается, что отбором соответствующих родительских особей можно существенно повысить эффективность процессов регенерации *in vitro* [5].

Таблица. Среды, использованные для индукции соматического эмбриогенеза у *P. sibirica*

№ среды	Минеральный состав среды	Сахара	Гормоны
1	S LV [2]	30 г/л сахароза	2 мг/л 2,4 Д 1 мг/л 6-БАП
2	S LV	сахароза 10 г/л + 10 г/л глюкоза + 10 г/л мальтоза	1 мг/л бНУК + 1 мг/л 2,4 Д 1 мг/л кинетин
3	S LV	сахароза 15 г/л	2 мг/л 2,4 Д 1 мг/л 6-БАП
4	S LV	15 г/л глюкоза	1 мг/л 2,4 Д 0,5 мг/л 6-БАП
5	1043 [3]	15 г/л сахароза +15 г/л мальтоза	2 мг/л бНУК + 0,6 мг/л 6-БАП + 0,6 мг/л кинетин

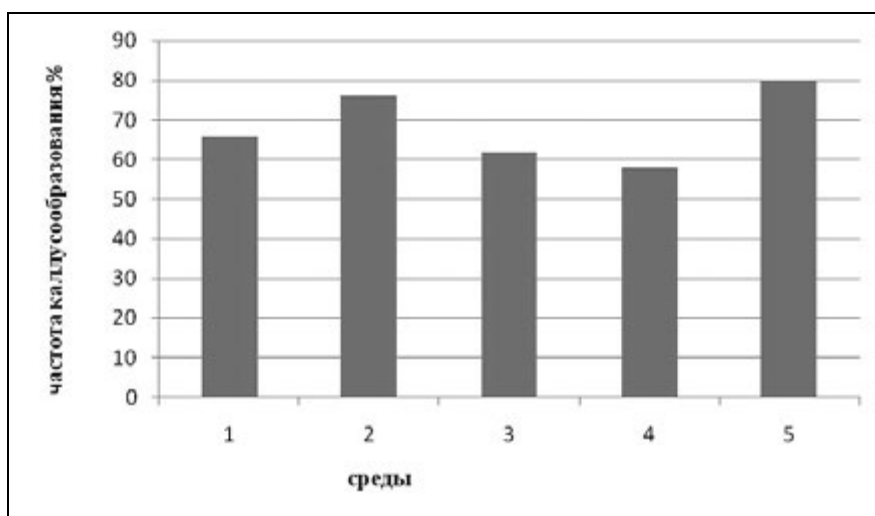


Рис. 1. Частота каллусообразования из незрелых мегагаметофитов *P. sibirica* на 21 сутки культивирования

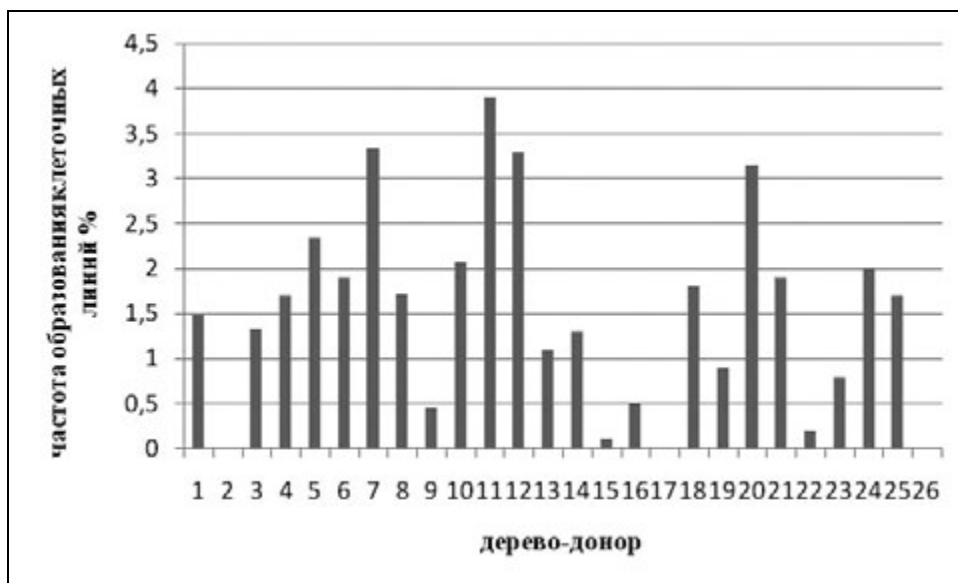


Рис. 2. Частота образования клеточных линий, сохраняющие эмбрионный потенциал на 42 сутки культивирования. 1–6 контролируемое опыление, 7–26 свободное опыление

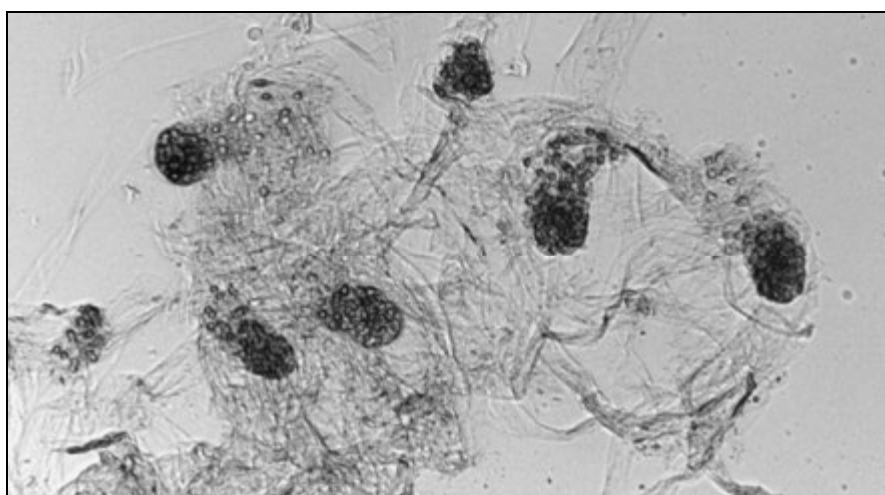


Рис. 3. Соматические зародыши на 42 сутки культивирования

Между эксплантами, полученными от свободноопыляемых деревьев и эксплантами, полученными в результате контролируемого опыления, достоверных различий не выявлено.

Выводы

Все исследованные среды способны поддерживать инициацию и пролиферацию каллусных культур *P. sibirica*. Больше число

эмбрионных клеточных линий было получено на среде 5.

Способность к сохранению эмбрионного потенциала в культуре *in vitro* определяется генотипом дерева-донора эксплантов.

После 6 недель культивирования не более 1,5 % полученных клеточных линий сохраняли эмбрионный потенциал.

Литература

1. Stasolla C., Yeung E.C. Recent advances in conifer somatic embryogenesis: improving somatic embryo quality// Plant Cell Tissue and Organ Culture. – 2003. – 75. – P. 15–35.
2. Litvay J.D., Verma D.C., Johnson M.A. Influence of loblolly pine (*Pinus taeda*) culture medium and its components on growth and somatic embryogenesis of the wild carrot (*Dausus carota*) // Plant Cell Reports. – 1985. – 4. – P. 325–328.

- Pullman G.S., Johnson S.S., Van Tassel, Zang Y. Somatic embryogenesis in loblolly pine (*Pinus taeda*) and Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*): improving culture initiation and growth with MeS pH buffer, biotin and folic acid // *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. – 2005. – 80. – P. 91–103.
- Bonga J.M., Klimaszewska K.K., von Anderkas P. Recalcitrance in clonal propagation, in particular of conifers // *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. – 2010. – 100. – P. 241–254.
- MakKay J.J., Becwar M.R., Park Y-S., Corderro J.P., Pullman G.S. Genetic control of somatic embryogenesis initiation in loblolly pine and implication for breeding // *Tree Genetic and genomics*. – 2006. – 2. – P. 1–9.

LUKINA A.V.¹, TRETYAKOVA I.N.²

¹ *Regional Centre for young naturalists,*

Russia, 660100, Krasnoyarsk, Kirenskogo str., 23, email: yunnatu@gmail.com

² *V.N. Sukachev Institute of Forest,*

Russia, 660036, Krasnoyarsk, Akademgorodok, 50, email: culture@ksk.krasn.ru

FACTORS OF INDUCTION OF SOMATIC EMBRYOGENESIS IN *PINUS SIBIRICA* DU TOUR

Aims. *In vitro* clonal propagation has the potential for fast multiplication of superior genotypes, allowing the exploitation of maximum genetic gain achieved in the breeding program. To determine the proportion of immature zygotic embryos from each open pollinated (OP) and controlled pollinated (CP) family from which somatic embryogenesis could be initiated and the number of responding families using various initiation media. **Methods.** For initiation of embryogenic cultures five media differs of plant grow regulator and carbohydrates source and concentration were tested. 22 OP and 6 CP trees have been used as zygotic embryo donors. **Results.** All tested media were capable to support proliferation cells lines *P. sibirica*. Callus tissue was initiated on explants from all of the 22 trees tested. Great variation in the mean percentage of embryogenic line establishment was observed, depending on the family.

Key words: somatic embryogenesis, *Pinus sibirica*, plant grow regulator, family effect.

УДК 58.086+581.522.4

МАРТИНЮК В.О.¹, ГОЛУБЕНКО А.В.¹, ГУМЕНЮК Г.Б.²

¹ *Київський національний університет імені Тараса Шевченка ННЦ «Інститут біології», Україна, 01032, м. Київ, вул. Симона Петлюри, 1, holubenko@yahoo.com*

² *Тернопільський національний педагогічний університет імені Володимира Гнатюка, Україна, 46027, м. Тернопіль, вул. М. Кривоноса, 2, e-mail: shumlyany@list.ru*

УВЕДЕННЯ В АСЕПТИЧНУ КУЛЬТУРУ РІДКІСНОЇ ЕНДЕМІЧНОЇ РОСЛИНИ *ATOCION LITHUANICUM* (ZAPAL.) TZVEL.

Atocion lithuanicum (Zapal.) Tzvel. (до 2001 р. – *Silene lithuanica* Zapal.) [1] – сарматський, здебільшого поліський ендемік [2], занесений до Червоної книги України, хоча природоохоронний статус виду все ще залишається неоціненим [3]. Ареал виду охоплює Польщу, Литву, Україну та Білорусь, в Україні цей вид зустрічається лише на Поліссі, переважно Правобережному на своїй східній та південній межі поширення [3–5]. Зростає на освітлених ділянках із сухими, бідними, піщаними ґрунтами в соснових лісах по галявинах і узліссях, біля доріг, часто на протипожежних смугах [3, 4, 6]. Основними причинами змін чисельності є зривання рослин, витоптування та заліснення [3]. *A. lithuanicum* має протиерозійне (закріплення пісків) та

декоративне значення, рослини іноді висаджують на присадибних ділянках [3, 7].

Зважаючи на соцологічний статус *A. lithuanicum*, необхідно застосувати всі можливі заходи для збереження генофонду виду як у природі, так і *ex situ*. Метою нашої роботи було введення рослин *A. lithuanicum* в асептичну культуру для вивчення їх морфогенетичних особливостей та збереження у складі колекції рідкісних рослин *in vitro* Ботанічного саду ім. акад. О.В. Фоміна Київського національного університету імені Тараса Шевченка.

Матеріали і методи

Для отримання первинних експлантів – асептичних проростків *A. lithuanicum* – було використане зріле насіння, зібране з рослин, яке зростало на території загальновійськового

полігону А4152 (Рівненська область). Стерилізацію насіння проводили у такій послідовності: 70 %-й етиловий спирт – 1 хв., 0,1 %-й розчин HgCl₂ – 8–12 хв., трикратне промивання дистильованою водою. Простерилізоване насіння висівали на агаризоване безгормональне живильне середовище МС (Мурасіге-Скуга) [8] з розведеним удвічі вмістом мікро- і мікроелементів (МС/2). Насіння *A. lithuanicum* пророщували за власною модифікацією загальноприйнятих методик [9], заклавши 5 варіантів досліду у 5-ти повторностях кожного: у темряві при 24 °С; з холодовою стратифікацією (7 днів при 5 °С); при обробці розчином гіберелової кислоти (ГК₃) у концентрації 100 мг/л протягом 20 год.; на світлі з чергуванням температури 24 °С (7 днів) з наступним витриманням за температури 5 °С (14 днів) та при 24 °С на світлі (контроль). Отримані проростки *A. lithuanicum* культивували *in vitro* за освітленості 3000–5000 лк, 16-годинного фотоперіоду, температури 24 °С, відносної вологості повітря 70 % на агаризованих живильних середовищах МС/2 з додаванням ауксин- та цитокінінактивних регуляторів росту в різних поєднаннях концентрацій [10]. Результати оброблено статистично [11].

Результати та обговорення

Пророщування насіння та отримання асептичних проростків, як первинних експлантів, було єдиним доступним для нас способом введення *A. lithuanicum* в культуру *in vitro*. Даних щодо спокою і проростання насіння досліджуваного виду нами знайдено не було, тому ми застосували комплексний підхід до вирішення цього питання. Спостереження за проростанням насіння *A. lithuanicum* показали, що проростання починається вже на п'ятий день після висіву. Таким чином з'ясувалось, що виконання одного з 5-ти способів пророщування насіння, у якому теплова стадія повинна була передувати холодовій, виявилось недоцільним, а його результати були враховані нами як додатковий контроль.

Як видно з таблиці, найвищі показники проростання насіння *A. lithuanicum in vitro* були отримані при пророщуванні його без додаткових умов на світлі за температури 24 °С (контроль). Найгірше проростання спостерігалось в темряві та після витримання насіння на холоді. Отримані результати свідчать про відсутність у насіння *A. lithuanicum* стану спокою та позитивний вплив світла на проростання. Проростки за морфологічними характеристиками також відрізнялись у різних варіантах досліду.

Таблиця. Схожість насіння *A. lithuanicum in vitro* за різних умов пророщування

№	Варіант досліду	Загальна кількість насінин, шт.	Кількість проростків у повторності, шт.	Загальна кількість проростків, шт.	Середня схожість насіння, %
1.	Контроль	500	31	152	30,4±0,07
			37		
			24		
			32		
			28		
2.	Обробка ГК ₃ (100 мг/л) протягом 20 год.	250	11	65	26,0±0,25
			11		
			17		
			14		
			12		
3.	Темрява	250	9	47	18,8±0,27
			13		
			4		
			8		
			13		
4.	Холодова стратифікація (7 діб)	250	8	58	23,2±0,26
			12		
			14		
			9		
			15		

Так, при пророщуванні у темряві, розвиток їх був нерівномірним, формувались як дрібні, так і надмірно видовжені проростки, чого не було у контрольному та решті варіантів (рис. 1). Обробка гібереловою кислотою дещо стимулювала видовження гіпокотила і гальмувала розвиток кореня. Холодова стратифікація сповільнювала розвиток проростків на початкових етапах проростання, проте за 7–10 днів він встановлювався на рівні контролю.

Отримані проростки використовувались як первинні експланти для дослідження морфогенетичних реакцій *A. lithuanicum in vitro*. У ході експерименту були протестовані живильні середовища з різними концентраціями ауксинів – індолилоцтової та нафтилоцтової

кислот (ІОК і НОК), і двох цитокинінів – кінетину та 6-бензиламінопурину (БАП), а також середовище МС/2 без регуляторів росту.

На безгормональному середовищі МС/2 можна було спостерігати активну вегетацію рослин *A. lithuanicum*, спонтанне утворення, активний ріст і галуження коренів (рис. 2). У переважній більшості випадків пагони формувались як щільні розетки. Утворення адвентивних бруньок і пагонів не спостерігалось. Незважаючи на активний ріст, забезпечити вегетативне розмноження *A. lithuanicum* на середовищі без регуляторів росту виявилось неможливим. Проте такий субстрат може бути придатним для підготовки до переведення вирощених *in vitro* рослин до септичних умов.

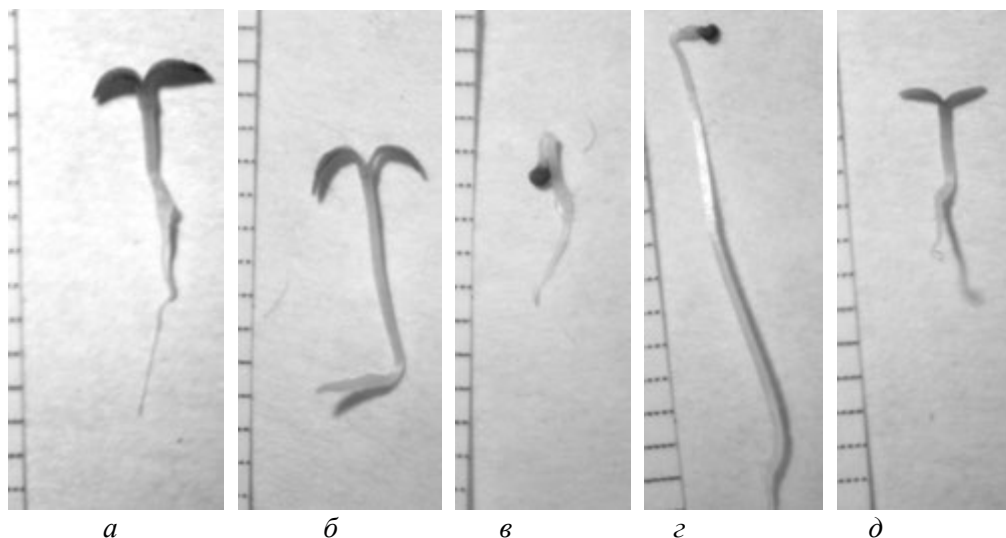


Рис. 1. Розвиток проростків *A. lithuanicum* на 10-ту добу від початку проростання: *a* – контроль; *б* – передпосівна обробка ГК₃; *в*, *г* – пророщування в темряві; *д* – холодова стратифікація (1 поділка лінійки дорівнює 1 мм)



Рис. 2. Ріст рослин *A. lithuanicum* на безгормональному середовищі МС/2

Результати наших досліджень показали високу чутливість експлантів досліджуваних рослин до наявності регуляторів росту в живильних середовищах. На середовищі 1 мг/л БАП у поєднанні з 0,2 мг/л ІОК та 0,1 мг/л НОК спостерігалось активне утворення калусу та фасційованих спотворених пагонів (рис. 3). При заміні бензіламінопурину на кінетин (2 мг/л) кількість фасціацій була значно нижчою, але поява адвентивних бруньок і пагонів (мікроклонів) також супроводжувалась калусогенезом.

Низькі концентрації як цитокінінів, так і ауксинів у живильному середовищі сприяли утворенню адвентивних бруньок і пагонів з них. Найбільш придатним для мікроклонального розмноження *A. lithuanicum* виявилось

середовище МС/2, доповнене 0,2 мг/л кінетину, 0,1 мг/л ІОК та 4 мг/л аденіну, при культивуванні на якому частота регенерації становила 100 %, а на кожен експлант припадало 3–5 мікроклонів (рис. 4).

Отже, в результаті виконаної роботи, ми досягли поставленої мети – вивчивши фізіологічні особливості проростання насіння, отримали первинні експланти та ввели в асептичну культуру рослини *A. lithuanicum*, підібрали оптимальний склад живильних середовищ для вегетації та мікроклонального розмноження і включили досліджуваний вид до складу колекції рідкісних рослин *in vitro* Ботанічного саду ім. акад. О.В. Фоміна Київського національного університету імені Тараса Шевченка.



Рис. 3. Утворення калусу, фасційованих пагонів та нормальних мікроклонів *A. lithuanicum* на живильному середовищі МС/2 з додаванням 1 мг/л БАП



Рис. 4. Мікроклонування *A. lithuanicum* на живильному середовищі МС/2 з додаванням 0,2 мг/л кінетину, 0,1 мг/л ІОК та 4 мг/л аденіну

Висновки

При введенні рослин *A. lithuanicum* культуру *in vitro* виявлено, що насіння виду не має стану спокою, а його проростання відбувається за участі світла. Встановлено високу морфогенетичну здатність рослин *A. lithuanicum* та чутливість до наявності в

живильному середовищі цитокінін- і ауксин активних фітогормонів. На основі отриманих результатів можна проводити подальшу оптимізацію складу живильних середовищ для мікроклонального розмноження досліджуваних рослин.

Література

1. Цвелев Н.Н. О родах трибы Смолевковых (Sileneae DC., Caryophyllaceae) в Восточной Европе // Новости систематики высших растений. – 2001. – 33. – С. 90–113.
2. Федорончук М.М. *Silene* L. sensu lato в Україні: огляд роду *Silene sensu stricto* (Caryophyllaceae) // Укр. ботан. журн. – 1997. – 54, № 6. – С. 557–564.
3. Червона книга України. Рослинний світ / за ред. Дідуха Я.П. – К.: Глобалконсалтинг, 2009. – 900 с.
4. Флора УРСР/ Під ред. Котова М.І. – К: Вид-во АН УРСР, 1952. – 4 – 689 с.
5. Определитель высших растений Украины / под ред. Прокудина Ю.Н. и др. – Киев: Наукова думка, 1987. – 548 с.
6. Флора Восточной Европы./ Под ред. Цвелева Н.Н. – Москва – Санкт-Петербург: Товарищество научных изданий КМК, 2004. – 11. – 536 с.
7. Екофлора України. Федорончук М.М., Дідух Я.П. та ін. / Відпов. ред. Дідух Я.П. – К.: Фітосоціоцентр, 2002. – Т. III. – 496 с.
8. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. plant.* – 1962. – 15. – P. 473–497.
9. Николаева М.Г., Разумова М.В., Гладкова В.Н. Справочник по проращиванию покоящихся семян. – Л.: Наука, 1985. – 347 с.
10. Кушнір Г.П., Сарнацька В.В. Мікроклональне розмноження рослин. Теорія і практика. – К.: Наукова думка, 2005. – 272 с.
11. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований) / Б.А. Доспехов. – М. : Колос. – 1985. – 336 с.

MARTYNIUK V.O.¹, GOLUBENKO A.V.¹, HUMENYUK H.B.²

¹ Educational and Scientific Centre «Institute of Biology» of the Taras Shevchenko National University of Kyiv,

Ukraine, 01601, Kyiv, Volodymyrska str., 64/13, e-mail: holubenko@yahoo.com

² Volodymyr Hnatiuk Ternopil National Pedagogical University,

Ukraine, 46027, Ternopil, M. Kryvonis str., 2, e-mail: shumlyany@list.ru

INITIATION TO ASEPTIC CULTURE OF RARE ENDEMIC PLANT *ATOCION LITHUANICUM* (ZAPAL.) TZVEL.

Aims. Introduction of the rare endemic species *Atocion lithuanicum* (Zapal.) Tzvel. to *in vitro* culture for its preservation *ex situ*. Research of the seed germination, *in vitro* vegetation, microclonal reproduction features and morphogenetic potential of *A. lithuanicum* plants. **Methods.** *A. lithuanicum* seeds were germinated *in vitro* using our own modification of the traditional methods. Explants of aseptic seedlings were cultivated on a ½ Murashige & Skoog basal medium with different hormonal composition. **Results.** It was discovered that *A. lithuanicum* seeds germinate in the light at 24°C. It was found that adding low concentrations of kinetine and indole acetic acid to the medium stimulates the microclone formation. **Conclusions.** The *A. lithuanicum* seeds have no dormancy state. The *A. lithuanicum* plants show a high ability for morphogenesis *in vitro*. The reproduction of *A. lithuanicum* in the aseptic culture is one of the possible ways to preserve this rare endemic species.

Key words: *Atocion lithuanicum* (Zapal.) Tzvel., seed germination, *in vitro* culture, clonal micropropagation.

УДК 636.47.082:57.086.13

МЕТЛИЦЬКА О.І., ЩЕРБАК О.В., КОВТУН С.І., ТРОЦЬКИЙ П.А., ЗЮЗІОН А.Б., ОСИПЧУК О.С.

Інститут розведення і генетики тварин НААН,
Україна, 08321, Київська обл., Бориспільський р-н., с. Чубинське, вул. Погребняка, 1,
e-mail: ov19792006@yandex.ru

ОПТИМІЗАЦІЯ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ПІДХОДІВ У СИСТЕМІ ЗБЕРЕЖЕННЯ ГЕНОФОНДУ СВИНЕЙ МИРГОРОДСЬКОЇ ПОРОДИ

Наразі ведення галузі свинарства спрямовано на збільшення м'ясної продуктивності, скоростиглості та зниження конверсії корму за високих показників репродуктивної здатності тварин. Такі вимоги ринку ставлять під загрозу існування місцевих порід, які на даний час є неконкурентоспроможними внаслідок недостатньої пристосованості до умов інтенсивних промислових технологій, проте характеризуються унікальними адаптаційними властивостями, якістю м'ясної продукції і специфічністю генофонду. Збереження автохтонних порід у вигляді закритих популяцій обмеженої чисельності *in situ* та *ex situ* призводить до загрози виникнення інбредної депресії тварин внаслідок накопичення генетичного вантажу та зниження рівня загальної генетичної гетерогенності. За таких обставин унеможливується збереження унікального генофонду порід методами традиційної селекції. Розробка та практичне застосування сучасних молекулярно-генетичних та біотехнологічних підходів є одним із можливих шляхів підтримки біорізноманіття сільськогосподарських тварин на рівні, необхідному для їх відтворення та запобігання загрози повного зникнення.

В Україні наразі налічується шість порід свиней місцевої селекції: миргородська, українська степова біла, українська степова ряба, полтавська м'ясна, українська м'ясна та червона білопоясна. Однією із характерних автохтонних порід свиней України є миргородська, яку згідно «Програми збереження генофонду основних видів сільськогосподарських тварин в Україні на період до 2015 року» віднесено до вітчизняного генофондового об'єкту, який перебуває на межі зникнення [1]. Дана порода свиней також занесена ФАО до унікальних зникаючих генотипів. За адаптивністю до місцевих умов утримання та високими технологічними характеристиками м'язової тканини (наявність жирових прошарків між м'язами,

вологоутримувальна здатність м'яса після забою) її можна віднести до порід з унікальними генетичними властивостями [2, 3].

Статистика свідчить, що кількість завезених тварин імпортованих генотипів за останні роки зросла у 8,6 разів, а поголів'я українських порід скоротилось у 1,45 разів. Станом на 01 січня 2013 року миргородська порода свиней, згідно «Держплемреєстру» розводиться лише в двох господарствах України: ДП «ДГ ім. Декабристів» Полтавської області (2542 голови) і СВК АФ «Перше травня» Сумської області (879 голів). Кількість основних свиноматок загалом по миргородській породі становить 383 голови, що є критичним показником щодо її подальшого чистопородного розведення.

Миргородську породу виведено шляхом складного відтворного схрещування місцевих українських чорно-рябих свиней із тваринами беркширської, середньої білої та темворської порід, в окремих випадках використовувалося прилиття крові польсько-китайської породи та елементи гібридизації тварин миргородської та великої білої порід за подальшого поглинального схрещування і розведення помісних свиней «у собі». Ця порода формувалася в жорстких умовах утримання й годівлі, в результаті чого було отримано невибагливих швидкостиглих тварин з високим рівнем резистентності та стійкості до стресових факторів. У 1940 р. масив миргородських свиней був затверджений як нова порода [4]. У системі схрещування, гібридизації та створення нових порід миргородську використовують як материнську форму [5, 6].

Ініціатором створення низькотемпературного генетичного банку статевих і соматичних клітин та зигот був Б.М. Вепрінцев. Учений запропонував поєднання прийомів кріоконсервації з методами біології розвитку [7]. При збереженні генофонду тварин, які знаходяться на межі зникнення, привертає особливу увагу метод кріоконсервації яйцеклітин, дозрілих до стадії метафази II мейозу [8].

Наразі держави, які є членами ФАО, об'єднують свої зусилля для збереження цінних генетичних ресурсів та забезпечення їх раціонального використання [9]. У деяких країнах вже діють програми по збереженню генетичних ресурсів тварин: Canadian Animal Genetic Resources Program (CAGRP) в Канаді, «Node» в Голандії та ін. В Інституті розведення і генетики тварин НААН розпочата робота із збереження зникаючих автохтонних порід свиней із застосування сучасних біотехнологічних та генетичних підходів. Такі технології, як кріоконсервація ооцитів, сперми та ембріонів, забезпечують можливість відновити необхідні види тварин та дозволяє реалізувати завдання щодо накопичення генетичного матеріалу з метою його довгострокового збереження [8, 10]. Створення ооцитобанку забезпечує накопичення необмеженої кількості генетичного матеріалу від різних особин, який є придатним для подальшого використання.

Метою нашої роботи було створення кріоколекції життєздатних ооцитів миргородської породи свиней, визначення оптимальних параметрів преаналітичної обробки біопроб із тканин яєчників свиней для поповнення банку ДНК як основи науково обґрунтованих біотехнологічних підходів щодо збереження свиней зникаючих порід.

Матеріали і методи

Дослідження були виконані в лабораторії біотехнології Інституту розведення і генетики тварин НААН. В експериментах використано яєчники свиней без патологічних ознак. Яєчники відбирали в ДП «ДГ «ім. Декабристів» від забитих племінних свиноматок миргородської породи. Ооцит-кумулясні комплекси (ОКК) вилучали шляхом надрізу лезом видимих антральних фолікулів. Непридатні до культивування ОКК та яєчники було заморожено для проведення молекулярно-генетичних досліджень. Повноцінні ОКК розмістили на дозрівання *in vitro* в середовище Ерла 199 (Sigma) з додаванням 20 % еструсної сироватки крові корів і $3-5 \times 10^6$ клітин гранульози/мл. Для культивування поза організмом відбирали лише ОКК із щільним та розпушеним кумулюсом та без ознак дегенерації ооплазми. Гамети культивували упродовж 46 годин при $+38,8^\circ\text{C}$ і 5 % CO_2 у повітрі. Критерієм морфологічної оцінки повноцінності дозрівання ооцитів була наявність першого полярного тільця. Перед кріоконсервацією такі ооцити обробляли 10 хв. еквілібраційним

розчином (10 % гліцерин + 20 % пропандіол) та переносили у вітрифікаційний розчин (25 % гліцерин + 25 % пропандіол). Еквілібраційний та вітрифікаційний розчини були приготовлені на фосфатно-сольовому буфері Дюльбеко з додаванням 20 % сироватки корів, яку попередньо інактивували при $+56^\circ\text{C}$ протягом 30 хв.

Свіжовилучені та заморожені (за -20°C) біоптати ОКК, які є непридатними для проведення біотехнологічних досліджень, та паренхімної тканини яєчників свиноматок використовували для виділення ДНК свиней. Подрібнення зразків тканин яєчників та ОКК проводили за допомогою скляного гомогенізатора, заморожених біоптатів – шляхом розтирання зразків тканин у лабораторній ступці з додаванням дрібних частинок скла. По 2 мг гомогенату тканин від кожної проби використовували для проведення процедури екстракції ДНК.

Виділення ДНК із біопсійного матеріалу проводили згідно з методикою, що зводить до мінімуму вірогідність деградації ДНК – сольовим методом [11] за використання ацетату калію. Нативність ДНК визначали шляхом електрофорезу в 1 % агарозному гелі за відсутності «шмерів» фрагментів ДНК, РНК та інтенсивності флуоресценції ДНК, забарвленої бромистим етидієм при УФ опромінуванні електрофореграм [12, 13].

Вимірювання концентрації ДНК проводили за допомогою спектрофотометру при довжини хвилі 260 нм, згідно технічних особливостей приладу [12]. Використовували кювети з довжиною оптичного шляху 1 мм та місткістю 200 мкл. Для вимірювання концентрації ДНК вихідний зразок розводили дистильованою водою із розрахунку 1:40. В контрольну кювету наливали 200 мкл дистильованої води, в іншу – приготований зразок ДНК. Проводили вимірювання оптичної щільності зразка при довжині хвилі 260 нм. Розрахунок концентрації ДНК проводили шляхом множення значення оптичної щільності зразка при довжині хвилі 260 нм на коефіцієнт 20.

Контроль чистоти препаратів ДНК проводили розрахунком співвідношення оптичних щільностей розчину ДНК при довжині хвилі 260 нм і 280 нм ($\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$).

Результати та обговорення

Інститут розведення і генетики тварин НААН з 2006 р. координує виконання програми наукових досліджень НААН «Збереження генофонду», завдання якої реалізують 12

наукових установ системи НААН, а також забезпечує функціонування Банку генетичних ресурсів тварин, віднесеного до наукових об'єктів, що становлять національне надбання (розпорядження Кабінету Міністрів України від 19 серпня 2002 р. № 472-р.). В Банку генетичних ресурсів ІРГТ НААН накопичено понад 132 тис. спермодоз еякульованих сперматозоїдів 27 порід великої рогатої худоби, 26 спермодоз коней двох порід, 1000 спермодоз кнурів двох локальних порід, 28 доз сперми овець двох автохтонних порід. Даний генетичний матеріал використовується не лише з метою довгострокового зберігання, а і для проведення наукових досліджень з оцінки раннього ембріогенезу та ДНК-типуювання тварин вітчизняних порід. Такі дослідження вимагають наявності великої кількості вихідного біологічного матеріалу, придатного для проведення експериментів. Також в Банку генетичних ресурсів тварин закладено на зберігання сперматозоїди, вилучені із хвостової частини придатків (епідидиміс) сім'яників від бугаїв, кнурів, цапів різних порід і породних груп. Наразі в Інституті розведення і генетики тварин НААН розпочато створення ооцитобанку свиней миргородської породи.

Для вилучення гамет, необхідних для створення кріобанку і проведення досліджень відносно оптимізації преаналітичного етапу обробки біологічного матеріалу для виділення ДНК, було відібрано три свиноматки миргородської породи свиней різного генеалогічного походження.

При плануванні експерименту по вилученню ОКК свиноматок для поповнення Банку генетичних ресурсів тварин спиралися на генеалогічний аналіз стада ДП «ДГ ім.

Декабристів», згідно якого найбільшу частку від загальної кількості складають представники провідних родин Сороки, Ласкавої, Сойки та Смородина (17 %, 15 %, 14,5 % та 13,5 %, відповідно). Окрім широкої представленості родин у загальній структурі стада при формуванні групи дослідів враховували репродуктивні ознаки свиноматок та наявність рекордисток по породі у обраних генеалогічних структурах.

За даними декількох бонітувань, рекордистками по стаду за останні три роки визнано три свиноматки: Русалка 410, Ласкава 220 і Ласкава 76, а кращими визнано 36 свиноматок, із них найбільша кількість тварин належала родинам Сороки (5 голів), Конвалії, Ласкавої, Сойки та Смородина (по 4 голови з кожної).

В результаті проведеної роботи для довготривалого зберігання в Банк генетичних ресурсів тварин закладено повноцінних дозрілих *in vitro* 25 ооцитів від свиноматки Русалка № 274/05128, 19 ооцитів від свиноматки Сойка № 314 та 53 ооцити від свиноматки Смородина № 674 миргородської породи (табл. 1).

Зазначимо, що при формуванні кріобанку ооцитів необхідно враховувати індивідуальні особливості тварин. Вилучені з яєчників свиноматок миргородської породи ОКК характеризуються значною гетерологічністю популяції ооцитів як за якістю, так і загальною їх кількістю (рис. 1).

За результатами морфологічного аналізу встановлено, що кількість отриманих і придатних для кріоконсервації ОКК від кожної свиноматки може коливатися від 21 до 42 клітин.

Таблиця 1. Кількість вилученого генетичного матеріалу від свиней миргородської породи, придатного до кріоконсервації

Кличка тварини, інд. №	Кількість біоматеріалу для ДНК досліджень		Кількість кріоконсервованих яйцеклітин, n
	тканина яєчників n (мікропробірок)	ооцит-кумулясні комплекси, n	
Русалка №274/05128	57	25	25
Сойка №314	43	10	19
Смородина №674	39	18	53
Всього	139	53	97

Крім того, з яєчників свиноматки Смородина № 674 74,6 % ОКК були придатними до культивування і досягли метафази II, а у свиноматки Сойка № 314 тільки 65,5 % виявилися придатними для культивування та кріоконсервації і лише 50,0 % ОКК були придатними до подальшого використання із яєчників свиноматки Русалка № 274/05128.

Таким чином, одним із лімітуючих факторів при збереженні генетичних ресурсів свиней є індивідуальна варіабельність у кількості повноцінних життєздатних ооцитів. Така різниця в кількості одержаних яйцеклітин, придатних для кріоконсервації, головним чином пов'язана з віком тварини та стадією статевого циклу на якому вона перебувала у момент вилучення ОКК. Отже, існує необхідність

розробки нових та удосконалення існуючих методів вилучення, культивування та прогнозованої оцінки придатності до тривалого збереження ооцитів свиноматок шляхом кріоконсервації, щоб за обмеженої кількості наявного генетичного матеріалу досягти максимально раціонального рівня його використання.

Для проведення ДНК-досліджень використовували біоматеріал із тканини яєчників та незрілих ОКК свиноматок, що був непридатним для подальших маніпуляцій в умовах *in vitro*. Проводили порівняльні дослідження концентрації, якості та нативності виділеної ДНК із свіжоотриманих та заморожених біоптатів. Результати проведених вимірювань наведені в табл. 2.

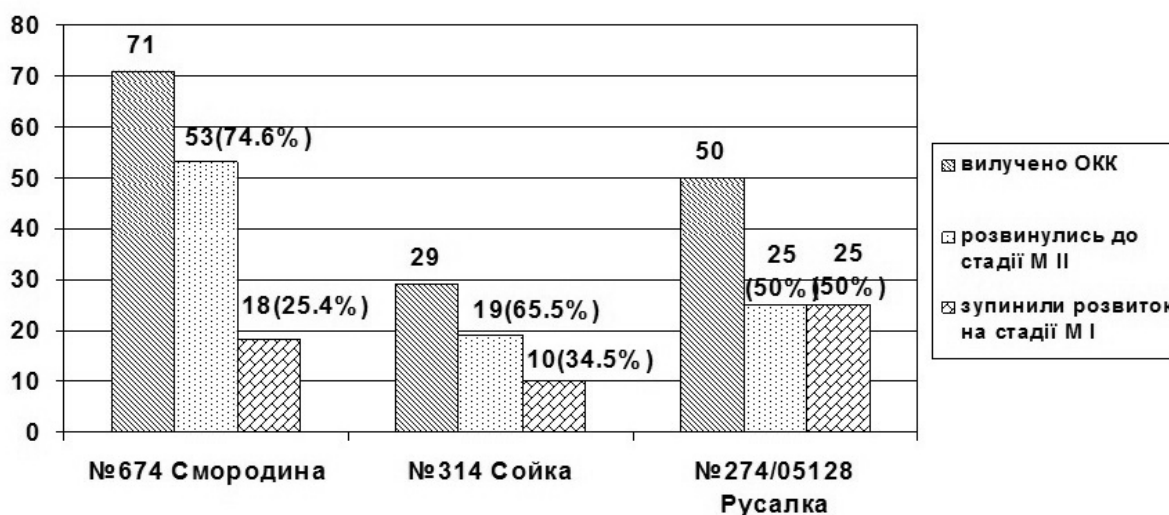


Рис. 1. Рівень дозрівання *in vitro* ОКК свинок миргородської породи

Таблиця 2. Спектрофотометричний аналіз ДНК свиней миргородської породи

№ з/п	Номер тварини, кличка, вид біол. матеріалу	260нм	280нм	260/280	мкг/мкл
1.	Русалка №274/05128 (ОКК)	0,165	0,107	1,54	3,30
	Русалка №274/05128 (ОКК), -20 °С	0,178	0,110	1,62	3,56
	Русалка №274/05128 біопт. яєчн.	0,290	0,185	1,57	5,80
	Русалка №274/05128 біопт. яєчн., -20 °С	0,354	0,211	1,68	7,08
2.	Сойка №314 (ОКК)	0,153	0,101	1,51	3,05
	Сойка №314 (ОКК), -20 °С	0,236	0,148	1,59	4,72
	Сойка №314 біопт. яєчн.	0,268	0,164	1,63	5,36
	Сойка №314 біопт. яєчн., -20 °С	0,317	0,548	1,73	6,34
3.	Смородина № 674 (ОКК)	0,219	0,130	1,69	4,37
	Смородина № 674 (ОКК), -20 °С	0,292	0,166	1,76	5,84
	Смородина № 674 біопт. яєчн.	0,307	0,171	1,80	6,13
	Смородина № 674 біопт. яєчн., -20 °С	0,312	0,568	1,82	6,23

Після процедури виділення ДНК сольовим методом, концентрація тотальної ДНК складала 3,05–7,08 мкг/мл., що залежало від попередньої температурної обробки (за низьких температур) біопатів та їх походження (ОКК та паренхіма яєчників). Було показано, що найвищу концентрацію ДНК отримано із зразків паренхіми яєчників, попередньо заморожених протягом доби за температури -20°C : концентрація ДНК, виділена із біопатів замороженого яєчника Русалки № 274/05128 сягала найвищого значення – 7,08 мкг/мл, а мінімальна, проте достатня для проведення молекулярно-генетичних досліджень у полімеразній ланцюговій реакції (ПЛР) із встановлення характерних особливостей генотипу тварини була визначена для ДНК-проби, отриманої із свіжовилученого біопату ОКК свиноматки Сойка № 314.

Одержані за методикою сольової екстракції проби ДНК мали в цілому високу ступінь чистоти, що підтверджується розрахованими значеннями співвідношень оптичних щільностей зразків, визначених при довжині хвиль 260 та 280 нм, які знаходилися у межах 1,51–1,82. Проведення електрофоретичного аналізу препаратів ДНК показало низьку нативність та ступінь чистоти екстрагованої нуклеїнової кислоти в пробах, отриманих із неохолоджених ОКК свиноматок Русалка № 274/05128 та Сойка № 314, що підтверджується наявністю «шмерів» на електрофореграмах після забарвлення бромистим етидієм як ознак деградації ДНК та домішків РНК. Додатковим показником зниженої придатності зазначених зразків ДНК є величини співвідношень оптичної щільності препаратів при довжині хвилі 260 та 280 нм, що склали 1,54 та 1,51, відповідно проти $1,9 \pm 0,2$ як стандарту «чистоти» екстрагованої ДНК.

Концентрація ДНК препаратів у деяких зразках перевищувала оптимальні значення (4–5 мкг/мл) для застосування в локус-специфічній полімеразній ланцюговій реакції, що повинно враховуватись при плануванні молекулярно-генетичного аналізу із застосуванням маркерів різних класів. Наприклад, ДНК-зразок від тварини Русалка № 274/05128 перед проведенням ПЛР-реакції повинен бути розведений бідистильованою водою до вихідної концентрації 5 мкг/мл для проведення досліджень QTL або STR локусів і надалі у співвідношенні 1:10 для використання у фінгерпринтному аналізі в технологіях ISSR,

IRAP, REMAP, AFLP, тощо.

В Україні розведення високопродуктивних зарубіжних порід, типів і ліній, відселекціонованих за м'ясними та відгодівельними якостями, згідно вимог сучасного ринку, призвело до того, що аборигенні і локальні породи свиней знаходяться на межі зникнення, а деякі вже зникли назавжди. Тому необхідність створення Національного кріобанку гамет, зигот та ДНК з біологічного матеріалу сільськогосподарських тварин є надзвичайно актуальним і своєчасним заходом, що є передумовою широкого впровадження у практику методів маркер-асоційованої селекції, комплексної геномної оцінки тварин, генної інженерії на основі біотехнологічних підходів не тільки контексті збереження генофонду порід і біорізноманіття природних ресурсів, але і підвищення ефективності сільськогосподарського виробництва та якості продукції.

Висновки

Застосовано комплекс біотехнологічних та молекулярно-генетичних методів для формування та функціонування ооцитобанку свиней миргородської породи в складі Банку генетичних ресурсів Інституту розведення і генетики тварин НААН. Ооцитобанк поповнено 97-ма повноцінними яйцеклітинами, що дозріли в умовах *in vitro*. Оскільки, миргородську породу віднесено до вітчизняного генофондового об'єкту, створення ооцитобанку є одним з пріоритетних напрямків роботи із збереження та відновлення чисельності тварин зникаючих автохтонних порід у свинарстві, що мають комплекс генів високої адаптивності до місцевих паратипових факторів. Оптимізація та стандартизація преаналітичних та методичних аспектів екстракції нуклеїнових кислот сприятиме одержанню біологічного матеріалу високої якості, придатного до тривалого збереження за низьких температур і подальшого застосування з метою оцінки характерних для порід особливостей генетичної структури, наявності селекційно цінних генних комплексів та генетично детермінованих аномалій розвитку.

Збереження цінного генофондового матеріалу у кріобанках у вигляді гамет сприятиме вирішенню нагальної проблеми відтворення видів, у тому числі і сільськогосподарських тварин, що опинилися на межі зникнення.

Робота виконана під керівництвом д.с.-г.н., член-кор. НААН України С.І. Ковтун.

Література

1. Програма збереження генофонду основних видів сільськогосподарських тварин в Україні на період до 2015 року / заг. наук. ред. І.В. Гузева, консультація та специфікація Ю.В. Мельника. – К.: Арістей, 2009. – 132 с.
2. Бірта Г.О., Бургу Ю.Г. Влияние генотипа на мясные качества свиней // Вісник Полтавської держ. аграр. академії. – 2012. – № 1. – С. 212–214.
3. <http://dad.fao.org>.
4. Герасимов В.І. та ін. Світовий генофонд свиней: монографія. – Харків: Еспада. – 2006. – 520 с.
5. Ернст Л.К. Генетические основы селекции сельскохозяйственных животных. – М.: РАСХН, ВГНИИ животноводства, 2004. – 736 с.
6. Барановський Д.І. та ін. Генофонд свійських тварин України: навч. посібник. – Харків: Еспада, 2005. – 400 с.
7. Вепринцев Б.Н., Ротт Н.Н. Стратегия сохранения животного и растительного мира земли // Консервация генетических ресурсов. – Пушино, 1991. – С. 47–62.
8. Вепринцев Б.Н., Ротт Н.Н. Консервация генетических ресурсов // Природа. – М., 1978. – № 11. – С. 10–21.
9. FAO Guidelines for the Cryoconservation of Animal Genetic Resources. – Rome, Italy, 2010. – 170 с.
10. Лебедева Я.В. Измерение и оценка биологического разнообразия. – Ростов Н/Д. УПЛ РГУ, 1999. – Ч. 2. – 94 с.
11. Соколов Б.П., Джемелинский В.В. Выделение высокомолекулярной эукариотической ДНК с использованием ацетата калия // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 1989. – № 6. – С. 45–46.
12. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Д. Молекулярное клонирование. – Москва: Мир, 1984. – 479 с.
13. Медицинские лабораторные технологии. Справочник / [под ред. А.И. Карпищенко]. – Санкт-Петербург: Интермедика, 2002. – 2. – 600 с.

METLITSKA O.I., SHCHERBAK O.V., KOVTUN S.I., TROSKIY P.A., ZYUZYN A.B., OSYPCHUK O.S.

Institute of Animal Breeding and Genetics, National Academy of Agrarian Science of Ukraine, Ukraine, 08321, Kiev Region, Borispol District, v. Chubinske, Pogrebnyaka str., 1, e-mail: ov19792006@yandex.ru

OPTIMIZATION BIOTECHNOLOGICAL METHODS IN THE SYSTEM OF MIRGORODSKA BREED PIGS GENE POOL PRESERVATION

Aims. Gene pool preservation endangered, indigenous pig breeds requires using methods modern biotechnology and genetic. Create a cryocollection Mirgorodska breed pigs viable oocytes and DNA bank for the development of scientific methods of maintenance and further improvement. **Methods.** In carrying out this work used biotechnology, cryobiological, morphological, molecular genetic methods. **Results.** As a result of working for long-term storage in the Bank Animal Genetic Resources of the Institute of Animal Breeding and Genetics laid full *in vitro* matured oocytes 25 sows Rysalka № 274/ 05 128, 19 oocytes Sojka № 314 and 53 oocytes Smorodina № 674 Mirgorodska breed pigs. For DNA studies the optimal treatment primary regimes biomaterial: ovarian tissue and immature oocyte cumulus complexes. **Conclusion.** Used complex biotechnology and molecular-genetic methods to form oocytebank pigs of Mirgorodska breed in Bank Animal Genetic Resources of the Institute of Animal Breeding and Genetics

Key words: cryobank, oocyte, cryopreservation, DNA-analysis, gene pool.

УДК 604.6:633.15

НІТОВСЬКА І.О.¹, АБРАЇМОВА О.Є.², САТАРОВА Т.М.², ШАХОВСЬКИЙ А.М.¹, МОРГУН Б.В.¹

¹ Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України,

Україна, 03680, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 148, e-mail: molgen@icbge.org.ua

² Державна установа Інститут сільського господарства степової зони НААН України,

Україна, 49600, м. Дніпропетровськ, вул. Дзержинського, 14

БІОЛІСТИЧНА ТРАНСФОРМАЦІЯ НЕЗРІЛИХ ЗАРОДКІВ КУКУРУДЗИ

Генетичну трансформацію рослин покращення їх характеристик, збільшення сільськогосподарських культур використовують врожаю та здешевлення виробництва. З кожним для надання їм певних ознак з метою роком світова площа, зайнята під вирощування

біотехнологічних рослин, невпинно зростає та становить станом на 2013 рік понад 175 млн га [1]. Кукурудза (*Zea mays* L.) є важливою сільськогосподарською культурою широкого використання, яку вирощують по всьому світі у промислових масштабах, у тому числі і генетично модифіковану. Найбільше поширення отримала трансгенна кукурудза, стійка до гербіцидів та комах [2]. Для отримання трансгенних рослин кукурудзи найчастіше використовують *Agrobacterium*-опосередкований або біолістичний методи та незрілі зародки як безпосередній об'єкт для проведення генетичної трансформації [3, 4]. Проте не зважаючи на певний успіх по створенню та вирощуванню трансгенної кукурудзи, генетична трансформація комерційних генотипів не є рутинною та надійно відтворювальною процедурою.

Метою нашого дослідження було проведення біолістичної трансформації незрілих зародків кукурудзи певних генотипів, які створені та вирощуються на території України, та оцінка їх компетентність для генетичної трансформації.

Матеріали та методи

Для трансформації використовували незрілі зародки кукурудзи 21 генотипу: 8 інбредних ліній, 10 гібридів F₁ та соматоклональні варіанти на основі гібридів F₁ (табл. 1). Донорні рослини кукурудзи вирощували у польових умовах. Незрілі зародки у віці 10–12 діб після запилення ізолювали з донорних рослин, стерилізували та експлантували на живильне середовище для калусогенезу *in vitro*, як описано раніше [5]. Через 2–16 діб культивування на середовищі для калусогенезу незрілі зародки, на щитках яких почали розвиватися калуси, піддавали біолістичній трансформації.

В експериментах використовували вектор рАНС25 [6], який містить ген β-глюкуронідази *uidA* та ген фосфінотрицин-ацетил-трансферази *bar*, обидва під контролем промотору убіквітину кукурудзи.

Експерименти з біолістичної трансформації кукурудзи проводили, використовуючи гармату PDF-1000/He.unit, Bio-Rad. Носіями ДНК були частинки золота (Bio-Rad) діаметром 1 мкм. ДНК плазмиди адсорбували на частинках золота, використовуючи розчин Mg²⁺-PEG [7]. Процедуру біолістичної трансформації проводили за загально прийнятим протоколом, застосовуючи тиск 900 psi та відстань від макроносія до рослинного матеріалу 6 см. Підготовку рослинного матеріалу до

трансформації та подальше культивування робили як описано раніше [5]. Кількість зародків, яку обробляли одним пострілом, була від 25 до 50. Через тиждень після біолістичної обробки рослинний матеріал переносили на селективне середовище для калусогенезу [5] з додаванням 5 мг/л фосфінотрицину та вирощували у темряві при 27 °С. Калуси переносили на свіже середовище що два тижні. Через 2–4 тижні після початку селекції калуси переносили на селективне регенераційне середовище, яке містило сольовий компонент та вітаміни середовища МС [8], 700 мг/л проліну, 0,25 мг/л 6-бензил-амінопурина, 20 г/л сахарози, 7 г/л агару та 5 мг/л фосфінотрицину, і вирощували в умовах освітлення при 26 °С та 16-годинному фотоперіоді. Рослини-регенеранти висаджували в банки на безгормональне середовище МС з додаванням 5 мг/л фосфінотрицину та вирощували в тому ж режимі освітлення.

Гістохімічний аналіз наявності β-глюкуронідази у рослинному матеріалі проводили за методикою [9] через 4 доби після обстрілу з метою виявлення транзійтної експресії гена *uidA*, і через 2–3 місяця для визначення події стабільної трансформації.

З отриманого стійкого до фосфінотрицину рослинного матеріалу виділяли ДНК, використовуючи ЦТАБ-метод [10]. Концентрацію та чистоту ДНК визначали спектрофотометрично. Наявність гену *bar* в рослинній ДНК визначали методом ПЛР, використовуючи праймери: форвардний 5'-ACA TCG AGA CAA GCA CGG TC-3' та реверсний 5'-GCC AGA AAC CCA CGT CAT GC-3'. Довжина очікуваного фрагменту була 411 п.н. Умови ампліфікації були: денатурація 94°C/4 хв; 32 циклі ампліфікації (денатурація 94°C/30 с, відпал 59°C/30 с, синтез 72°C/30 с); заключний синтез 72°C/5 хв. В якості позитивного контролю використовувалась загальна ДНК вже трансформованої рослини. Продукти реакції фракціонували в 1% агарозному гелі з бромистим етидієм (0,5 мкг/мл) у трис-боратній буферній системі при 8 В/см протягом 90 хв.

Результати та обговорення

Було проведено три серії експериментів з біолістичної трансформації незрілих зародків 21 генотипу кукурудзи при різних термінах культивування від експлантації на живильне середовище ізольованих зародків до проведення біолістичної трансформації (DIC) (табл.). У дослідах використовували вектор рАНС25.

Таблиця. Біолістична трансформація незрілих зародків кукурудзи

Генотип	Кількість пострілів	DIC*	Кількість регенерантів	Gus-забарвлення	
				Калюс, кількість зародків	Листки, кількість регенерантів
PLS61	3	7	2	-	-
PLS61	2	9	45	-	6
RS15	5	12	1	-	-
ПРЖ5	2	8	1	-	-
ПРЖ5	2	16	0	1	-
P205	8	12	0	-	-
ДК744	3	13	0	-	-
ДК959	4	7	0	-	-
КС277	4	4	0	-	-
КГ232	4	9	0	-	-
PLS61♀×КГ232♂	2	9	1	-	-
PLS61♀×КГ232♂	4	10	0	1	-
PLS61♀×P205♂	4	8	0	-	-
PLS61♀×ДК744♂	2	7	0	-	-
PLS61♀×ДК744♂	4	9	3	1	-
PLS61♀×ДК959♂	2	5	0	-	-
PLS61♀×КП7♂	1	14	3	-	-
PLS61♀×ПРЖ5♂	2	15	4	-	-
ДК959♀×PLS61♂	6	9	6	5	1
КГ232♀×PLS61♂	2	11	0	-	-
ПРЖ5♀×PLS61♂	2	2	0	-	-
ДК744♀×PLS61♂	2	3	0	-	-
с.в. ДК304♀×PLS61♂	2	5	1	-	-
с.в. ДК304♀×PLS61♂	2	15	0	-	-
с.в. PLS61♀×ДК304♂	3	7	1	1	1
с.в. PLS61♀×ДК304♂	3	14	12	1	-
с.в. ДК675♀×Chi31♂	2	13	3	3	-
Загалом	82		82	13	8

Примітка: *DIC (days in culture) – кількість днів від експлантації незрілих зародків на середовище для калюсогенезу до проведення біолістичної обробки; с.в. – соматональний варіант.

Через 4 доби після обстрілу проводили гістохімічний аналіз транзійтної експресії гену β-глюкуронідази в калюсних тканинах. За інтенсивністю блакитного забарвлення найкраще в експериментах з біолістичної трансформації себе показали наступні генотипи кукурудзи: інбредні лінії PLS61 і КС277 та гібриди F₁ ДК959♀×PLS61♂, PLS61♀×ДК959♂, PLS61♀×ПРЖ5♂, PLS61♀×КП7♂.

Через 1,5–2 місяці після трансформації спостерігали регенерацію пагонів на селективному середовищі для різних генотипів кукурудзи (рис. 1, табл.).

Пагони регенованих рослин відокремлювали від калюсу та садили в банки з селективним середовищем. Більшість рослин-

регенерантів були чутливі до гербіциду, тоді як решта укорінювались та залишались зеленими на селективному середовищі. Паралельно проводили гістохімічний аналіз на присутність експресії гену *uidA* для частини рослинного матеріалу (листочки рослин-регенерантів і калюс) стійкого до фосфінотрицину. Гістохімічне фарбування на присутність β-глюкуронідази показало, що синє забарвлення спостерігалось не по всій тканині, а на окремих ділянках, що може свідчити, або про замовчування експресії гену *uidA* в окремих ділянках, або про химерність одержаного рослинного матеріалу.

Стійкий до фосфінотрицину калюс та листки рослин-регенерантів використовували

для виділення загальної ДНК. Рослинну ДНК аналізували методом ПЛР на наявність послідовності трансгена *bar*. Аналіз методом ПЛР показав присутність гена *bar* в рослинній ДНК стійкого до фосфінотрицину калюсу кукурудзи, який виявляв блакитне забарвлення при гістохімічному аналізі, а також для 6 ліній рослин-регенерантів (рис. 2). Результати ПЛР свідчать про трансгенну природу одержаного рослинного матеріалу.

Цікаво, що у нашому дослідженні спостерігається певна кореляція між рівнями транз'єнтної експресії β -глюкуронідази для різних генотипів кукурудзи і результатами зі стабільної трансформації, що може бути використано для швидкого відбору

компетентних для трансформації генотипів кукурудзи.

В експериментах з генетичної біоістичної трансформації ми використовували незрілі зародки кукурудзи, які до обстрілу перебували на середовищі для калюсогенезу від 2 до 16 діб (табл. 1). Найкращим для трансформації рослинним матеріалом були незрілі зародки з калусами, які до обстрілу культивувалися 9 діб. У проведених експериментах по отриманню стабільних трансформантів кукурудзи методом біоістичної трансформації серед 21 генотипу найкраще себе показали інбредна лінія PLS61 та гібриди F₁ PLS61♀×ДК744♂, PLS61♀×ДК304♂ і ДК959♀×PLS61♂.

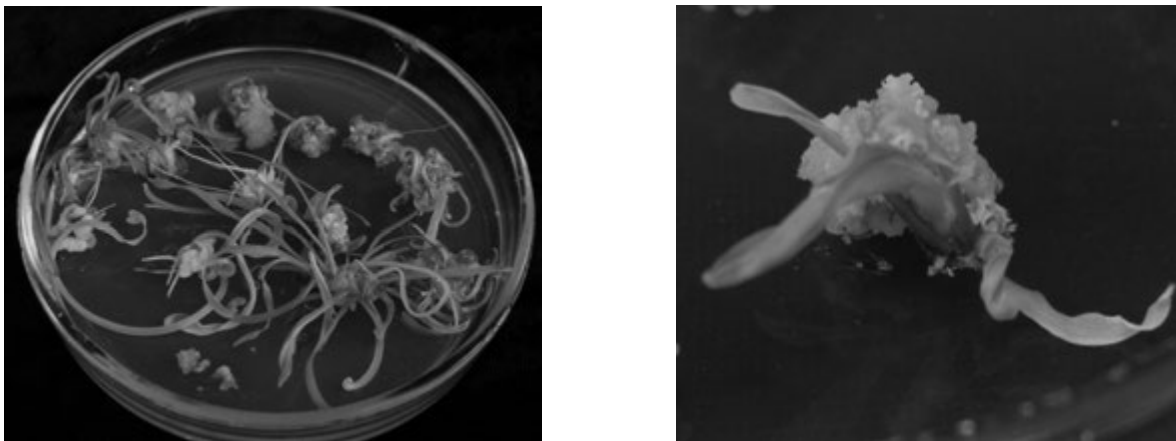


Рис. 1. Регенерація на селективному середовищі пагонів кукурудзи лінії PLS61 (ліворуч) та гібриду F₁ PLS61♀×ДК744♂ (праворуч)

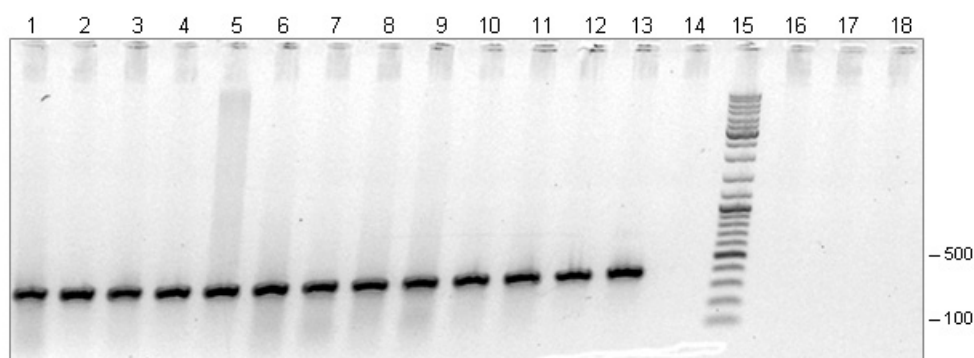


Рис. 2. ПЛР-аналіз на наявність гена *bar* в рослинному матеріалі кукурудзи за допомогою праймерів *bar1f1* та *bar1r2*. Доріжка 1 – ДК959♀×PLS61♂ (к., л. 3); 2 – PLS61♀×ДК959♂ (к., л. 6); 3 – ДК959♀×PLS61♂ (к., л. 1); 4 – PLS61 (р., л. 17); 5 – PLS61♀×ДК744♂ (р., л. 2); 6 – PLS61♀×ПРЖ5♂ (к., л. 1); 7 – PLS61 (р., л. 2); 8 – PLS61 (к., л. 3); 9 – PLS61 (к., л. 7); 10 – PLS61 (р., л. 1); 11 – PLS61♀×ДК304♂ (р., л. 7); 12 – PLS61♀×ДК304♂ (р., л. 6); 13 – позитивний контроль; 14 – без ДНК; 15 – маркер молекулярної маси DNA Ladder Mix; 16 – нетрансформована PLS61, негативний контроль; 17 – PLS61 (р., л. 8-1); 18 – PLS61♀×ДК744♂ (р., л. 3). Довжина очікуваного фрагменту – 411 п.н. Скорочення: к – калюс; р – рослина; л. – лінія

Висновки

В результаті проведених експериментів з біолистичної трансформації вектором рАНС25 були отримані стійкі до фосфінотрицину калюсні лінії і рослини-регенеранти, у яких виявляли активність фермента β-глюкуронідази. Аналіз методом ПЛР показав присутність гена *bar* у рослинній ДНК стійких до фосфінотрицину калюсних ліній та 6 ліній рослин-регенерантів. Наявність гена *bar* у рослинній ДНК свідчить про трансгенну природу одержаного рослинного матеріалу. Серед 21 генотипу кукурудзи, які створені та вирощу-

ються на території України, були відібрані 4 генотипи найбільш компетентні для біолистичної трансформації.

Робота проводилася в рамках науково-технічного проекту «Отримання та вивчення молекулярно-біологічних і генетичних особливостей стійких до гербіцидів сільськогосподарсько важливих культур» цільової комплексної міждисциплінарної програми наукових досліджень НАН України «Фундаментальні основи молекулярних та клітинних біотехнологій» номер держреєстрації 0110U006082.

Література

1. ISAAA Brief 46-2013: Executive Summary. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2013.
2. EU Register of Authorised GMOs [Електронний ресурс] // Regulation EC 1829/2003 – 2014. – Режим доступу: http://ec.europa.eu/food/dyna/gm_register/index_en.cfm
3. Sidorov V.A. Plant tissue culture in biotechnology: recent advances in transformation through somatic embryogenesis // Biochemistry and Biotechnology for Modern Medicine. Edited by S. Komisarenko. – K.: Publishing House Moskalenko O.M., NAS of Ukraine, Kyiv – 2013. – 704 p.
4. Shou H., Frame B., Whitham S., Wang K. Assessment of transgenic maize event produced by particle bombardment or *Agrobacterium*-mediated transformation // Mol. Breed. – 2004. – 13. – P. 201–208.
5. Нітовська І.О., Дуплій В.П., Рудас В.А., Абраїмова О.Є., Сатарова Т.М., Моргун Б.В. Оптимізація умов трансформації калюсних ліній кукурудзи за допомогою детекції транзйентної експресії гена бета-глюкуронідази // Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології: збірник наукових праць ІХ з'їзду УТГіС. – Київ: Логос. – 2012. – 4. – С. 587–592.
6. Christensen A.H., Quail P.H. Ubiquitin promoter-based vectors for high-level expression of selectable and/or screenable marker genes in monocotyledonous plants // Transgenic Research. – 1996. – 5. – P. 213–218.
7. Василенко М.Ю., Кучук М.М., Овчаренко О.О., Кучук М.В. Отримання транспластомних рослин *Nicotiana bethamiana* із генами мікобактерії (*Mycobacterium tuberculosis*) // Фактори експериментальної еволюції організмів. – 2010. – 9. – С. 224–229.
8. Murashige T., Skoog F.A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // Physiol. Plant. – 1962. – 15. – P. 473–497.
9. Jefferson R.A. Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system // Plant Mol. Biol. Rep. – 1987. – 5. – P. 387–405.
10. Генная инженерия растений. Лабораторное руководство / Под ред. Дрейпер Дж. и др. – М.: Мир, 1991. – 408 с.

NITOVSKA I.O.¹, **ABRAIMOVA O.YE.**², **SATAROVA T.M.**², **SHAKHOVSKY A.M.**¹, **MORGUN B.V.**¹

¹ Institute of Cell Biology and Genetics Engineering of Nat. Acad. Sci. of Ukraine, Ukraine, 03680, Kyiv, Akademika Zabolotnogo str., 148, e-mail: molgen@icbge.org.ua

² State Enterprise Institute of Agriculture of Steppe Zone of NAAS of Ukraine, Ukraine, 49600, Dnipropetrovsk, Dzerzhynskij str., 14

BIOLISTIC TRANSFORMATION OF IMMATURE MAIZE EMBRYOS

Aims. Maize (*Zea mays* L.) is one of the most economically important crops which were considerably improved by modern biotechnology. For efficient production of transgenic maize, immature embryos and two transformation techniques for transgenes delivery (*Agrobacterium*-mediated transformation and particle bombardment) were employed. However, genetic transformation is genotype dependent and is not routine procedure. Thus, the aim of the current studies was to carry out the biolistic transformation of immature maize embryos for commercial genotypes propagated in fields, and to prove their competence for genetic transformation. **Methods.** Particle bombardment of immature maize embryos for 21 commercial genotypes using рАНС25 vector was carried out. Histochemical analysis of the phosphinothricin resistant plant material for the presence of β-glucuronidase was performed. Plant DNA was analyzed for the presence of *bar* gene by PCR method. **Results.** Following particle bombardment, phosphinothricin resistant calli and

plant regenerants were obtained. Histochemical analysis showed the presence of β -glucuronidase in the obtained plant material. PCR analysis proved the presence of *bar* gene in plant DNA of the phosphinothricin resistant calli and 6 regenerant lines. Out of 21 maize genotypes, inbred line PLS61 and hybrids F₁ PLS61♀×ДК744♂, PLS61♀×ДК304♂, and ДК959♀×PLS61♂ were the most competent for biolistic transformation. **Conclusions.** After biolistic transformation of immature maize embryos with pAHC25 vector, phosphinothricin resistant calli and plant regenerant lines containing β -glucuronidase have been obtained. The presence of *bar* gene detected by PCR method indicated the transgenic nature of the obtained plant material. Four most responsive for the biolistic transformation genotypes were selected from 21 commercial lines and hybrids grown in Ukraine.

Key words: *Zea mays* L., particle bombardment, β -glucuronidase, *bar* gene, GMO.

УДК 668.52:668.53:61

ПАДАЛКО С.Ф., КАМЕНЧУК О.П., БОБИК Л.В.

Інститут фізіології рослин і генетики НАН України,

Україна, 03022, м. Київ, вул. Васильківська, 31/17, e-mail: kurchii@mail.ru

КОМПОНЕНТНИЙ СКЛАД І БІОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ ЕКСТРАКТІВ ГРИБА *ACREMONIUM SPP.*

Серед нових видів природних субстратів важливе місце займають препарати вермикомпости (біогумуси), які містять гумінові та фульвокислоти, макро- та мікро-елементи і позитивно впливають на ростові процеси сільськогосподарських культур [1]. До того ж макро- і мікро-елементи в біогумусах знаходяться в невеликих кількостях. Цей факт зумовлює недостатню ефективність використання вермикомпосту та перегною на збіднених ґрунтах, тому включення до складу препаратів мікроелементів має суттєво підвищити їх ефективність. Серед недоліків зареєстрованих в Україні препаратів, створених на основі вермикомпосту, можна назвати їх низькі експлуатаційні властивості, пов'язані із значними транспортними витратами та термінами зберігання, обумовленими високими нормами витрат на одиницю площі (12–15 л на 1 га), або маси насіння (15 л на 1 т), що обробляється [2].

Матеріал і методи

Проведено аналіз вмісту біологічно активних речовин в культуральних середовищах гриба *Acremonium spp.* Тест на цитокініни здійснено на сім'ядольних листках 8-денних проростків огірка сорту Ніжинський. Насіння огірка пророщували розділенням сім'ядолей. Сім'ядолі по 10 листків ставили в чашки з досліджуваним розчином на 24 години. Тест на ауксини здійснено на колеоптилях пшениці Альбатрос одеський 1,5 см довжиною, вирізали середину і ставили в розчин на 24 години. Тест на гібереліни проведено на проростках огірків

пророщували, відбирали гіпокотилі довжиною 0,5–1,0 см. По 10 рослин ставили в чашки з досліджуваним розчином в термостат при Т 22 °С на 24 години.

Гриб *Acremonium spp.* вирощували протягом 21 доби при кімнатній температурі в скляних флаконах (матрацах) при 12-ти годинному світловому режимі (4 люмінесцентні лампи по 40 Вт) в рідкому культуральному середовищі наступного складу (мг/л середовища): K₂HPO₄ – 600, KH₂PO₄ – 1800, MgSO₄ – 400, K₂SO₄ – 200, FeSO₄ – 4, MnSO₄ – 4, Asparagin – 0,02, KJ – 0,02, Vitamin B₁ – 1, Vitamin B₆ – 2, Vitamin PP – 2, MES 2260 – 4520, D-inositol – 100, D-glucose – 16, Pectin – 2000, Gibberellic acid – 0,003, KOH, 5M – 3 краплі.

Екстракцію речовин із міцелію гриба (10 г сиріої речовини) проводили трічі 80 %-ним етиловим спиртом і зберігали в холодильнику при 4 °С – (базовий екстракт із міцелію гриба *Acremonium spp.*, БЕА).

Результати та обговорення

Цитокінінову активність екстрактів міцелію гриба *Acremonium spp.*, яку визначили за допомогою тестів на сім'ядольних листках 8-денних проростків огірка сорту Ніжинський, представлено в таблиці 1.

Таким чином, найвищу ефективність проявив нерозведене середовище культивування міцелію гриба.

Проведено аналіз вмісту ауксинів в культуральних середовищах гриба *Acremonium spp.* (табл. 2).

Таблиця 1. Специфічна цитокінінова активність культуральних живильних середовищ гриба-ендофіта роду *Acremonium spp.*

Варіанти	Маса сирі речовини проростків	
	мг	%
Контроль (дистильована вода, д.в.)	0,045 ± 0,008	100
БАП, 10 ⁻⁵ М	0,075 ± 0,012	164,7
Культуральне середовище (нерозведене, перший пасаж)	0,053 ± 0,026	116,2
Культуральне середовище (нерозведене, другий пасаж)	0,062 ± 0,010	137,5
Культуральне середовище (1:10, перший пасаж)	0,057 ± 0,005	126,5
Культуральне середовище (1:10, другий пасаж)	0,064 ± 0,004	141,9
Культуральне середовище (1:50, перший пасаж)	0,051 ± 0,002	112,5
Культуральне середовище (1:50, другий пасаж)	0,050 ± 0,002	109,6
Культуральне середовище (1:100, перший пасаж)	0,065 ± 0,014	142,6
Культуральне середовище (1:100, другий пасаж)	0,053 ± 0,005	116,2
Культуральне середовище (1:150, перший пасаж)	0,043 ± 0,002	95,6
Культуральне середовище (1:150, другий пасаж)	0,043 ± 0,005	94,9
Культуральне середовище (1:200, перший пасаж)	0,045 ± 0,006	99,3
Культуральне середовище (1:200, другий пасаж)	0,036 ± 0,006	79,4

Таблиця 2. Ауксинова активність культуральних рідин гриба *Acremonium spp.*

Варіант	Довжина колеоптилів	
	мм	%
1	2	3
Контроль (д. в.)	9,7 ± 0,27	100
Індолілоцтова кислота, 10 ⁻⁵ М	11,6 ± 0,21	120,2
Культуральне середовище (нерозведене, перший пасаж)	11,4 ± 0,43	117,8
Культуральне середовище (нерозведене, другий пасаж)	10,9 ± 0,33	112,4
Культуральне середовище (1:10, перший пасаж)	10,3 ± 0,26	106,8
Культуральне середовище (1:10, другий пасаж)	9,9 ± 0,15	102,1
Культуральне середовище (1:50, перший пасаж)	9,8 ± 0,22	101,4
Культуральне середовище (1:50, другий пасаж)	9,2 ± 0,28	95
Культуральне середовище (1:100, перший пасаж)	9,3 ± 0,21	96,5
Культуральне середовище (1:100, другий пасаж)	9,7 ± 0,32	99,8
Культуральне середовище (1:150, перший пасаж)	10,2 ± 0,21	105,1
Культуральне середовище (1:150, другий пасаж)	9,6 ± 0,23	99
Культуральне середовище (1:200, перший пасаж)	9,9 ± 0,23	102,5
Культуральне середовище (1:200, другий пасаж)	9,3 ± 0,23	96,2

Проведено аналіз вмісту гіберелінів в культуральних середовищах гриба *Acremonium spp.* Найвищий вміст гіберелінів виявлено в культуральних середовищах другого пасажу (табл. 3).

Досліджено дію екстрактів із гриба *Acremonium* на ріст проростків кукурудзи (табл. 4) і пшениці (табл. 5).

Досліджені препарати проявляли як гальмівну, так стимулюючі дії на розвиток фітопатогенних грибів. При цьому гальмівна дія препаратів зберігалась при розбавленні вихідної

(базової) концентрації до 10⁻⁹ розведення.

Досліджено вплив препаратів на ріст і розвиток грибів *F. graminearum*, *C. sativus* і *Rhizoctonia in vitro* на твердому поживному середовищі (табл. 6).

Елін екстра, комерційний препарат, розчин 2,4-епібрасиноліда (0,025 г/л), гормонального регулятора росту рослин, здатний підвищувати стійкість рослин до хвороб та несприятливих факторів навколишнього середовища [3].

Таблиця 3. Гіберелінова активність культурального середовища гриба *Acremonium spp.*

Варіант	Довжина колеоптилів	
	мм	%
Контроль (д. в.)	32,5 ± 0,77	100
Гіберелова кислота (ГК ₃), 50 мкг/мл	36,4 ± 1,17	111,8
Культуральне середовище (нерозведене, перший пасаж)	31,8 ± 1,16	97,8
Культуральне середовище (нерозведене, другий пасаж)	32,6 ± 1,21	100,2
Культуральне середовище (1:10, перший пасаж)	34,5 ± 1,35	106,2
Культуральне середовище (1:10, другий пасаж)	39,5 ± 1,31	121,5
Культуральне середовище (1:50, перший пасаж)	31,3 ± 1,42	96,2
Культуральне середовище (1:50, другий пасаж)	49,9 ± 1,52	153,4
Культуральне середовище (1:100, перший пасаж)	34,4 ± 1,17	105,8
Культуральне середовище (1:100, другий пасаж)	29,9 ± 1,13	92,0
Культуральне середовище (1:150, перший пасаж)	32,0 ± 1,11	98,5
Культуральне середовище (1:150, другий пасаж)	28,7 ± 0,86	88,3
Культуральне середовище (1:200, перший пасаж)	25,2 ± 0,99	77,5
Культуральне середовище (1:200, другий пасаж)	35,0 ± 1,47	107,7

Таблиця 4. Вплив препаратів на ріст проростків кукурудзи сорту Росава (в варіанті 50 насінин)

Варіант	К-ть пророслого насіння, шт	Вага 1 проростка, г	Вага 1 проростка, %	Вага 1 кореня, г	Вага 1 кореня, %
Контроль (д. в.)	40 ± 4	0,2945 ± 0,01	100	0,2256 ± 0,01	100
Акремоніум, 10 ⁻⁸	47 ± 3	0,3185 ± 0,01	97,8	0,2799 ± 0,01	94,8
Акремоніум, 10 ⁻⁹	48 ± 2	0,3545 ± 0,01	108,8	0,3445 ± 0,01	116,7

Таблиця 5. Вплив препаратів на ріст проростків пшениці сорту Альбатрос одеський (в варіанті 100 насінин)

Варіант	К-ть пророслого насіння, шт	Вага 1 проростка, г	Вага 1 проростка, %	Вага 1 кореня, г	Вага 1 кореня, %
Контроль (д. в.)	88 ± 3,1	0,0529 ± 0,01	100	0,0559 ± 0,01	100
Акремоніум, 10 ⁻⁸	84 ± 2,4	0,0605 ± 0,01	114,3	0,0666 ± 0,01	119,2
Акремоніум, 10 ⁻⁹	84 ± 3,6	0,0627 ± 0,01	118,4	0,0638 ± 0,01	114,3

Таблиця 6. Вплив препаратів на розвиток грибів *Fusarium graminearum*, *Coeliobolus sativus* і *Rhizoctonia spp.*

Варіанти	<i>Fusarium graminearum</i>		<i>Coeliobolus sativus</i>		<i>Rhizoctonia spp.</i>	
	Діаметр колонії, мм	%	Діаметр колонії, мм	%	Діаметр колонії, мм	%
Контроль (поживне середовище)	90 ± 3,3	100	38 ± 1,3	100	22 ± 1,1	100
Поживне середовище +Акремоніум, 10 ⁻⁸	84 ± 2,4	93	35 ± 1,1	91	20 ± 2,2	93
Поживне середовище +Акремоніум, 10 ⁻⁹	75 ± 2,6	83	36 ± 2,1	93	13,7 ± 0,9	62
Епін-екстра, 10 ⁻⁸	90 ± 4,4	100	34 ± 1,7	89	13 ± 2,3	59
Епін-екстра, 10 ⁻⁹	90 ± 4,7	100	38 ± 1,9	98	23 ± 2,4	105

Отримані дані свідчать, що речовини, синтезовані грибом *Acremonium*, є токсичними для грибів *Fusarium graminearum*, *Coeliobolus*

sativus, *Rhizoctonia spp.* Найвищі концентрації речовин в екстрактах представлені природними регуляторами росту рослин. Нами зроблено

висновок, що можливо ці речовини являються токсичними для досліджуваних грибів. При дослідженні дії екстрактів на розвиток борошнистої роси на рослинах озимої пшениці встановлено значне зниження розвитку фітопатогенна (табл. 7).

Досліджено дію екстракту з гриба

Acremonium на стійкість озимої пшениці сорту Київська 8 до фузаріозу та гельмінтоспоріозу (визначення проводили на 20-у добу від закладки досліду) (табл. 8). Отримані дані свідчать про відсутність інгібіторної дії препарату на ріст і розвиток рослин.

Таблиця 7. Вплив препаратів на розвиток борошнистої роси (*Blumeria graminis f. sp. tritici*) на 30-денних рослинах пшениці с. Подолянка в лабораторних умовах

Варіанти	Ступінь розвитку борошнистої роси, % ураженої поверхні
Контроль (обробка д. в.)	45,1 ± 3,94
Екстракт з <i>Acremonium spp</i> , 10 ⁻⁸	33,3 ± 2,64

Таблиця 8. Вплив екстракту із гриба *Acremonium* на стійкість озимої пшениці сорту Київська 8 до фузаріозу та гельмінтоспоріозу

Варіанти	Без зараження		Інокуляція <i>F. graminearum</i>		Інокуляція <i>C. sativus</i>	
	Маса сирі речовини 1 проростка, г	Маса сирі речовини 1 кореневої системи, г	Маса сирі речовини 1 проростка, г	Маса сирі речовини 1 кореневої системи, г	Маса сирі речовини 1 проростка	Маса сирі речовини 1 кореневої системи, г
Контроль (д. в.)	0,110	0,044	0,054	0,022	0,119	0,030
<i>Acremonium</i> , 10 ⁻⁸	0,132	0,051	0,037	0,018	0,0124	0,039
<i>Acremonium</i> , 10 ⁻⁹	0,146	0,064	0,066	0,025	0,0111	0,045
НІР _{0,05}	0,008	0,005	0,009	0,001	0,007	0,002

Висновки

Вперше в літературі встановлено, що гриби роду *Acremonium spp.* продукують природні регулятори росту ауксин, гіберелін і цитокінін. Екстракти речовин із міцелію гриба

проявляли стимулюючу дію на рослини пшениці і кукурудзи, а також інгібіторну на фітопатогенні гриби *Fusarium graminearum*, *Cochliobolus sativus* і *Rhizoctonia spp.*

Література

1. Турецкая Р.Х. Физиология корнеобразования у черенков и стимуляторы роста. – М.: АН СССР. – 1961. – 278 с.
2. Тутельян В.А., Кравченко Л.В. Микотоксины (Медицинские и биологические аспекты). – М.: Медицина, 1985. – 320 с.
3. Яворська В.К. та ін. Регулятори росту на основі природної сировини та їх застосування в рослинництві. – К.: Логос, 2006. – 176 с.

PADALKO S.F., KAMENCHUK O.P., BOBYK L.V.

Institute of Plant Physiology and Genetics of NAS of Ukraine, Ukraine, 03022, Kiev, Vasylkivska str., 31/17, e-mail: kurchii@mail.ru

COMPONENT COMPOSITION AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF EXTRACTS FROM *ACREMONIUM SSP.* FUNGI

Aims. The aim of this research was to study the substances produced by fungus *Acremonium* and their biological activity. **Methods.** This study was performed using culture cells of fungi and the tests intended to detect the nature of substances extracted from fungi. **Results.** It is detected the composition and biological

activity of extracts from *Acremonium* fungi. In extracts was found natural growth regulators cytokinins, auxines and gibberellins. The received extracts showed antifungal activity against fungi *Fusarium graminearum*, *Coeliobolus sativus* i *Rhizoctonia spp.* and stimulatory activity for wheat and corn plants. **Conclusions.** For the first time it is found that *Acremonium* fungi produce the natural plant growth regulators auxins, gibberellins and cytokinins. The extracts obtained from *Acremonium* fungi were individually estimated against some phytopathogenes.

Key words: *Acremonium*, *Fusarium graminearum*, *Coeliobolus sativus*, *Rhizoctonia spp.*, biological activity.

УДК 616.5:616-089.843

ПАПУГА А.Е.¹, САМЧЕНКО Ю.М.², УЛЬБЕРГ З.Р.², РУБАН Т.А.¹, КОЗИНЕЦ Г.П.³, ЛУКАШ Л.Л.¹

¹ *Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины,*

Украина, 03680, г. Киев, ул. Акад. Заболотного, 150, e-mail: alexander.papuga@gmail.com

² *Институт биокolloидной химии им. Ф.Д. Овчаренко НАН Украины,*

Украина, 03142, г. Киев, бульв. Акад. Вернадского, 42

³ *Центр термических поражений и пластической хирургии Киевской городской клинической больницы № 2,*

Украина, 02094, г. Киев, ул. Краковская, 13

ИСКУССТВЕННЫЙ ЭКВИВАЛЕНТ КОЖИ НА ОСНОВЕ АКРИЛОВЫХ ГИДРОГЕЛЕЙ С ИММОБИЛИЗОВАННЫМИ НАНОЧАСТИЦАМИ СЕРЕБРА И КЛЕТКАМИ ЧЕЛОВЕКА

По данным ВОЗ ожоги в мире занимают третье место среди травм разного генеза, и число потерпевших в последнее время растёт, особенно в промышленно развитых регионах. Наблюдается тенденция относительного возрастания числа тяжёлых ожоговых повреждений. Общая летальность при этом составляет 8–10%. В Украине, где достаточно развита металлургическая, угледобывающая и химическая промышленность, проблема ожоговых повреждений весьма актуальна. Ежегодно в Украине требуется стационарное лечение ожоговой болезни для 20000 взрослых и 10000 детей.

При лечении глубоких массивных ожогов требуется хирургическое вмешательство, включающее аутотрансплантации кожи. Однако, если поверхность раны превышает 30–40% поверхности тела, дефицит донорских ресурсов заставляет прибегать к использованию биотехнологических раневых покрытий (временных или постоянных), которые предотвращают проникновение микроорганизмов, потерю влаги, впитывают экссудат, выделяемый раневой поверхностью и могут содержать различные лекарственные препараты, способствующие процессу регенерации тканей и/или снижению болевых ощущений [1].

Мы сосредоточили своё внимание на создании эквивалентов дермального слоя кожи,

поскольку в процессе хирургического лечения тяжёлых ожоговых ран наиболее актуальным является быстрое закрытие раневых поверхностей и восстановление слоя дермы с целью обеспечения эффективного приживания аутотрансплантатов.

В Украине зарубежные биотехнологические эквиваленты кожи практически не используются, поскольку они являются слишком дорогими и поэтому недоступны для большинства пациентов. На базе ИМБГ НАНУ с 2001 года проводятся исследования по разработке дермальных эквивалентов кожи, имеющих в своём составе стволовые клетки человека. Эти биоконструкции способны действовать как временные биологически активные покрытия для раны, обеспечивающие компоненты экстрацеллюлярного матрикса, цитокины и факторы роста [2, 3]. Благодаря этому стимулируется миграция клеток организма-реципиента в область раны, их пролиферация, регенерация дермального слоя и реэпителизация раны, «кондиционирование» ложа раны для использования кожных трансплантатов. Благодаря этому по сравнению с бесклеточными биоактивными раневыми покрытиями снижается время заживания раны и ингибируется шрамообразование [4].

В качестве носителей клеток (scaffolds) используются разнообразные материалы как синтетического, так и естественного

происхождения. Целью нашей работы является создание новых усовершенствованных биоконструкций «биоматрикс + клетки» с использованием искусственных и природных органических материалов разного типа и клеток человека.

Материалы и методы

Ранее нами были синтезированы и апробированы гидрогелевые покрытия на основе сшитого сополимера акриламида и акрилонитрила, имеющие определённый гидрофильно-гидрофобный баланс и полученные посредством радикальной сополимеризации [5, 6]. Данные гидрогели не являются цитотоксичными для клеток, через сутки после посева клеток на соответствующие гидрогелевые подложки наблюдалось прикрепление и распластывание клеток на поверхности с последующим размножением до образования монослоя [7]. Указанные гидрогелевые покрытия хорошо зарекомендовали себя в медицинской практике при лечении глубоких и массивных ожогов. В данной работе в состав указанных гидрогелей были дополнительно введены наночастицы или ионы металлов. В качестве клеточного компонента использовались: а) стволовые клетки человека линии 4BL; б) первичные фибробласты кожи человека.

В данной работе мы проводили исследования с включением в состав гидрогелей наночастиц серебра или ионов цинка и марганца. Изучались иммобилизация, адгезия и пролиферация клеток в зависимости от введения в состав гидрогелей наночастиц или ионов металлов.

Результаты и обсуждение

Эксперименты *in vitro* показали, что синтезированные сополимерные гидрогели нетоксичны для клеток, являются прочными, эластичными и прозрачными, их пористость обеспечивает способность абсорбировать излишний тканевый экссудат. Кроме того, весьма важным свойством сополимерных гидрогелей на основе акриловых мономеров является их способность к иммобилизации различных биологически активных веществ. Включение в состав гидрогелей наночастиц серебра, ионов цинка и марганца призвано

способствовать пролиферации клеток в составе биоконструкций, а также стимулировать естественные регенеративные процессы в повреждённых тканях ожоговых ран.

Наиболее детально было изучено влияние наночастиц серебра, адсорбированного на силикагеле или в виде коллоидных частиц на клетки человека 4BL (рис. 1). Показано, что введение комплекса серебра и силикагеля приводило к стимуляции размножения клеток на поверхности гидрогелевой мембраны, при этом наиболее эффективной была концентрация серебра 100 мкг/г массы сухого вещества. Дальнейшее увеличение концентрации серебра приводило к снижению количества выросших клеток. Более эффективным в отношении стимуляции пролиферации клеток линии 4BL оказалось коллоидное серебро, статистически достоверный эффект увеличения числа клеток зарегистрирован при концентрации серебра 25 мкг/г массы сухого вещества.

При концентрации серебра 25 мкг/г (рис. 2, Б) уже на 3-й день культивирования отмечено формирование конфлюэнтного клеточного монослоя на поверхности гидрогеля в отличие от контроля, где наблюдались лишь островки делящихся клеток (рис. 2, А). Увеличение концентрации коллоидного серебра до 250 мкг/г приводило к формированию клеточных агрегатов и, возможно, цитотоксическому эффекту (рис. 2, В).

По предварительным данным обнаружена тенденция стимуляции пролиферации клеток под влиянием ионов цинка и марганца при концентрациях 0,5 и 0,9 мкг/г соответственно.

Выводы

Наиболее значительный эффект стимуляции пролиферации клеток зарегистрирован при введении коллоидного серебра с концентрацией 25 мкг/г в состав умеренно гидрофобного и, в то же время, достаточно гидрофильного гидрогеля на основе сополимера акриламида и акрилонитрила. Наночастицы серебра, адсорбированные на поверхности силикагеля, оказались менее эффективными и вызывали стимуляцию пролиферации при использовании значительно большей концентрации 100 мкг/г массы сухого вещества.

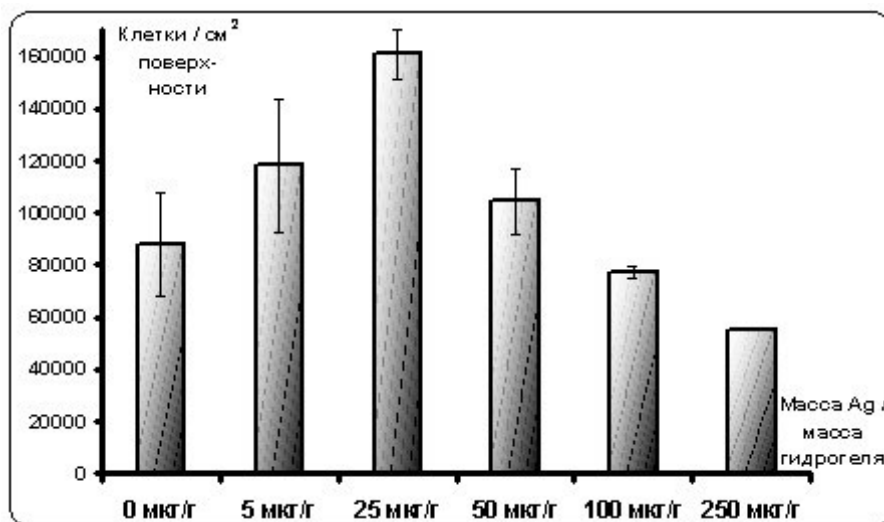


Рис 1. Влияние наночастиц металлического коллоидного серебра в составе полиакриламидного гидрогеля на пролиферацию культивируемых клеток 4BL

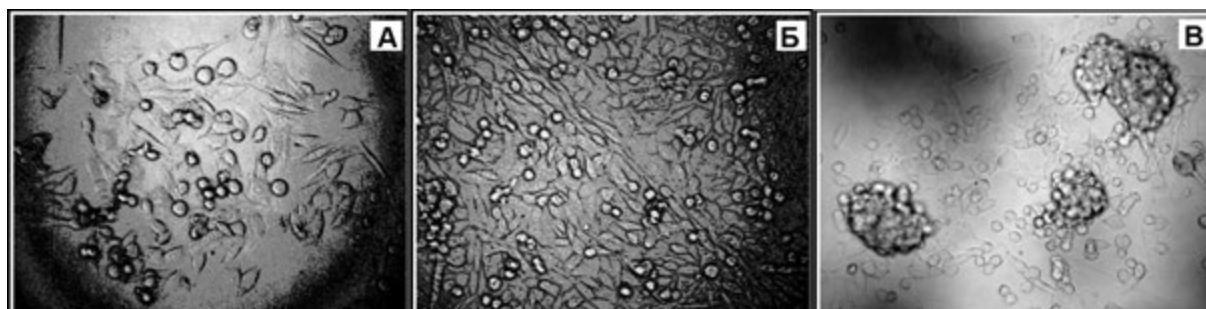


Рис.2. Общий вид клеток 4BL на 3-й день культивирования на поверхности сополимерного гидрогеля на основе акриламида и акрилонитрила, содержащего наночастицы металлического коллоидного серебра

Литература

1. Gynter C.I., Machens H.G. New strategies in clinical care of skin wound healing // *Eur Surg Res.* – 2012. – 49, N 1. – P. 16–23.
2. Eaglstein W.H., Falanga V. Tissue engineering for skin: an update // *J. Am. Acad. Dermatol.* – 1998. – 39, N 6. – P. 1007–1010.
3. Ehrenreich M., Ruszczak Z. Update on tissue-engineered biological dressings // *Tissue Eng.* 2006. – 12, N 9. – P. 2407–2424.
4. Still J., Glat P., Silverstein P., Griswold J., Mozingo D. The use of a collagen sponge/living cell composite material to treat donor sites in burn patients // *Burns.* – 2003. – 29, N 8. – P. 837–841.
5. Косенко О.О., Лукаш Л.Л., Самченко Ю.М., Рубан Т.А., Ульберг З.Р., Лукаш С.И. Кополімерні гідрогелеві мембрани для іммобілізації і культивування стовбурових клітин людини // *Biopolymers and cell.* – 2006. – 22, № 2. – С. 143–148.
6. Самченко Ю.М., Лукаш Л.Л., Косенко О.О., Ульберг З.Р., Рубан Т.А., Козинець Г.П. Біосумісний гідрогель біомедичного призначення та спосіб його одержання. Патент України на винахід № а2006 07473 від 10.01.08. Бюл. № 1.
7. Косенко О.О., Лукаш Л.Л., Самченко Ю.М., Рубан Т.А., Лукаш С.І., Ульберг З.Р., Галаган Н.П. Штучний еквівалент шкіри на основі кополімерних гідрогелевих мембран з іммобілізованими мезенхімальними стовбуровими клітинами людини // *Biopolymers and cell.* – 2006. – 22, № 6. – С. 446–451.

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 ARTIFICIAL 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 вибірконим 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 індукуює 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 Fgъhe Liebe (QFL) і Fgъhe Liebe (FL). 3. Цитоплазматичний гібрид культурного томата *L. esculentum* (+ *L. peruvianum* var. *dentatum*) клону 1С, який володіє ядром *L. esculentum* Mill. сорту Fgъhe Liebe, пластидами *L. peruvianum* var. *dentatum* лінії 3767 та гібридними мітохондріями. Цибридним рослинам притаманні морфологія культурного томата, а також ряд аномальних фенотипічних ознак плазмон-геномною несумісності [11]. 4. Цибрид перуанського томата *L. peruvianum* var. *dentatum* (+ *L. esculentum*) клону В1А, який володіє ядром *L. peruvianum* var. *dentatum* лінії 3767, пластидами *L. esculentum* сорту Quedlinburger Fgъhe Liebe та гібридними мітохондріями. Цибридним рослинам притаманні морфологія перуанського томата без будь-яких фенотипічних ознак плазмон-геномною несумісності [12]. 5. Цибриди перуанського томата *L. peruvianum* var. *dentatum* (+ *L. esculentum* (+ *L. peruvianum* var. *dentatum*)) клонів К1С, К1S, L50 і L1Н, 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 МС/2 [15] (Duchefa, the Netherlands), яке містило в двічі зменшену концентрацію вітамінів, мікро- і макросолей, 20 г/л сахарози та 7 г/л агару (рН 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 В1А 1-го порядку 20-денного віку для спонтанного укорінення). Для спонтанного ризогенезу використовували середовище МС/2 без фітогормонів, тоді як для індукованого ризогенезу додавали 0,15 мг/л 1-нафтилоцтової кислоти. В усіх експериментах дотримувались таких критеріїв ідентичності: умов вирощування (фотоперіод, освітлення, температура); розміру посуду (200 мл); об'єму поживного середовища МС/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-Уїлка [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 кожному з трьох 0,2 л банок з 20 мл середовища МС/2 висаджували по 8 пагонів однієї вікової категорії відповідно 1-го, 2-го і 3-го порядку. Враховуючи наявність 9 генотипів, три вікових категорії пагонів та їх тестування за відсутності/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 укорінватись, 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 поодинокі, тоді як при спонтанному ризогенезі спостерігається зворотна тенденція: за 2 винятками поодинокі 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 відзначається, 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 пластоми *L. peruvianum* var. *dentatum* і ядерного геному *L. esculentum*. Для цибриду перуанського томата клону В1А 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.

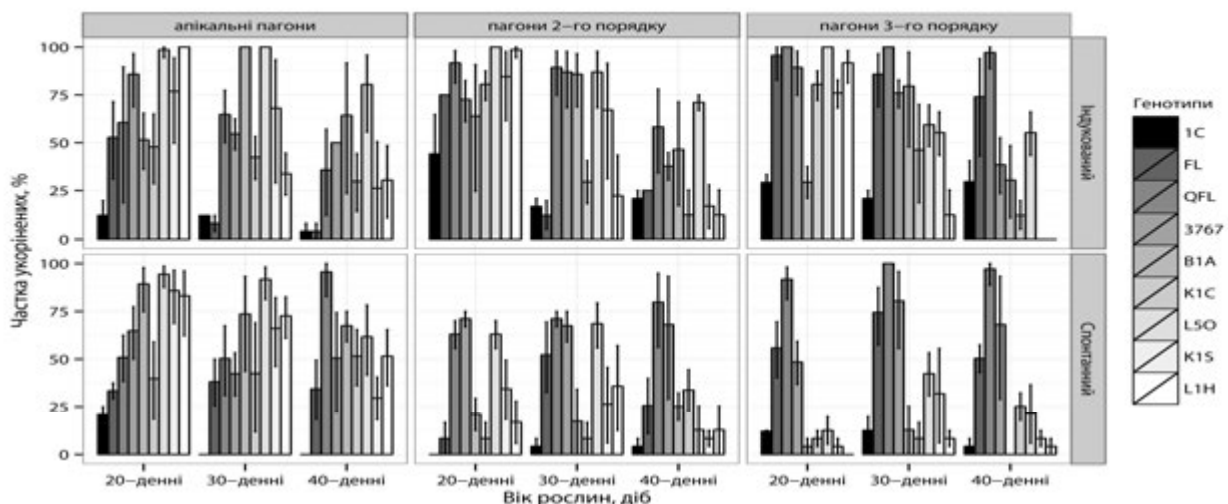


Рис. 1. Ефективність укорінення на 6-й день культивування пагонів *Lycopersicon esculentum* (сортів QFL і FL), *L. peruvianum* var. *dentatum* (лінія 3767), реципрокних цибридів культурного та перуанського томатів (клонів 1С і В1А, відповідно) та цибридів перуанського томата зі зворотно перенесеними хлоропластами (клони К1С, L50, К1S і L1Н), що відрізнялись за віком, порядком та типом ризогенезу

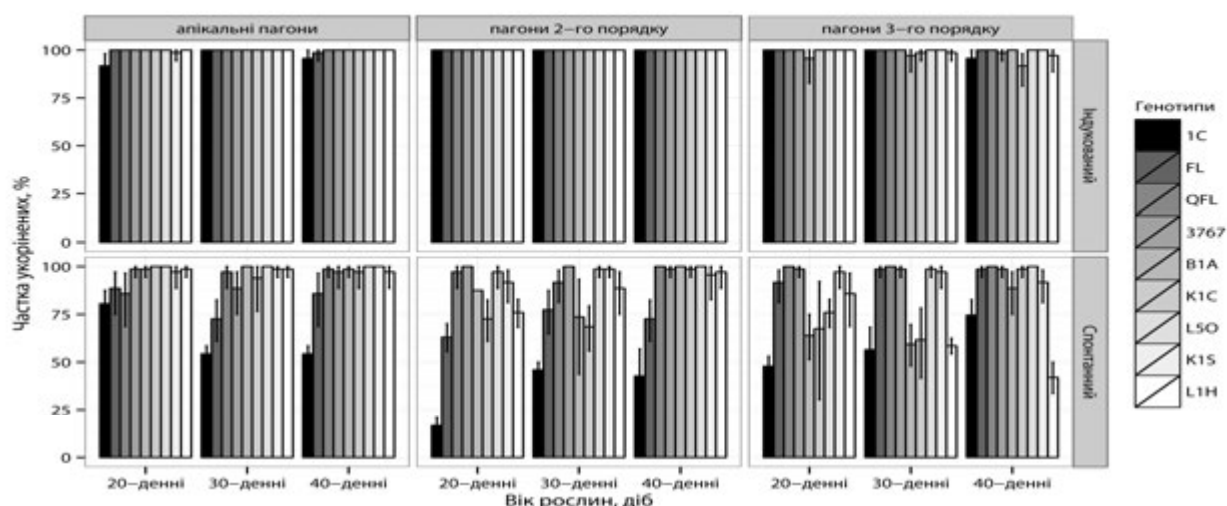


Рис. 2. Ефективність укорієння на 12-й день культивування пагонів *Lycopersicon esculentum* (сортів QFL і FL), *L. peruvianum* var. *dentatum* (лінія 3767), реципрокних цибридів культурного та перуанського томатів (клонів 1C і B1A, відповідно) та цибридів перуанського томата зі зворотно перенесеними хлоропластами (клони K1C, L50, 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.; Mallaiiah 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., Sand-Ahmed H., Morcillo F., Borgel A., Sanj 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. Millón-Orozco L., Corredoira E., del Carmen San José 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. Ivo 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., Kornyejev 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 incapable 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/loxP 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

належать гени стійкості до антибіотиків та гербіцидів [3, 4]. Використання таких генів дозволяє проводити селекційний відбір трансформованих клітин чи тканин на етапі регенерації. Однак, під час подальшого практичного використання ГМ рослин виникає загроза потрапляння СМГ від трансформантів до дикоростучих родичів, що може спричинити виникнення нащадків з небажаними ознаками. Існують також застереження щодо можливості горизонтального перенесення генів. Тому розроблення генетично інженерних методів, за допомогою яких гарантовано можна уникнути такого розвитку подій, дозволило б вирішити ряд проблем, пов'язаних з комерціалізацією ГМ рослин [5].

На сьогоднішній день технологія сайт-специфічних рекомбіназних систем, яка є перспективною у цьому відношенні, набуває все більш широкого застосування [6]. Сайт-специфічна рекомбінація відбувається в районі специфічної послідовності чи сайту розпізнавання. Це призводить до розщеплення або з'єднання цільових послідовностей в результаті інтеграції, делеції чи інверсії фрагментів ДНК без набуття або втрати нуклеотидів. Найбільш відомими рекомбіназними системами, що використовуються для елімінації маркерних генів, є сайт-специфічна рекомбіназна система Cre-loxP, виділена з бактеріофагу P1 [7]. Рекомбіназа Cre належить до родини тирозинових інтеграз, а сама система складається з двох коротких послідовностей ДНК: lox (locus of crossing-over) та гену cre [4].

У ряді робіт описано використання сайт-специфічної рекомбіназної системи Cre-loxP під контролем тканинспецифічних промоторів та промоторних послідовностей, виділених з генів теплового шоку. Так, для регуляції роботи системи Cre-loxP використовуються промотор, ідентифікований в зародкових тканинах [8], або індукційний промотор до гену теплового шоку HSP81-1 [9]. Недоліком використання таких послідовностей є необхідність створення специфічних умов для проведення трансформації, або ж залучення додаткових агентів для ініціації експресії рекомбінази. Тому для отримання генетично модифікованих рослин, вільних від СМГ, нами було розроблено новий підхід до використання сайт-специфічної рекомбіназної системи Cre-loxP [10]. Цей підхід характеризується тим, що маркерні гени та цільова послідовність в трансформуючій конструкції знаходяться під контролем -46 мінімального 35S промотору (перші 46 п.н. від

загальної послідовності промотору 35S) з вірусу мозаїки кольорової капусти (CaMV). Використання відповідної ДНК-конструкції в даному випадку передбачає швидку та ефективну трансформацію рослини, а під час трансформації рослинного матеріалу та періоду селекції відпадає необхідність застосування додаткових агентів чи створення специфічних умов зовнішнього середовища. Метою нашої роботи було дослідження ефективності трансформації рослин *Arabidopsis thaliana* за допомогою нового підходу у використанні сайт-специфічної рекомбінази Cre-loxP.

Матеріали і методи

Як рослинний матеріал використовували дикий тип *Arabidopsis thaliana* екотипу Columbia. Для одночасного проростання насіння інкубували в темряві при температурі 4 °C протягом двох діб, після чого висаджували в ґрунт та вирощували за тепличних умов. Для трансформації рослин використовували метод квіткового занурення в агробактеріальну суспензію [11]. За декілька днів до трансформації в рослин видаляли первинні суцвіття для стимуляції розвитку вторинних.

Для трансформації рослин було сконструйовано декілька типів ДНК-конструкцій з метою визначення більш ефективний варіант конструкції. За допомогою методу електропорації плазмідами [12] pORE-lox1HGC та pORE-lox2HGC трансформували бактерії *Agrobacterium tumefaciens* (штам GV3101). Обидві конструкції мають однаковий набір генів. Різниця полягає в їх розташуванні на касеті. ДНК-конструкції містять такі послідовності, як ген рекомбінази cre, репортерний ген gus, ген стійкості до гігроміцину nptII. Послідовності обмежені сайтами ексцизи loxP і знаходяться під контролем 35S промотору та термінуючої послідовності нопалін-синтази (nos). Ген hptII в обох конструкціях винесений за межі сайтів loxP і у випадку здійснення події ексцизи залишається в геномі рослини (рис. 1).

Суспензію *A. tumefaciens* нарощували в рідкому середовищі Лурія-Бертані [13] у присутності гігроміцину (100 мг/л) впродовж 48 год при 28 °C на орбітальному шейкері (180 об/хв). Культуру бактерій осаджували при 4000 об/хв. протягом 5 хв та суспендували в розчині солей Мурасіге та Скуг («Sigma», США), 5 % сахарози, MES («Sigma», США) та манітолу («Sigma», США). Щільність суспензії при оптичній густині 600 нм становила 0,8. Інокуляцію здійснювали шляхом занурення

квіткових бруньок та квіток у бактеріальну суспензію на 1–2 хв. Рослини інкубували 12 год у темряві за умов підвищеної вологості.

Для проведення ПЛР аналізу геному ДНК виділяли за методом [14]. Рослинний матеріал гомогенізували в екстракційному буфері (200 мМ Tris-HCl pH 7,5, 250 мМ NaCl, 25 мМ ЕДТА, 0,5 % ДДС натрію). Після осадження бруду супернатант преципітували ізопропанолом та відмивали в 70 % спирті. Сухий залишок ресуспендували у 50 мкл дистильованої води. Чистоту виділеної ДНК визначали за допомогою електрофорезу в 0,8 % агарозному гелі з флуоресцентним барвником бромистим етидієм (5 мкг/мл). До ПЛР-суміші об'ємом 25 мкл додавали 2 мкл розчиненої ДНК, 10 мкМ праймерів в об'ємі 0,5 мкл, 250 мкМ суміші dNTP, десятикратного розчину буферу ПЛР («Sigma», США), 250 мМ MgCl₂ та 0,3 мкл Таq-полімерази («Sigma», США). Для реакції використовували праймери: hptIIF2 (віджиг до 3'-кінця гену *hptII*) і 35StermRevAvrII (олігопослідовність, комплементарна 3'-кінцю 35S промотора). Розмір продуктів ампліфікації 300 п.н. Наявність продуктів ампліфікації за даною парою праймерів свідчить про присутність Т-ДНК в геномі. Видалення ділянок ДНК, обмежених сайтами ексцизиї за допомогою рекомбінази Cre визначали, використовуючи іншу пару праймерів в аналогічній суміші ПЛР. Були використані наступні праймери: rP1-vecprobe1 (послідовність комплементарна до векторної послідовності rORE) та rP1-vecprobe2. Розмір продуктів ампліфікації 1800 п.н. Реакції проводили за умов: початкова денатурація при 94 °С 2 хв; ампліфікація – 30 циклів (92 °С – 30 с, 60– 30 с, 72 °С – 90 с),

кінцева елонгація – 72 °С 5 хв. Продукти ампліфікації розділяли за допомогою електрофорезу в 2 %-ному агарозному гелі з додаванням бромистого етидію.

Результати та обговорення

Оскільки метою проведеної роботи була розробка ефективної системи трансформації рослин *A. thaliana* за допомогою використання сайт-специфічної рекомбінази Cre/loxP, на першому етапі роботи були розроблені відповідні ДНК-конструкції. В ряді робіт описано використання сайт-специфічної рекомбіназної системи Cre/loxP під контролем тканиноспецифічних промоторів та промоторних послідовностей, ідентифікованих в складі генів теплового шоку. Так, для регуляції роботи системи Cre/loxP використовують промотор, ідентифікований в зародкових тканинах [8], або індукбельний промотор до гену теплового шоку HSP81-1 [9]. Недоліком використання таких послідовностей є необхідність створення специфічних умов для проведення трансформації, або ж залучення додаткових агентів для ініціації експресії рекомбінази. Тому застосування промотору 35S дозволяє спростити використання запропонованих конструкцій. В той же час, послідовності 35S промотору та pos-термінатора є гарною регулюючою системою для контролю експресії Т-ДНК в рослинному геномі.

Для визначення ефективності використання сконструйованих векторів була здійснена трансформація рослин арабідопсису методом квіткового занурення. Стабільність трансформації вбудованих Т-ДНК визначали за експресією генів *gus* та *cre*.

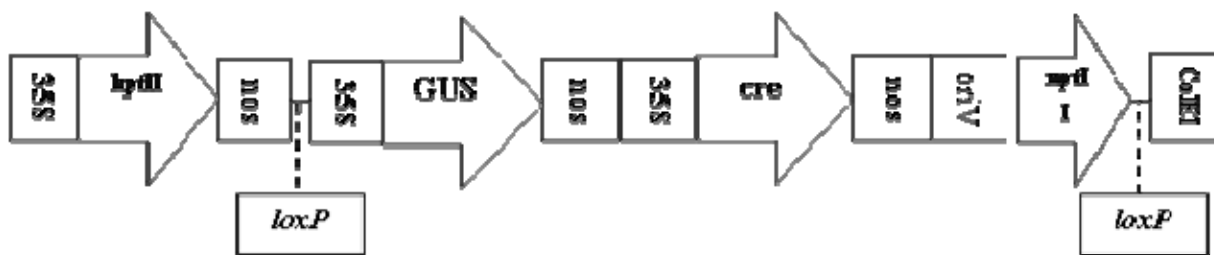


Рис. 1. Схема Т-ДНК конструкції rORE-lox2HGC. 35S-промотор з вірусу мозаїки кольорової капусти, *hptII* – ген стійкості до гігроміцину, *nos* – нопаліновий термінатор, *gus* – ген глюкуронідази, *cre* – ген рекомбінази, *oriV* – сайт початку ініціації реплікації, *nptII* – ген неоміцинфосфотрансферази, ColEI – послідовність, що відповідає за реплікацію плазмід в клітинах бактерії *E. coli*

Окрім цього, завдяки винесеному за межі сайтів ексцизиї селективному гену *hptII* можна було здійснюватися скринінг трансформованих тканин. Було виявлено високу частоту подій трансформації для кожної конструкції. Функціонування Т-ДНК в геномі визначали шляхом проведення гістохімічного аналізу на наявність GUS-активності. В результаті експерименту встановлено, що використання 35S промотору забезпечує стійку експресію гена *gus*. При трансформації за допомогою конструкції pORE-lox1HGC забарвлення за GUS-тестом відмічалось у 78 % трансгенних рослин. Після трансформації pORE-lox2HGC кількість забарвлених за GUS трансформованих рослин становила 85 % від загальної кількості досліджуваних зразків. Отже, використання конструкцій під контролем 35S промотору дає змогу отримати стабільну експресію Т-ДНК в рослинах арабідопсису.

У результаті аналізу ефективності проростання насіння на селективному середовищі (рис. 2) було встановлено, що стабільність трансформації за допомогою обох типів векторних конструкцій (pORE-lox1HGC та pORE-lox2HGC) є високою. Отримані результати свідчать про стабільну експресію кожної з векторних конструкцій в трансформантах. За результатами подальшого аналізу трансформантів за допомогою GUS-тесту трансгенних ліній арабідопсису результати були поділені на три групи: а) лінії, з позитивним результатом GUS-тесту (рослини забарвлювались повністю); б) лінії, в яких були присутні проростки з позитивним і негативним результатом GUS-тесту; в) лінії з негативним результатом GUS-тесту. Відмічено, що в лініях з позитивним результатом GUS-тесту досить велика кількість зразків була забарвлена лише частково (неоднорідне забарвлення тканин або окремих частин рослини), що вказує на виникнення химерності (рис. 3). Неоднорідне забарвлення рослинних тканин свідчить про видалення маркерних послідовностей з геном *gus* не з усього організму, а лише локально. За результатами GUS-тесту з'ясували, що приблизно 25 % досліджуваних ліній, трансформованих ДНК конструкцією pORE-lox1HGC є вільними від маркерних послідовностей, а у 12 % ліній були виявлені як GUS-позитивні, так і GUS-негативні зразки. У лініях, трансформованих ДНК-конструкцією pORE-lox2HGC, відбулась автоексцизія в 15 % від загальної кількості протестованих ліній. Кількість ліній з GUS-позитивними та GUS-негативними рослинами становила 13 %.



Рис. 2. Схожість трансформантів *A. thaliana* на селективному середовищі МС з антибіотиком гігроміцином на 10 день культивування



Рис. 3. Експресія гена *gus* у трансформованих рослинах *A. thaliana* (химерне забарвлення тканини)

Висновки

У результаті проведеної роботи, продемонстровано ефективне застосування нового підходу з використанням сайт-специфічної рекомбіназної системи *Cre/loxP* для отримання трансгенних ліній рослин, вільних від маркерних послідовностей та досягнення стабільності експресії Т-ДНК в наступному поколінні трансформантів. За допомогою проведеного гістохімічного аналізу трансформантів відзначена стабільна експресія Т-ДНК в рослинному геномі для обох типів конструкцій. Разом з тим, у деяких трансформантів з позитивним результатом GUS-тесту експресія гена *gus* спостерігалась нерівномірно у різних тканинах рослин, що свідчить про їх химерність (неоднорідне забарвлення тканин). Таким чином можна

вважати, що в наступних поколіннях ліній з химерними зразками сайт-специфічне видалення маркерних послідовностей відбудеться до кінця. Окрім цього вважається, що кількість трансформованих рослин, вільних від маркерних послідовностей, підвищуватиметься з кожним наступним поколінням. Оскільки методика отримання трансформантів з

використанням сайт-специфічної рекомбіназної системи Cre/loxP є простою та не вимагає проходження додаткових етапів для активації роботи рекомбінази. Такий підхід можна ефективно застосовувати для отримання генетично модифікованих рослин, вільних від маркерних послідовностей.

Література

1. Tuteja N., Verma S., Sahoo R.K., Raveendar S., Reddy L.B. Recent advances in development of marker-free transgenic plants: Regulation and biosafety concern // *J. Biosci.* 37. – 2012. – 1. – P. 167–197.
2. Rosellini D. Selectable markers and reporter genes: A well furnished toolbox for plant science and genetic engineering // *Crit. Rev. in Pla.* – 2012. – 31, N 5. – P. 401–453.
3. Yemets A.I., Baird W.V., Blume Ya.B. Modified tubulin genes as selectable markers for plant transformation // In: *The Plant Cytoskeleton: Key Tool for Agro-Biotechnology* (Eds Blume Ya.B., Baird W.V., Yemets A.I., Breviario D.). – NATO Science for Peace and Security Series C: Environmental Security. – 2008. – P. 435–454.
4. Manimaran P., Ramkumar G., Sakthivel K., Sundaram R.M., Madhav M.S., Balachandran S.M. Suitability of non-lethal marker and marker-free systems for development of transgenic crop plants: Present status and future prospects // *Biotech. Adv.* – 2011. – 29, N 6. – P. 703–714.
5. Рукавцова Е.Б., Лебедева А.А., Захарченко Н.С., Бурьянов Я.И. Пути создания биобезопасных трансгенных безмаркерных растений // *Физиол. раст.* – 2013. – 60, № 1. – С. 17–30.
6. Wang Y., Yau Y.-Y., Perkins-Balding D., Thompson J.G. Recombinase technology: applications and possibilities // *Plant Cell Rep.* – 2011. – 30. – P. 267–285.
7. Sauer B., Henderson N. Targeted insertion of exogenous DNA into the eukaryotic chromosome by the cre recombinase // *New Biol.* – 1990. – 2. – P. 441–449.
8. Kopertekh L., Schulze K., Frolov A., Strack D., Broer I., Schiemann J. Cre-mediated seed-specific transgene excision in tobacco // *Plant Mol. Biol.* – 2010. – 72. – P. 597–605.
9. Liu H.K., Yang C., Wei Z.W. Heat shock-regulated site-specific excision of extraneous DNA in transgenic plants // *Plant Sci.* – 2005. – 168. – P. 997–1003.
10. Sekan A., Isaenkov S. New approach in site-specific recombinase Cre/loxP technology for producing of marker-free transgenic plants // In: *7th EPSO Conference “Plants for a Greening Economy”* (Porto Heli, Greece, 1–4 September, 2013). – P. 163.
11. Clough J.S., Bent F.A. Floral dip: simplified method for agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* // *Plant J.* – 1998. – 16, N 6. – P. 735–743.
12. Sambrook J. *Molecular cloning: a laboratory manual* // Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory. – 2001 – P. 2344.
13. Маниатис Т., Фрич Е.Ф., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. – М.: Мир. – 1984. – 521 с.
14. Dellaporta S.L., Wood J., Hicks J.B. A plant DNA miniprep: version II // *Plant Mol. Biol. Rep.* – 1983. – 1. – P. 19–21.

SEKAN A.S., ISAENKOV S.V., BLUME YA.B.

Institute of Food Biotechnology and Genomics, Nat. Acad. Sci. of Ukraine, Ukraine, 04123, Kyiv, Osipovskogo str., 2a, e-mail: ehirta3@gmail.com

DEVELOPMENT OF SITE-SPECIFIC RECOMBINASE SYSTEM CRE/loxP FOR THE PRODUCTION OF MARKER-FREE TRANSGENIC *ARABIDOPSIS THALIANA* PLANTS

Aims. One of the main issues in plant biotechnology is the development of marker-free genetically modified species that increase the consumer acceptance. One of the molecular tools that can help to resolve is site-specific recombination. We have developed a rapid and convenient DNA excision method mediated by the Cre/loxP recombination system. **Methods.** Analysis of stable transgenic *Arabidopsis* plants was determined by gistochemical analysis and PCR. **Results.** The aim of this study was to develop a novel Cre/loxP approach based on the *cre* gene expression. After expression recombinase could cause the excision of *nptII* marker gene and the Cre construct itself between the *loxP* sites. The excision event we examined by GUS staining. The results showed high level of unstained transgenes that could mean an excision event of target sequences. **Conclusions.** The development of efficient strategy to generate selectable marker-free transgenic plants could help increase the acceptance of genetically modified (GM) plants in community. Rapid and convenient

DNA excision method mediated by the Cre/loxP recombination system was developed to produce marker-free transgenic plants without conditional treatment or the genetic crossing of offspring. Present study demonstrates that the novel site-specific recombinase Cre/loxP system provides a simple and efficient way to generate marker-free transgenic plants.

Key words: genetically modified plants, site-specific recombinase system, transformation by *Agrobacterium tumefaciens*, PCR analysis, GUS test.

УДК 579.254.2

СЕРГЕЕВА Л.Е., МИХАЛЬСКАЯ С.И., КУРЧИЙ В.М., ТИЩЕНКО Е.Н.

Институт физиологии растений и генетики НАН Украины,

Україна, 03022, г. Киев, ул. Васильковская, 31/17, e-mail: svetlana_mykhalska@mail.ru

ИЗМЕНЕНИЯ В СОДЕРЖАНИИ СВОБОДНОГО ПРОЛИНА В ПОБЕГАХ И КОРНЯХ ПРОРОСТКОВ КУКУРУЗЫ НА НАЧАЛЬНОЙ СТАДИИ ДЕЙСТВИЯ ЛЕТАЛЬНЫХ ОСМОТИЧЕСКИХ СТРЕССОВ

Осмотические стрессы окружающей среды (засоление и водный дефицит) оказывают негативное влияние на рост, развитие сельскохозяйственных культур и их продуктивность. Характерной чертой этих стрессов является продолжительность их воздействия, в случае же засоления речь идёт о постоянном действии стрессового фактора. Вместе с тем в природе существуют дикие виды, а также генотипы культурных растений, отличающиеся повышенным уровнем стресс-устойчивости. Очевидно, что выживание таких растений в критических условиях сопряжено со стабилизацией осмотического и ионного гомеостазов [1–3].

Для компенсации нарушений, вызываемых осмотическими стрессами, растения выработали ряд специальных механизмов, среди которых приоритетную роль играет свободный пролин (*Pro*). *Pro* нередко в больших количествах аккумулируется в растениях в ответ на водный дефицит и засоление. Широко обсуждается его роль как регулятора внутриклеточного осмотического потенциала, стабилизатора клеточных структур и бимополимеров, отмечается участие *Pro* в преодолении оксидативного стресса, а также в процессах восстановления, реабилитации и развития [4–7]. Свойства пролина таковы, что эта аминокислота может оказывать влияние на активность системы своего синтеза/катаболизма/транспорта. Очевидно, что уровень свободного *Pro* в тканях растения в значительной степени отражает эти события.

Ранее нами анализировался уровень аккумуляции свободного пролина в клетках растений, подвергавшихся продолжительным

осмотическим стрессам [8]. В этом случае содержание *Pro* было сопряжено со стабилизацией (поддержанием) процессов жизнедеятельности. Вместе с тем, эффективность выживания в неблагоприятных условиях обеспечивается и скоростью включения/активизации защитных механизмов. В связи с этим встаёт вопрос о характере изменений в содержании свободного пролина в начале стрессового воздействия, что даёт понимание «быстрых» ответных реакций организма. Немаловажное значение при этом имеет выяснение роли ключевых генов синтеза/катаболизма *Pro*. Удобной моделью для таких исследований являются трансгенные растения, в которых изменён уровень экспрессии ключевых генов, контролирующих метаболизм пролина – Д-пирролин-5-карбоксилатсинтазы и пролиндегидрогеназы. Исходя из этого, на начальных этапах воздействия моделированного летального засоления и обезвоживания проводили сравнительное изучение содержания свободного пролина в проростках исходной и трансформированной инбредной линии (Т0), полученной с использованием агробактериального штамма LBA4404, несущего pBi2E с двуцепочечным РНК-супрессором гена пролиндегидрогеназы.

Материалы и методы

Объектами исследования были 7-ми суточные проростки инбредной линии кукурузы ЛЗ90, селекции ИФРГ НАН Украины, г.Киев, (контроль) и этой линии, трансформированной *in planta* с использованием LBA4404 (pBi2E с дц-РНК-супрессором гена пролиндегидрогеназы). Рекомбинатный штамм любезно

предоставлен Кочетовым А.В. (Институт цитологии и генетики СО РАН).

Зерновки проращивали на воде в течение 7 суток в условиях 16-ти часового фотопериода. Стандартизированные по размеру проростки переносили в условия моделированного летального засоления (25,0 г/л солей морской воды) или обезвоживания (0,8 М маннита) и далее подвергали стрессу в течение 4 часов. Использовали водные растворы обоих веществ, поэтому нормальными условиями (н.у.) считали пребывание контрольных и Т0-проростков на воде. Содержание свободного пролина методом Чинарда в модификации [9] определяли в побегах и корнях проростков. При обработке результатов сравнительного исследования использовали критерий Стьюдента. Биологическая повторность опыта не менее чем четырёхкратная, аналитическая – двукратная.

Результаты и обсуждение

У исследуемых проростков кукурузы, культивируемых в течение 4-х часов в условиях действия летальных осмотических стрессов, визуальных патологий в состоянии растений не наблюдали. В то же время происходили изменения уровня свободного пролина в побегах и корнях как Т0-проростков, так и контрольных вариантов опыта (рис.).

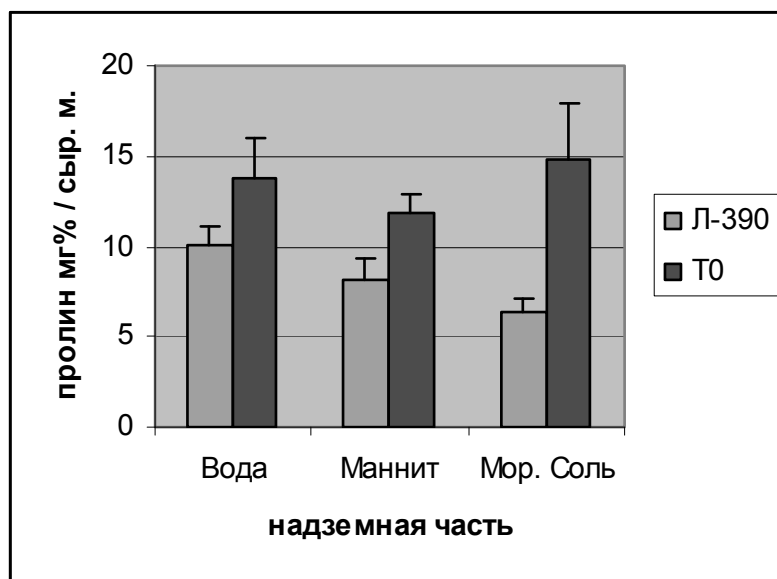
В н. у. выращивания содержание свободного пролина у Т0-проростков достоверно превышало этот показатель контроля (ЛЗ90). В корнях это превышение составило – 3,8, а в побегах – 1,4 раза. Вероятно, повышенный уровень свободного пролина в Т0-проростках относительно контроля является отражением частичной супрессии гена пролиндегидрогеназы кукурузы. Отметим, что чётко выраженные различия в содержании Pro наблюдаются также между корнями и побегами анализируемых вариантов.

Полученные данные показали, что 4-х часовые осмотические стрессы вызывали заметные изменения в содержании свободного пролина во всех анализируемых вариантах кукурузы. В контроле, происходили синхронные разнонаправленные вариации содержания аминокислоты в ответ на водный дефицит и засоление: увеличение в корнях и уменьшение в побегах. В то же время в органах Т0-проростков наблюдалась неоднозначная ответная реакция: резкое падение в корнях и небольшие вариации в побегах. При этом в течение столь короткого периода пребывания в условиях водного дефицита и засоления суммарное содержание

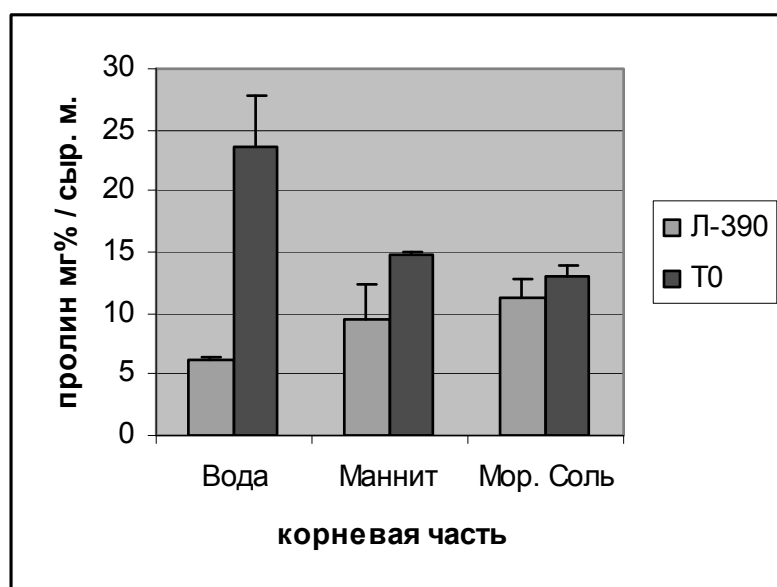
Pro в проростках контроля поддерживалось на одном и том же уровне, тогда как в трансформированных вариантах – почти двухкратно снижалось. Однако, несмотря на снижение, уровень *Pro* в корнях и побегах Т0-проростков был выше, чем в контрольных вариантах (ЛЗ90).

Поскольку осмотические стрессы создавались водными растворами, то измеренный свободный пролин имел эндогенное происхождение. Согласно общепринятому положению [4], содержание этой аминокислоты является результатом координированной регуляции синтеза, катаболизма и транспорта, вместе с тем данные о белках переносчиках *Pro* растений крайне ограничены [5]. Исходя из быстрой аккумуляции *Pro* в корнях при одновременном его эквивалентном снижении в побегах контрольных вариантов, можно предположить, что важную роль на начальных этапах развития осмотических стрессов может играть транспорт аминокислоты в корни, поскольку те непосредственно контактируют со стрессорами. В пользу такого предположения свидетельствует также однотипность ответных реакций, индуцируемых разными веществами.

Что касается Т0-проростков, то в побегах и корнях на начальных этапах действия стрессовых факторов, наблюдалась неодинаковая ответная реакция. Поскольку речь идёт о трансформантах кукурузы, содержащих дцРНК-супрессор гена пролиндегидрогеназы, которая наиболее активна в митохондриях апекса его корней, теоретически можно было ожидать аккумуляцию *Pro* в корнях. Однако уровень этой аминокислоты, наоборот, существенно снижался, хотя и оставался более высоким, чем в корнях нетрансформированного контроля. С нашей точки зрения, *Pro*, который с максимальным уровнем накапливался в корнях 7-суточных Т0-проростков в н.у., на начальном этапе стрессового воздействия мог активно включаться в биосинтез белков, поддерживая таким образом целостность биополимеров и структурных компонентов клеток [10]. В пользу этого свидетельствуют результаты наших предварительных исследований, в которых показана прогрессивная гибель клеток контроля, проращиваемых в условиях летального обезвоживания и засоления (в течение 7-суток). В то же время трансгенные варианты оставались жизнеспособными и, в частности, в корнях 21-суточных проростков содержался высокий уровень Pro (~130 мг %/ г сырой массы) [11].



а



б

Рис. Содержание свободного пролина в побегах (а) и корнях (б) 7-и суточных проростков кукурузы через 4-часа воздействия моделированным летальным стрессом: обезвоживание (0,8М маннита) или засоление (2,5 % морской соли), вода – н.у. культивирования. Л-390 – (контроль), T0 – проростки, трансформированных *in planta* растений Л-390 с использованием LBA4404 (pBi2E)

Что касается летального обезвоживания, то в побегах проростков, предварительно культивируемых 4 суток в н.у., а затем 10 суток при стрессе, уровень этой аминокислоты возрастал ~20-кратно (в печати).

Представленные данные свидетельствуют о быстрых динамичных изменениях в содержании свободного пролина в корнях и побегах проростков, что сопряжено с поддержанием их осмотического статуса. В то же время повышение содержания пролина в побегах проростков при засолении может указывать на реализацию протекторной его роли от токсического действия ионов Na^+ и Cl^- . При

этом одним из компонентов общей системы генетического контроля, связанной со скоростью, динамикой изменения и специфичностью накопления свободного пролина, является ген пролиндегидрогеназы кукурузы.

Выводы

1. Значительные изменения в содержании свободного пролина в корнях и побегах проростков кукурузы на первоначальном этапе действия летального обезвоживания и сульфатно-хлоридного засоления, реализуются уже в течение нескольких часов.

2. Установлена органоспецифичность

аккумуляции свободного пролина инбредной линии и линии, несущей дцРНК супрессор гена пролиндегидрогеназы, в ответ на разные осмотические стрессы. В контрольных растениях L-390 уровень свободного пролина на начальных этапах стресса в побегах уменьшался, а в корнях увеличивался. В побегах-T0 проростков уровень свободного пролина определялся типом осмотического стресса: снижался в присутствии маннита и

возрастал при засолении, относительно контрольных показателей.

3. Одним их компонентов общей системы генетического контроля, связанной с изменением содержания свободного пролина на ранних этапах стрессового ответа, является ген пролиндегидрогеназы кукурузы.

Работа поддержана грантом совместных научных проектов НАН Украины (16-05-2012) – СО РАН (№ 11).

Литература

1. Wu C.-A., Yang G.-D., Meng Q.-W., Zheng C.-C. The cotton *GhNH1* gene encoding a novel putative tonoplast Na⁺/H⁺ antiporter plays an important role in salt stress // *Plant Cell Physiol.* – 2004. – м 45, N 5. – P. 600–607.
2. Wang W., Vinocur B., Altman A. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance // *Planta.* – 2003. – 218. – P. 1–14.
3. Miller G., Stein H., Honig A. et al. Responsive modes of *Medicago sativa* proline dehydrogenase genes during salt stress and recovery dictate free proline accumulation // *Planta.* – 2005. – 222. – P. 70–79.
4. Szabados L., Savoure A. Proline: a multifunctional amino acid // *Trends Plant Sci.* – 2010. – 15. – P. 89–97.
5. Kishor P.B.K., Sangam S., Amruta R. et al. Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: its implications in plant growth and abiotic stress tolerance // *Curr. Sci.* – 2005. – 88. – P. 424–432.
6. Lehman S., Funck D., Szabados L., Rentch D. Proline metabolism and transport in plant development // *Amino acid.* – 2010. – 39, N 4. – P. 949–962.
7. Peng Z., Lu Q., Verna D.P. Reciprocal regulation of delta 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase and proline dehydrogenase genes controls proline levels during and after osmotic stress in plants // *Mol. Gen. Genet.* – 1996. – N 3. – P. 334–341.
8. Сергеева Л.Е. Клеточная селекция с ионами тяжелых металлов для получения генотипов растений с комплексной устойчивостью к абиотическим стрессам. – К.: Логос, 2013. – 211 с.
9. Андрищенко В.К., Саянова В.В., Жученко А.А. и др. Модификация метода определения пролина для выявления засухоустойчивых форм рода *Lycopersicon Tourm* // *Известия Академии Наук Молдавской ССР.* – 1981, № 4. – С. 55–60.
10. Stein H., Honig A., Miller G. et al. Elevation of free proline and proline-rich protein levels by simultaneous manipulations of proline biosynthesis and degradation in plants // *Plant Sci.* – 2011. – 181. – P. 140–150.
11. Михальская С.И., Матвеева А.Ю., Сергеева Л.Е., Кочетов А.В., Тищенко Е.Н. Исследование содержания свободного пролина в растениях кукурузы, трансформированных *in planta* с использованием LBA4404, несущего РВ12Е с двухцепочечным РНК-супрессором гена пролиндегидрогеназы // «Известия Самарского научного центра РАН». – 2013. – № 3, № 5. – С. 1662–1666.

SERGEEVA L.E., MYKHALSKA S.I., KURCHII V.M., TISHCHENKO E.N.

Institute of Plant Physiology and Genetics of National Academy of Science of Ukraine, Ukraine, 03022, Kyiv, Vasylykivska str., 31/17, e-mail: svetlana_mykhalska@mail.ru

THE CHANGES OF THE FREE PROLINE CONTENTS IN THE DIFFERENTIAL TISSUES OF CORN SHOOTS UNDER INITIAL STAGES OF OSMOTIC STRESSES

Aim. Salt and water stresses essentially decrease viability and productivity of crop plants. There are some biotechnological approaches to raise the level of the stress resistance. The genetic transformation is among them. The procedure of maize *Agrobacterium*-mediated transformation using LBA 4404 strain with antisense proline dehydrogenase gene suppressor was created and L-390-T0 progeny was obtained. It was necessary to investigate the free proline contents in various plant tissues under normal and stress conditions.

Methods. 7-day old corn plants (genotypes L-390 and L-390-T0) were exposed to salinity (2.5 % of sea water salts) or water stress (0.8 M mannitol) during four hours. The free proline levels in shoots and roots were monitored. **Results.** In tissues of L-390-T0 plants the free proline levels exceeded these parameters of L-390 plants under both normal and stress conditions. It was shown the particular changes of free proline levels in shoots and roots of 7-day corn plants (genotypes L-390 and L-390-T0) under initial stages of stress pressure of lethal salinity or water stress. The gene of PDH-is the component part of the general genetic system that regulates the proline level under initial stages of lethal osmotic stresses.

Key words: corn, *Agrobacterium*-mediated transformation, salinity, water stress, resistance, proline.

ОСОБЛИВОСТІ БІОСИНТЕЗУ ПОЗАКЛІТИННИХ ЦЕЛЮЛАЗ І КСИЛАНАЗИ У *FENNELIA FLAVIPES* B.J. WILEY ET E.G. SIMMONS

Комплекси целюлозо- і ксиланолітичних ферментів широко застосовуються в технологіях переробки лігноцелюлозної біомаси. Найбільш перспективними вважають розробки технологій отримання біоетанолу другої генерації, загальний обсяг виробництва якого може досягти 125 млрд. л у 2017 р. [2, 10]. Ефективність ферментативного гідролізу лігноцелюлозної біомаси залишається ключовим фактором в технологіях її переробки, причому лімітуючим чинником виступає неоднорідність її структури. Для ефективної трансформації лігноцелюлозних відходів першочергове значення має кількість та якість целюлозо- та ксиланолітичних ферментів, яка варіює в кожному конкретному випадку [8, 11].

У сучасних технологіях найбільше поширення отримали комерційні суміші ферментів, які виробляються компаніями Novozymes та Genencor з генетично покращених штамів гриба *Trichoderma reesei* (*Hypocrea jecorina*) [12]. Для ефективного синтезу цих ферментів необхідне застосування індукторів. Відомо, що целобіоза, софороза і лактоза індукують синтез целюлозолітичних ферментів, тоді як ксилоза та арабіноза – ксиланолітичних ферментів. Дія подібних індукторів на експресію специфічного гену є тимчасовою і регулюється їх швидкістю метаболізму джерела вуглецю [6, 13].

Використання як індукторів змішаних джерел вуглецю, наприклад лігноцелюлозної біомаси, має широкі потенційні можливості, однак особливості синтезу ферментативних комплексів в цих умовах детально не досліджені.

Класична схема гідролізу целюлози включає синергічну дію трьох класів ферментів: ендо-1,4-в-глюканаза (хаотично розщеплює внутрішні зв'язки в ланцюзі целюлози); екзо-1,4-в-глюканаза (атакує кінці полімеру целюлози, утворюючи целобіозу); в-глюкозидаза (конвертує целобіозу в глюкозу) [4, 5]. Відомо, що експресія генів целюлаз і секреція цих ферментів контролюється на рівні транскрипції, що найбільш детально вивчені у

мікроскопічних грибів *Aspergillus niger* і *Hypocrea jecorina*. Визначені регулони, які складаються з більш ніж 200 генів і включають основні структурні та ферментативні компоненти для ефективного гідролізу целюлози. Регулони містять не лише виражені гени целюлаз, але й багато генів геміцелюлаз. Цей факт вказує на те, що для ефективного гідролізу складних природних субстратів необхідні комплементарні ферментативні активності [9].

Оскільки синтез целюлозо- і ксиланолітичних комплексів контролюється у мікроміцетів різними неконсервативними механізмами, тому пошук ефективних індукторів синтезу целюлаз є важливим етапом біотехнологічних досліджень.

Матеріали і методи

Об'єктом дослідження був штам *Fennellia flavipes*, який зберігається в колекції відділу фізіології та систематики мікроміцетів Інституту мікробіології і вірусології НАНУ. Попередніми дослідженнями встановлено його здатність до синтезу комплексу целюлозолітичних ферментів.

Посівний матеріал вирощували на картопляно-глюкозному агарі впродовж 10–14 діб при температурі 24–26 °С. Культивування грибів проводили в глибинних умовах (210–230 об/хв) при температурі 22–24 °С в колбах Ерленмейєра з використанням поживного середовища Чапека з додаванням різних джерел вуглецю. Для визначення індукторів синтезу целюлозолітичного комплексу у дослідженого штаму були використані такі речовини, 5 г/л: лактоза, арабіноза, сорбітол – з додаванням фільтрувального паперу (ФП) та Na-КМЦ (Sigma), пшенична солома – без додавання ФП.

У зразках визначали ендо-, екзоглюканазну та ксиланазну активність.

Ендоглюканазну активність визначали за зниженням в'язкості 0,5 % розчину Na-КМЦ при температурі 50 °С після 10 хв інкубування з 1 мл культурального фільтрату [12]. Екзоглюканазну активність визначали за гідролізом фільтрувального паперу (ФП-активність).

Редукуючі речовини визначали за методом з ДНС реактивом після інкубації 1 мл культурального фільтрату та 1 мл 0,05 М цитратного буферу (рН 4,5) з ФП (1-6 см) при температурі 50 °С протягом 1 год [3, 7].

Ксиланазну активність визначали за гідролізом букового ксилану (Sigma). Редукуючі речовини визначали за методом з ДНС реактивом після інкубації 0,18 мл 1 %-го розчину букового ксилану в 0,05 М цитратному буфері (рН 4,5) з 20 мкл культурального фільтрату при температурі 50°С протягом 5 хв [3, 7]. За одиницю екзоглюканазної та ксиланазної активності приймали таку кількість ферменту, яка в заданих умовах утворювала 1 мкмоль глюкози чи ксилози відповідно за 1 хв на 1 мл культурального фільтрату.

Результати та обговорення

Відомі два основні типи індукторів синтезу целюлозолітичних ферментів у *T. reesei* – основного світового продуценту целюлаз – специфічні субстрати (пшенична солома, ФП, Na-КМЦ) та неспецифічні (лактоза, сорбітол, арабіноза) [9]. У штаму *F. flavipes* целюлази визначались в середовищі лише при наявності специфічних субстратів. Введення неспецифічних індукторів в середовище культивування, на відміну від *T. reesei*, не викликало синтезу целюлозолітичних ферментів, а при додаванні їх в поживне середовище з ФП синтез целюлаз практично повністю блокувався. Дослідження динаміки ендоглюканазної активності за наявності специфічних індукторів в поживному середовищі показало, що вона

характеризувалась тривалою (2–3 доби) фазою адаптації до субстрату, а максимальна ферментативна активність спостерігалась на 5-добу культивування на середовищі з пшеничною соломою (14–17 од/мл) (рис. 1). На середовищах з Na-КМЦ та ФП ендоглюканазна активність штаму була в 4,5–9,5 разів нижчою за таку на середовищі з пшеничною соломою. На середовищі з ФП ендоглюканазна активність штаму *F. flavipes* була в 6,7 рази нижчою, ніж у *Fusarium sp. 5* [1].

Досить високі значення ФП-активності (0,3–0,4 од/мл) відмічені лише для *F. flavipes* на поживному середовищі з пшеничною соломою, що в 9 разів вище, ніж у *Fusarium sp. 5* [1]. В інших випадках екзоглюканазна активність не перевищувала 0,05 од/мл. Подібно до ендоглюканазної активності, при визначенні ФП-активності також виявлена тривала фаза адаптації. Проте максимальну активність спостерігали раніше, ніж у випадку ендоглюканазної активності, – як правило на 4–5 добу культивування (для пшеничної соломи – на 6 добу) (рис. 2).

На поживному середовищі з пшеничною соломою ксиланазна активність, так само як і екзоглюканазна, реєструвалась з 3-ої доби росту і досягала максимуму на 7–8 добу культивування. Вона була в 1,4 рази вищою у *F. flavipes*, ніж у *Fusarium sp. 5* [1]. Ксиланазна активність, як і дві згадані вище целюлолітичні, була найвищою на поживному середовищі з пшеничною соломою і практично не виявлялась (до 5 од/мл) на інших субстратах, в тому числі на ФП та Na-КМЦ (рис. 3).

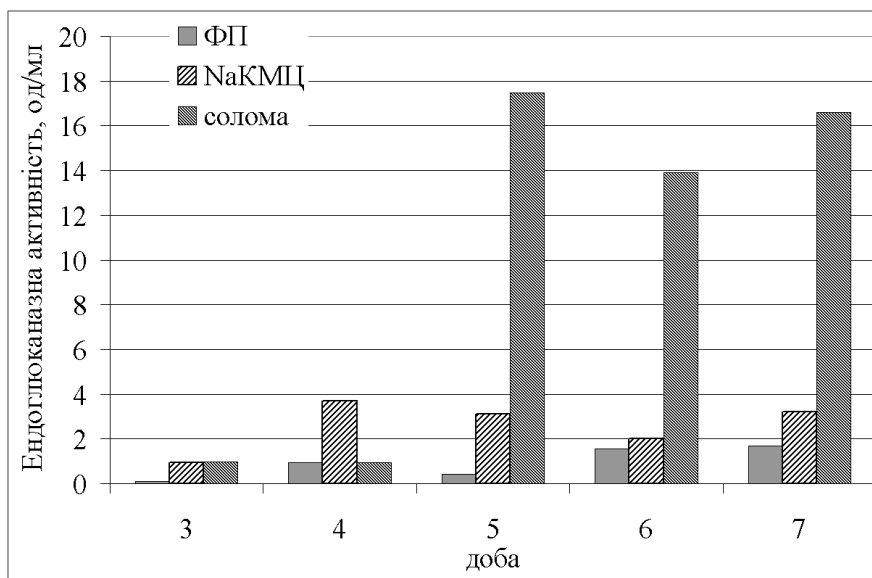


Рис. 1. Ендоглюканазна активність штаму *Fennellia flavipes* на середовищах з різними субстратами

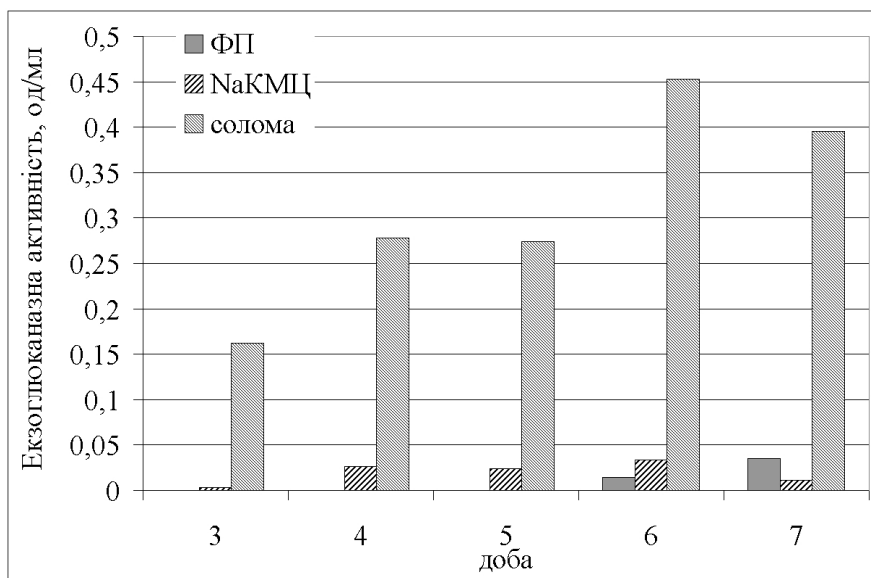


Рис. 2. Екзоглюканазна активність штаму *Fennellia flavipes* на середовищах з різними субстратами

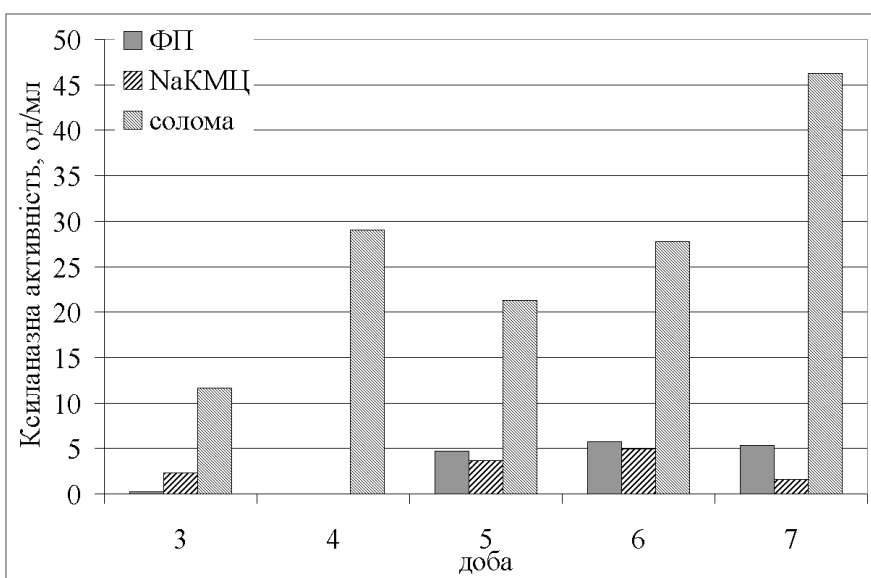


Рис. 3. Ксиланазна активність штаму *Fennellia flavipes* на середовищах з різними субстратами

Такий результат можна пояснити наявністю специфічних механізмів індукції комплексів целюлаз і ксиланаз, які, як було показано для деяких видів роду *Fusarium* та *Neurospora crassa*, пов'язані з різною роллю консервативних факторів транскрипції цих генів [9].

Висновки

Отже, використання комплексного джерела вуглецю (пшеничної соломи) призводить до ефективної індукції синтезу позаклітинних целюлозо- і ксиланолітичних ферментативних комплексів у штаму *Fennellia flavipes* і *Fusarium* sp. 5 (показано попередніми

дослідженнями). Такі розчинні неспецифічні індуктори як лактоза, арабіноза і сорбітол, що індуквали синтез целюлаз у *Trichoderma reesei* [9], не активували процес синтезу комплексу целюлаз та ксиланаз у дослідженого штаму. Встановлений нами спектр позаклітинної целюлозолітичної та ксиланазної активності у *F. flavipes* свідчить про перспективність подальших досліджень з метою отримання ферментних препаратів та їх використання в технологіях переробки сільськогосподарських відходів для отримання целюлозного біоетанолу.

Література

1. Павличенко А.К., Пасик Ю.С., Курченко И.Н. и др. Некоторые особенности индукции синтеза компонентов целлюлазного комплекса *Fusarium* sp. // IX Міждзнародowej naukowí-praktycznej konferencji "Nauka i inowacja", 7–15 жовт. 2013 р.: матеріали конф., Vol. 15 – Przemysl: "Nauka i studia", 2013. – С. 22–26.
2. Biofuels and food security. A report by High Level Panel of Experts on Food Security and Nutrition of the Committee on World Food Security // Gitz V. ed. – Rome, 2013. – 131 p.
3. Ghose T.K. Measurement of Cellulase Activities // Pure and Applied Chemistry. – 1987. – 59, N 2. – P. 257–268.
4. Horn S.J., Vaaje-Kolstad G., Westereng B., Eijsink V.G.H. Novel enzymes for the degradation of cellulose // Biotechnology for Biofuels. – 2012. – 45, N 5. – 13 p.
5. Kumar D., Murthy G.S. Stochastic molecular model of enzymatic hydrolysis of cellulose for ethanol production // Biotechnology for Biofuels. – 2013. – 6, N 63. – 20 p.
6. Ike M, Park J.Y., Tabuse M., Tokuyasu K. Controlled preparation of cellulases with xylanolytic enzymes from *Trichoderma reesei* (*Hypocrea jecorina*) by continuous-feed cultivation using soluble sugars // Biosci. Biotechnol. Biochem. – 2013. – 77, N 1. – P. 161–166.
7. Miller G.I. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars // Analytical Chemistry. – 1959. – 31, N 3. – P. 426–428.
8. Olsson L., Jørgensen H., Krogh K.B.R., Roca C. Bioethanol production from lignocellulosic material // Polysaccharides: structural diversity and functional versatility. – New York: Marcel Dekker Inc., 2004. – P. 957–993.
9. Peterson R., Nevalainen H. *Trichoderma reesei* RUT-C30 – thirty years of strain improvement // Microbiology. – 2012. – 158, N 1. – P. 58–68.
10. Schnepf R., Yacobucci B.D. Renewable Fuel Standard (RFS): Overview and Issues // USA: Congressional Research Service Report, 2013. – 31 p.
11. Sun Y., Cheng J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production // Bioresource Technol. – 2002. – 83. – P. 1–11.
12. Zhang Y.H.P., Hong J., Ye X. Cellulase Assays // Biofuels: Methods and Protocols, Methods / Molecular Biology by ed. Mielenz. – 2009. – 581. – P. 213–231.
13. Znameroski E.A., Coradetti S.T., Rochec C.M. et al. Glass Induction of lignocellulose-degrading enzymes in *Neurospora crassa* by cellodextrins // PNAS. – 2012. – 109, N 16. – P. 6012–6017.

SYRCHIN S.O., KHARKEVICH O.S., PAVLYCHENKO A.K., YURIEVA O.M., NAKONECHNA L.T., PASIK YU.S., KURCHENKO I.M.

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of Natl. Acad. Sci. of Ukraine, Ukraine, Kiev, MSP, D03680, Zabolotny str., 154, e-mail: syrchin@ukr.net

BIOSYNTHESIS PECULIARITIES OF EXTRACELLULAR CELLULASES AND XYLANASE BY *FENNELIA FLAVIPES* B.J. WILEY ET E.G. SIMMONS

Aims. The aim of this research was to study the effect of the inductors of the cellulases and xylanase biosynthesis process. **Methods.** Cellulase activity has been measured by filter paper activity (exoglucanase) and viscosity reduction of Na-CMC solution (endoglucanase). Xylanase activity has been determined by hydrolysis of beech xylan. **Results.** Lactose, filter paper, arabinose, Na-CMC, wheat straw, sorbitol have been studied as possible inductors of cellulase and xylanase complex of *Fennellia flavipes*. The only wheat straw has induced significant value of cellulase and xylanase activity. *Fennellia flavipes* have not synthesized cellulase and xylanase, when it was cultivated on non-specific substrates. **Conclusions.** Effective synthesis of extracellular cellulase and xylanase complex by *F. flavipes* have been indicated that further research is a promising for obtaining of enzyme preparations and using for agricultural waste processing technology and cellulosic ethanol producing.

Key words: *Fennellia flavipes*, cellulase, xylanase, inductor, biosynthesis.

УДК 57.085.2:635.34

ТАРАНЕНКО А.М., БАННИКОВА М.О., МОРГУН Б.В.

Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України,

Україна, 03680, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 148, e-mail: rotenar@rambler.ru, molgen@icbge.org.ua

СОРТОЗАЛЕЖНІ РОСТОВІ ПОКАЗНИКИ ТА РЕГЕНЕРАЦІЙНА ЗДАТНІСТЬ РІЗНИХ ЕКСПЛАНТІВ КАПУСТИ В КУЛЬТУРІ *IN VITRO*

Капуста білоголова (*Brassica oleracea* L.) є однією з найпоширеніших сільськогосподарських культур у країнах з помірним кліматом. Її висока харчова цінність пояснюється високим вмістом азотистих сполук (1,27–3,78 %), жирів (0,16–0,67 %), вуглеводів (5,25–8,56 %), присутністю фітонцидних сполук, вітамінів А, В₁, С, К, В₆, метіоніну, тощо. Харчова цінність 100 г продукту складає 24 Ккал [1].

Висока харчова та господарська цінність капусти білоголової робить її привабливим об'єктом для біотехнологічних досліджень. Таким чином, ми займалися підбором сорту з найвищими ростовими показниками та регенераційною здатністю.

Матеріали і методи

Насіння сортів Амагер, Білосніжка, Димерська 7, Екстра, Золотий гектар, Іюньська, Казачок, Кам'яна голова, Княгиня, Лангедейкер, Лангедейкер Дауер, Мегатон, Московська пізня, Слава 1305, Трансфер, Тюркіс, Українська осінь, Харківська зимова, Ярославна було введено у культуру *in vitro* [2].

У 4-х тижневих асептичних рослин капусти були проаналізовані ростові показники: довжина стебла (L, см), довжина кореневої системи (L₁, см), довжина (a, см) і ширина (b, см) листової пластинки, кількість листків (n), кількість коренів (n_к) на рослину [3].

Проводили підбір живильних середовищ для регенерації з різних експлантів капусти білоголової. В якості базового середовища використано МС [4] з половинним вмістом макросолей і різними концентраціями регуляторів росту. Проводили регенерацію з таких експлантів: меживузлів, листових дисків, гіпокотилів.

Враховуючи високий відсоток ураження насіння, отриманого із торгової мережі, патогенними агентами фунгальної і бактеріальної природи, було вивчено динаміку проростання попередньо стерилізованого насіння капусти на агаризованому середовищі МС, яке містило розчини комерційних фунгіцидів різних концентрацій («Maxim Star 025 FS» та «Квадріс 250 SC» (Syngenta,

Швейцарія)). Встановлювалася концентрація фунгіциду, яка при культивуванні інгібує фунгальне зараження, не перешкоджаючи розвитку рослини. В якості контролю використовувалося насіння, пророщене на середовищі МС без фунгіцидів. Після пророщування двотижневі гіпокотилі насікалися, і переносилися на середовище для калусоутворення. Склад середовища для калусоутворення був наступним: макро- та мікросолі МС, 30 г/л сахарози; 300 мг/л інозиту; 300 мг/л гідролізату казеїну; 2 мг/л 2,4-Д; 0,1 мг/л БАП; 1 мг/л НОК; 0,1 мг/л кінетину. Інкубування проводилося протягом 4 діб при 24 °С без доступу світла, після чого експланти переносили на середовище для регенерації.

Живильні середовища для регенерації на базі середовища МС з половинним вмістом макросолей і 10 г/л сахарози відрізнялися вмістом регуляторів росту [5, 6].

Тестували середовища з наступними варіантами вмісту регуляторів росту:

для меживузлів: 1 мг/л БАП, 0,1 мг/л НОК; 1 мг/л БАП, 1 мг/л НОК;

для листових експлантів: 2 мг/л БАП, 1 мг/л зеатину, 1 мг/л АБК, 1 мг/л НОК і 1 мг/л ГК; 3 мг/л БАП;

для гіпокотилів: варіабельно 0,1; 0,3; 0,5; 1 мг/л НОК; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0 мг/л БАП; 2 мг/л 2,4-Д.

За результатами досліджень були підібрані оптимальні варіанти середовищ для регенерації конкретно для кожного типу експлантів, а також було визначено рослини яких сортів найкраще регенерують.

Результати та обговорення

За результатами аналізу ростових показників 4-тижневих рослин капусти встановлено, що найвищі показники росту і вкорінення у культурі *in vitro* притаманні рослинам 5 сортів: Амагер, Лангедейкер, Мегатон, Слава 1305, Харківська зимова з 19 проаналізованих. Рослини наведених сортів було використано для подальших досліджень (табл. 1).

При пророщуванні попередньо стерилізованого насіння на середовищі МС із фунгіцидами було визначено, що додавання у середовище фунгіцидів у розведенні 1:300 і цефотаксиму 500 мкг/мл, дозволило мінімізувати прояви бактеріальної і фунгальної інфекції (0,5–1,5 % ураженого насіння). Застосування суміші фунгіциду і антибіотику, або системного фунгіциду «Maxim Star 025 FS» у розведенні 1:100, призвело до повного пригнічення патогенної активності. Також було показано, що присутність даних фунгіцидів у живильному середовищі мінімально впливає на проростання насіння (втрата схожості становить 1–3,5 %, залежно від сорту капусти і концентрації фунгіциду), проте впливає на морфологію проростків—спостерігалось вкорочення та потовщення гіпокотилів.

При регенерації капусти з меживузлів на середовищі МС з половинним вмістом макросолей і 10 г/л сахарози, а також різним вмістом регуляторів росту, найбільший відсоток регенерації спостерігали у рослин сортів Лангедейкер і Харківська зимова (табл. 2). При додаванні в регенераційне середовище 1 мг/л БАП, 1 мг/л НОК показники регенерації були 54,6±1,12 % – для рослин сорту Лангедейкер і

46,1±2,11 % – для рослин сорту Харківська зимова. При додаванні в регенераційне середовище 1 мг/л БАП, 0,1 мг/л НОК показники регенерації були 76,3±0,84 % – для рослин сорту Лангедейкер і 69,6±1,94 % – для рослин сорту Харківська зимова. Таким чином, оптимальною концентрацією регуляторів росту є 1 мг/л БАП, 0,1 мг/л НОК.

При регенерації капусти з листових експлантів на середовищі МС з половинним вмістом макросолей і 10 г/л сахарози, а також різним вмістом регуляторів росту, найбільший відсоток регенерації спостерігали у рослин сортів Лангедейкер, Амагер і Харківська зимова (табл. 3). При додаванні в регенераційне середовище 2 мг/л БАП, 1 мг/л зеатину, 1 мг/л АБК, 1 мг/л НОК і 1 мг/л ГК показники регенерації були 31,3 ± 1,74 % – для рослин сорту Лангедейкер, 24,5 ± 1,86 % – для рослин сорту Амагер, і 28,2 ± 1,27 % – для рослин сорту Харківська зимова. При додаванні у регенераційне середовище 3 мг/л БАП показники регенерації були 29,8 ± 2,05 % – для рослин сорту Лангедейкер, 27,1 ± 3,01 % – для рослин сорту Амагер, і 27,6 ± 2,08 % – для рослин сорту Харківська зимова.

Таблиця 1. Параметри росту рослин, що належать до відібраних сортів

Сорт	L, см	L ₁ , см	a, см	b, см	n	n _к
Амагер	6,2±0,531	6,3±0,657	2,8±0,303	2,6±0,309	3,3±0,497	3,7±0,221
Лангедейкер	4,8±0,336	6,9±0,517	4,1±0,198	4,3±0,212	3,2±0,423	5,2±0,318
Мегатон	2,2±0,318	5,7±0,359	3,7±0,206	3,5±0,288	3,1±0,257	3,9±0,359
Слава 1305	4,2±0,311	5,8±0,538	4,1±0,179	3,8±0,208	3,0±0,392	4,7±0,281
Харківська зимова	4,1±0,362	5,6±0,297	3,7±0,214	3,6±0,227	3,3±0,468	5,1±0,364

Примітка: L – довжина стебла, L₁ – довжина кореневої системи, a – довжина листової пластинки, b – ширина листової пластинки, n – кількість листків на рослину, n_к – кількість коренів на рослину.

Таблиця 2. Частота регенерації пагонів капусти із меживузлів

Сорт	0,5МС + 1 мг/л БАП, 0,1 мг/л НОК	0,5МС + 1 мг/л БАП, 1 мг/л НОК
Амагер	59,1 ± 1,76 %	28,7 ± 0,98 %
Лангедейкер	76,3 ± 0,84 %	54,6 ± 1,12 %
Мегатон	52,4 ± 1,27 %	24,2 ± 0,83 %
Слава 1305	62,4 ± 0,68 %	29,7 ± 1,07 %
Харківська зимова	69,6 ± 1,94 %	46,1 ± 2,11 %

Таблиця 3. Частота регенерації пагонів капусти із листових експлантів

Сорт	0,5МС + 2 мг/л БАП, 1 мг/л зеатину, 1 мг/л АБК, 1 мг/л НОК і 1 мг/л ГК	0,5МС + 3 мг/л БАП
Амагер	24,5 ± 1,86 %	27,1 ± 3,01 %
Лангедейкер	31,3 ± 1,74 %	29,8 ± 2,05 %
Мегатон	18,7 ± 1,46 %	21,8 ± 1,84 %
Слава 1305	22,7 ± 0,93 %	25,1 ± 1,76 %
Харківська зимова	28,2 ± 1,27 %	27,6 ± 2,08 %

При регенерації капусти з гіпокотилів на середовищі МС з половинним вмістом макросолей і 10 г/л сахарози, а також різним вмістом регуляторів росту, було показано, що оптимальними концентраціями регуляторів росту є: 0,1–0,3 мг/л НОК, 1–2 мг/л БАП. Найвищі показники регенерації з гіпокотилів показали сорти Лангедейкер (0,3 мг/л НОК, 1 мг/л БАП, 2 мг/л 2,4-Д; регенерація $81,8 \pm 2,71\%$), Слава 1305 (0,1 мг/л НОК, 1 мг/л БАП, 2 мг/л 2,4-Д; регенерація $76,2 \pm 2,13\%$), Харківська зимова (0,3 мг/л НОК, 1,5 мг/л БАП, 2 мг/л 2,4-Д; регенерація $78,7 \pm 1,97\%$). Таким чином, рослини цих сортів виявили найвищу регенераційну здатність, і можуть бути в подальшому результативно використані для потреб генетичної інженерії.

Висновки

У ході роботи було досліджено особливості росту і вкорінення в культурі *in vitro* рослин 19 сортів капусти білоголової (*B. oleracea*). Встановлено умови пророщування, які запобігають розвитку фунгального і

бактеріального ураження насіння. Проведено регенерацію рослин 5 сортів із різних типів експлантів: меживузлів, листкових, гіпокотилів. Встановлено, що найвищі показники регенерації виявляють рослини сортів Лангедейкер і Харківська зимова, незалежно від типу експланту. Найвищий відсоток регенерації спостерігається при використанні у якості експлантів меживузлів і гіпокотилів. Для подальшої роботи будуть використані сорти Лангедейкер і Харківська зимова та їх гіпокотилі у дослідах із генетичної трансформації.

Робота проводилася у рамках наукового проекту «Отримання та вивчення молекулярно-біологічних і генетичних особливостей стійких до гербіцидів сільськогосподарсько важливих культур» цільової комплексної міждисциплінарної програми наукових досліджень НАН України «Фундаментальні основи молекулярних та клітинних біотехнологій» (№ держреєстрації 0110U006082).

Література

1. Синская Е.Н. Род 649. Капуста – *Brassica* // Флора СССР / Ботанич. ин-т Акад. наук СССР; Гл. ред. акад. В. Л. Комаров; Ред. VIII тома Н. А. Буш. – М.–Л.: Изд-во Академии наук СССР, 1939. – VIII. – С. 459–466.
2. Тараненко А.М., Банникова М.О., Нітовська І.О., Моргун Б.В. Дослідження ефективності стерилізації насіння капусти городньої (*Brassica oleracea*) з використанням фунгіцидів // Тези VI Всеукраїнської науково-практичної конференції «Біотехнологія XXI століття», 5 квітня 2012 р. – Київ. – С. 118–119.
3. Пиголева С.В., Захарченко Н.С., Пиголев А.В., Троценко Ю.А., Бурьянов Я.И. Влияние колонизирующих метиловых бактерий на морфогенез и устойчивость к *Erwinia carotovora* сахарной свеклы и капусты белокачанной // Прикладная биохимия и микробиология. – 2009. – 49, № 6. – С. 670–676.
4. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant.* – 1962. – 15. – P. 473–497.
5. Сахно Л.А., Гочева Е.А., Комарницький І.К., Кучук Н.В. Стабільна експресія беспромоторного гена *bar* в трансформованих рослинах рапса // Цитология и генетика. – 2008. – № 1. – С. 21–28.
6. Городенська М.М., Нітовська І.О., Кучук М.В. Вивчення регенераційної здатності стеблових експлантів рослин родини Brassicaceae // Физиология и биохимия культурных растений. – 2007. – 39, № 3. – С. 255–263.

TARANENKO A.M., BANNIKOVA M.O., MORGUN B.V.

Institute of Cell Biology and Genetic Engineering, National Academy of Sciences of Ukraine, Ukraine, 03680, Kyiv, Akad. Zabolotnoho str., 148, e-mail: rotenar@rambler.ru, molgen@icbge.org.ua

VARIETY-DEPENDENT GROWTH DATA AND REGENERATION ABILITY OF DIFFERENT CABBAGE EXPLANTS *IN VITRO*

Aims. High nutritional and economic value of cabbage makes it an attractive model for biotechnology research. Thus, we were engaged in the selection of cabbage varieties, with the aim to get the transgenic cabbage in future. **Methods.** Using commercial fungicides, we established the conditions for the germination of seeds which prevent the development of fungal and bacterial infection of seeds. In addition we tested and selected nutrient media for regeneration of different explants of cabbage. As a basic medium the MS was used with various concentrations of plant growth regulators. **Results.** The conditions of growth and *in vitro* establishment of 19 varieties of cabbage have been studied. It was shown that the highest percentage of regeneration occurred when using the cabbage hypocotyl explants of Langedijker ($81.8 \pm 2.71\%$) and Kharkivska zymova ($78.7 \pm 1.97\%$) varieties but the best results were obtained for 5 varieties.

Conclusions. The optimum compositions of regenerative medium for each variety were defined. Explants of Langedijker and Kharkivska zymova will be used for the further genetic transformation experiments.
Key words: *Brassica oleracea* L., regeneration, explants, fungicide.

УДК 602.6:58:633.181.1

ШЕСТОПАЛ О.Л.¹, ЗАМБРІБОРЩ І.С.¹, ІГНАТОВА С.О.¹, ШПАК Д.В.²

¹ Селекційно-генетичний інститут – Національний центр насіннезнавства та сортовивчення, Україна, 65036, м. Одеса, Овідіопольська дорога, 3, e-mail: izambriborsh@gmail.com

² Інститут рису Української академії аграрних наук,

Україна, 75705, с. Антонівка, Скадовський р-н, Херсонська обл., e-mail: shpak_dmitry@mail.ru

ВПЛИВ ПОПЕРЕДНЬОЇ ОБРОБКИ ВОЛОТЕЙ НА МОРФОГЕНЕЗ В КУЛЬТУРІ ПИЛЯКІВ *ORYZA SATIVA* L.

За результатами наших попередніх (2011–2012 рр.) досліджень андрогенезу *in vitro* *Oryza sativa* L. [1, 2] показана перспективність та результативність проведення даних робіт в умовах Півдня України. Перевага методів культури *in vitro* над прийомами традиційної селекції стосується, насамперед, отримання гомозиготного лінійного матеріалу в значно короткий термін [3, 4]. Подальший розвиток досліджень андрогенезу *in vitro* рису можливий у напрямку збільшення числа подвоєних гаплоїдів серед рослин-регенерантів та підвищення адаптивного потенціалу останніх. Показано, що індукція андрогенного калюсу та подальша регенерація у рису підвиду *Indica* надзвичайно низькі, на відміну від подібних показників у сортів підвиду *Jaronica*. У рису, як показано різними авторами, частота індукції коливатиметься від 10 % до 100 % в залежності від генотипу [5]. Мета дослідження – вивчити вплив різних варіантів попередньої обробки волотей рису на процеси індукції та регенерації в культурі пиляків рису.

Матеріали і методи

В якості рослинного матеріалу застосовували пиляки гібридів F₂: Преміум х УкрНДС 7761 (№ 103); Агат х Віконт (№ 106); Агат х Аметист (№ 114); Адмірал х Хазар (№ 128); Рапан х Україна 96 (№ 131), які вирощували в рисових чеках Інституту рису (м. Скадовськ). Волоті зрізали, коли мікроспори у пиляках знаходились на стадії середньо-пізньої вакуолізації. Зрізані волоті, у покривному листку, поміщали у воду та водний розчин абсцизової кислоти (АБК) і зберігали 3–7 діб у кліматичній камері за температури + 6 °С – + 8 °С. Волоті, звільнені від покривного листка, поміщали у чашки Петрі (150 мм). Стерилізацію проводили розчином комерційного препарату

«Білізна» протягом 5 хв. Надалі зливали дезінфікуючий засіб і додавали 0,05 н розчин НСІ (10 хв.) з наступним п'ятиразовим промиванням дистильованою водою.

Для індукції новоутворень використовували живильне середовище N₆ за модифікацією Herath [6] з додаванням фітогормонів: 2,4-Д – 3 мг/л, НОК – 1 мг/л, кінетин – 1 мг/л і 60 г/л цукрози. Для культивування новоутворень використовували живильне середовище – МС з додаванням 1 мг/л БАП та 0,5 мг/л НОК. Для регенерації рослин – живильне безгормональне середовище MS із половинним складом макро- та мікросолей.

Пиляки експлантували на живильне середовище N₆ у чашки Петрі (ш 60 мм) та культивували у термостаті при + 25 °С. Новоутворення пересаджували у 2 етапи (I етап – через 4–5 тижнів культивування пиляків; II етап – через 7–8 тижнів культивування) на дане живильне середовище та культивували при освітленні та температурі + 26 °С.

Результати та обговорення

Проведено дослідження оцінки гаплопродукційної здатності п'яти гібридів F₂ рису, показана висока чутливість даних форм до наданих умов культивування пиляків *in vitro*. Слід зазначити, що значний рівень, як формування новоутворень, так і регенерації з них, був характерним для усіх наданих гібридних комбінацій (табл. 1), однак він мав нижчі показники в порівнянні з тогорічними результатами [2, 7].

Слід зазначити, що в нашій лабораторії (єдине місце на теренах України) дослідження в галузі біотехнології з отримання *in vitro* гаплоїдів рису проводяться з 2011 року. Наші дослідження спрямовані на модифікацію та адаптування оригінальних напрацьованих

методик андрогенезу рису дослідників з інших країн, оскільки кліматичні відмінності нашого регіону зумовлюють специфічні умови вирощування рису в Україні, і як, наслідок – створення унікальних генотипів.

За результатами нашого дослідження 2012 р. виявлено, що за наших умов вирощування рису для збільшення рівня формування новоутворень в культурі пиляків *in vitro* доцільно проводити 6–7 добу попередню обробку волотей у воді при +8–10°C у темряві. За даними літератури [8, 9] мінімальний строк попередньої обробки – від трьох до п'яти діб, а витримування при цьому донорного матеріалу у водному розчині АБК (0,5 мг/л) підвищує показники гаплопродукції. У зв'язку з цим, ми витримували зрізані волоті у воді (контроль) та у розчині АБК при + 8–10 °С протягом 3 і 7 діб. Надалі висаджували пиляки на живильне середовище і оцінювали кількість отриманих новоутворень (рис. 1).

Найбільший рівень новоутворень

виявлено у гібриду Рапан х Україна 96 (№ 131) за попередньої обробки волотей 3 доби у воді. Показано, що для двох досліджених гібридів (№ 103 та № 131) варіант тридодової холодової попередньої обробки волотей у воді виявився кращим за семидобову, а для № 106, № 114 та № 128 – навпаки.

Вплив АБК, що застосовували на етапі передобробки, на вихід новоутворень виявився неоднозначним. Гібрид F₂ Преміум х УкрНДС 7761 незалежно від тривалості попередньої обробки показав однаково високий рівень формування новоутворень, тоді як гібрид F₂ Агат х Віконт (№ 106) кращий результат показав на контрольному варіанті за семидобової холодової обробки волотей. Виявлено різкий негативний вплив на частоту формування новоутворень тривалої 7-додової холодової обробки волотей у розчині АБК (0,5 мг/л); зниження даного показника у гібридів F₂ за номерами 114, 128, 131 відбувалось у декілька разів (рис. 1).

Таблиця 1. Ефективність гаплопродукції в культурі пиляків *in vitro* рису

Генотип	Кількість пиляків	Варіант обробки	Кількість новоутворень		Кількість рослин-регенерантів			
			шт.	шт. / на 100 пиляків	зелених		альбіно	
					шт.	шт. / на 100 новоутворень	шт.	шт. / на 100 новоутворень
103	5096	К	1819	35,69 ± 0,67	5	0,27 ± 0,12	12	0,66 ± 0,19
	6817	АБК	3670	53,84 ± 0,60	42	1,14 ± 0,18	1	0,03 ± 0,03
106	5778	К	2218	38,39 ± 0,64	2	0,09 ± 0,06	0	0
	6341	АБК	1867	29,44 ± 0,57	40	2,14 ± 0,34	4	0,21 ± 0,11
114	3613	К	749	20,73 ± 0,67	13	1,74 ± 0,48	2	0,27 ± 0,19
	3956	АБК	1258	31,80 ± 0,74	25	1,99 ± 0,39	3	0,24 ± 0,14
128	1431	К	77	5,38 ± 0,60	1	14,29 ± 3,99	3	3,90 ± 2,21
	4675	АБК	905	19,36 ± 0,58	7	0,77 ± 0,29	0	0
131	2268	К	1519	66,98 ± 0,99	0	4,61 ± 0,54	13	0,86 ± 0,24
	2141	АБК	216	10,09 ± 0,65	3	1,39 ± 0,80	0	0

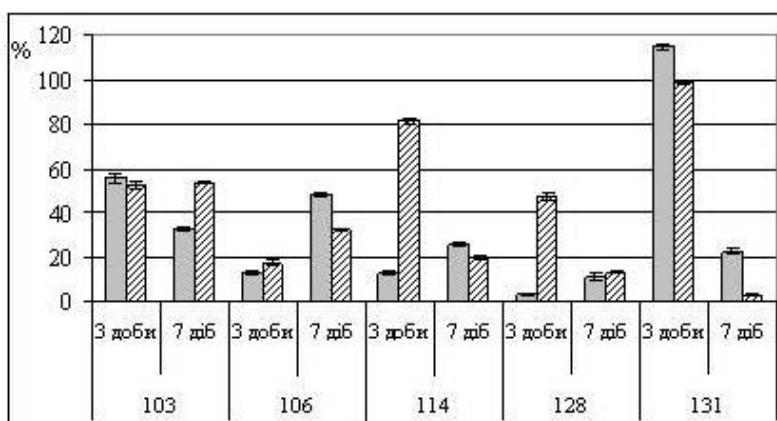


Рис. 1. Формування новоутворень (% від висаджених пиляків) в культурі пиляків рису за різних варіантів попередньої холодової обробки волотей : ■ – вода, ▨ – АБК

Слід зазначити, що за тридобової холодової попередньої обробки волотей рису у розчині АБК рівень формування новоутворень трьох гібридів був достовірно вищим за контрольний варіант, а у інших гібридів – на рівні контролю. Подальшу регенерацію з отриманих новоутворень проводили на поживному середовищі MS з гормонами [10]. Показано, що обидва варіанти передобробки сприяли регенерації як зелених, так і альбіносних рослин (табл. 2). Особливість процесу формування новоутворень в культурі пиляків рису: макроструктури формуються протягом тривалого часу (від одного до трьох місяців). Перший «збір врожаю» новоутворень відбувається на 25–30 добу культивування (рис. 2).

За подальшого культивування пиляків, через 3–4 тижня формуються нові новоутворення. За літературними даними та багатрічним особистим досвідом щодо отримання

регенерантів в культурі пиляків злаків (пшениця, ячмінь), морфогенний потенціал «пізніх» новоутворень є вкрай низьким відносно новоутворень «першого строку». Тому, одним із завдань нашого дослідження було вивчення регенераційного потенціалу двох «хвиль» сформованих новоутворень (табл. 2).

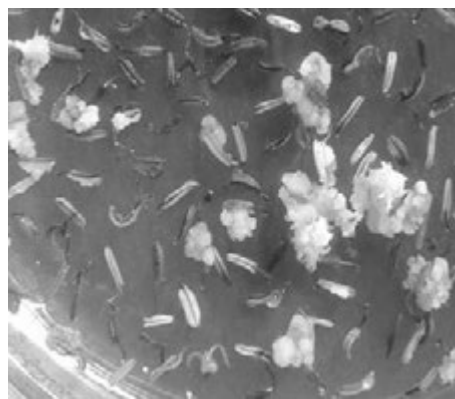


Рис. 2. Новоутворення на пиляках рису

Таблиця 2. Вплив передобробки та швидкості формування новоутворень на регенерацію в культурі *in vitro* пиляків рису

Генотип	Обробка волотей		Новоутворення, шт.		I строк				II строк			
	діб	розчин	I строк	II строк	Зелені		альбіно		Зелені		Альбіно	
					шт.	шт./100 новоутворень	шт.	шт./100 новоутворень	шт.	шт./100 новоутворень	шт.	шт./100 новоутворень
103	3	К	190	210	5	2,6 ± 1,2						
		АБК	165	257	16	9,7 ± 2,3	1	0,6 ± 0,6				
	7	К	654	765			10	1,5 ± 0,5			2	0,3 ± 0,2
		АБК	1417	1831	23	1,6 ± 0,3			3	0,2 ± 0,1		
106	3	К	200	0								
		АБК	60	133	3	5,0 ± 2,8	1	1,7 ± 1,7	27	20,3 ± 3,5	3	2,3 ± 1,3
	7	К	559	1459					1	0,1 ± 0,1		
		АБК	1011	663	11	1,1 ± 0,3						
114	3	К	61	117	2	3,3 ± 2,3						
		АБК	307	318	6	2,0 ± 0,8			9	2,8 ± 0,9		
	7	К	179	392	9	5,0 ± 1,6	2	1,1 ± 0,8				
		АБК	171	462					12	2,6 ± 0,7	3	0,6 ± 0,4
128	3	К	15	15	9	60,0 ± 12,6						
		АБК	150	248								
	7	К	20	27					2	7,4 ± 5,0	3	11,1 ± 6,0
		АБК	103	404	7	6,8 ± 2,5						
131	3	К	1015	243	50	4,9 ± 0,7			7	2,9 ± 1,1	5	2,1 ± 0,9
		АБК	3	156								
	7	К	41	220					13	5,9 ± 1,6	8	3,6 ± 1,3
		АБК	57	0	3	5,3 ± 3,0						
Середнє	К	2934	3448	75	2,6 ± 0,3	12	0,4 ± 0,1*	23	0,7 ± 0,1	18	0,5 ± 0,1*	
	АБК	3444	4472	69	2,0 ± 0,2	2	0,06 ± 0,04	51	1,1 ± 0,2	6	0,13 ± 0,1	

Примітка: * відмінності порівняно з контролем достовірні при $P < 0,05$.

Регенерацію зелених рослин спостерігали у всіх досліджених генотипів: від 0,1 до 60,0 шт. на 100 отриманих новоутворень (табл. 2). Однак кількість отриманих альбіносних рослин була значно нижчою порівняно із тогорічними результатами: 0,03–3,90 шт./100 новоутворень (табл. 1) у 2013 р. проти 9,64–22,41 шт./100 новоутворень у 2012 р.[2].

Аналізуючи отримані дані (табл. 2) виявити достовірний вплив варіанту тривалості попередньої холодової обробки на регенерацію зелених рослин не вдалося. Щодо впливу АБК, виявлено достовірно менший відсоток регенерації альбіносних регенерантів ніж у контрольному варіанті як для регенерації з першої хвили новоутворень, так і з другої. Цікаво, що при передобробці волотей з АБК мікроспори довше зберігають свій морфогенний потенціал і здатність формувати морфогенний

калюс, з якого надалі регенерують зелені рослини (рис. 3).

Таким чином, використання на етапі попередньої холодової обробки волотей розчину абсцизової кислоти (у концентрації 0,5 мг/л) в середньому позитивно впливає на процес формування новоутворень і сприяє низькому виходу альбіносних рослин-регенерантів серед достатньої кількості зелених регенерантів.

Висновки

У культурі *in vitro* пиляків рису посівного отримано 218 зелених рослин-регенерантів. Використання на етапі попередньої холодової обробки волотей розчину абсцизової кислоти (у концентрації 0,5 мг/л) в середньому позитивно впливає на процес формування новоутворень і сприяє низькому виходу альбіносних рослин-регенерантів за достатньої кількості зелених регенерантів.

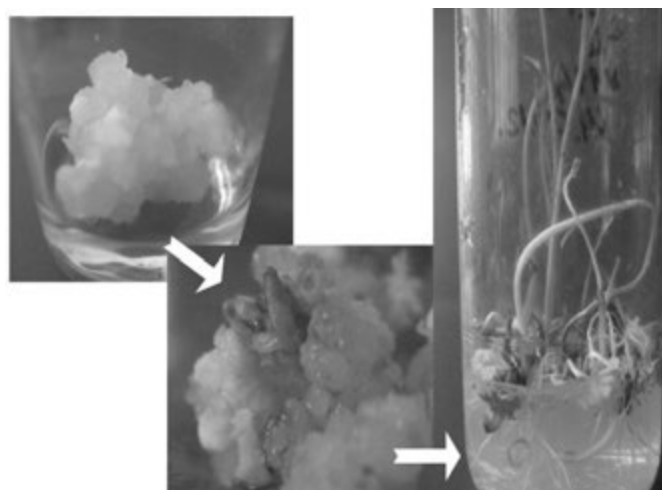


Рис. 3. Регенерація зелених рослин в культурі пиляків рису

Література

1. Замбрїборщ І.С. Дослідження андрогенезу *in vitro* рису (*Oryza sativa* L.) // Мікробіологія і біотехнологія. – 2011. – № 1, № 13. – С. 78–85.
2. Замбрїборщ І.С., Шестопал О.Л., Добрава Г.О., Шпак Д.В. Особливості андрогенезу *in vitro* міжсортних гібридів *Oryza sativa* L. української селекції // VIII Міжнар. наук. конфер. «Фактори експериментальної еволюції організмів». – Алушта, 2013. – 12. – С. 224–228.
3. Wang Li, Lin Gang, Zhao D, Wang F., Chen J. Tissue Culture System for Different Hybrid of Indica Rice // Journal of Northeast Agricultural University (English Edition). – 2011. – 18, N 2. – P. 13–17.
4. Harushima Y., Yano M., Shomura A., Sato M., Shimano T. A high density rice genetic linkage map with 2275 markers using a single F₂ population // Genetics. – 1998. – 148. – P. 479–494.
5. Wang C.C., Sun C.S., Chu C.S., Wu S.C. Studies on the albino pollen plantlets of rice // Proc. Symp. Plant Tissue Cult. Science Press, Peking. – 1978. – P. 149–160.
6. Herath H.M.I., Bandara D.C., Samarajeewa P.K. Effect of culture media for another culture of indica rice varieties and hybrids of indica and japonica // Tropical agricultural research & extension. – 2007. – 10. – P. 17–22.
7. Замбрїборщ І.С., Добрава Г.О., Паламарчук А.І. Вивчення гаплопродукційної здатності м'якої пшениці з пшенично-житніми транслокаціями // Міжнародна наукова конференція «Селекція та генетика сільськогосподарських рослин: традиції та перспективи» (до 100-річчя Селекційно-генетичного інституту – Національного центру насіннезнавства та сортовивчення), 17–19 жовтня 2012 р. – Одеса: СГІ-НЦНС УААН, 2012. – С. 370–371.

8. Rokhshana K., Shahinul I., Israt Ara, Narendra T., Bari M.A. Effect of cold pretreatment and different media in improving anther culture response in rice (*Oryza sativa* L.) in Bangladesh // Indian J. of Biotech. – 2012. – 11. – P. 458–463.
9. Rukmini M., Rao G.J.N., Rao R.N. Effect of cold pretreatment and phytohormones on anther culture efficiency of two indica rice (*Oryza sativa* L.) hybrids – Ajay and Rajalaxmi // Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences. – 2013. – 1, N 2. – P. 69–76.
10. Tala G., Khadidiatou N. *In vitro* production of double haploid plants from two rice species (*Oryza sativa* L. and *Oryza glaberrima* Steudt.) for the rapid development of new breeding material // Scientific Research and Essays. – 2010. – 5, N 7. – P. 709–713.

SHESTOPAL O.L.¹, ZAMBRIBORSHCH I.S.¹, IGNATOVA S.O.¹, SHPAK D.V.²

¹ Plant Breeding & Genetics Institute – National Center of Seed and Cultivar Investigation, Ukraine, 65036, Odessa, Ovidiopolskaya road, 3, e-mail: izambriborsh@gmail.com

² Rice Research Institute at Ukrainian Academy of Agrarian Sciences, Ukraine, 75705, Kherson region, Skadovsk district, Antonovka village, e-mail: shpak_dmitry@mail.ru

EFFECT OF PANICLE PRETREATMENT ON MORPHOGENESIS IN ANTHHER CULTURE *ORYZA SATIVA* L.

Aims. Study of the influence pretreatment of panicle on morphogenic potential of microspores in anther culture of rice. **Methods.** Obtaining of rice double haploid lines by anther culture *in vitro*. The statistical methods. **Results.** The influence different variants pretreatment of rice panicle on the processes of induction and regeneration in anther culture of rice were studied. The 218 green plants-regenerants were received. **Conclusions.** To increase the formation of embryo like structures in anther culture of rice panicles should be incubated for the pretreatment in water at 6–8°C during 3–7 days. The positive effect on the formation of embryoides and sufficient amount of green regenerants and the low formation albino regenerants from using the cold pretreatment of panicle by solution abscisic acid (0.5 mg/L) were showed.

Key words: rice hybrids, anther culture *in vitro*, double haploid.

UDC 581.5+57.04

SAKHNO L.O.

Institute of Cell Biology and Genetic Engineering NAS of Ukraine,

Ukraine, DSP-22, 03680, Kyiv, Zabolotnogo str., 148, e-mail: sakhno@icbge.org.ua

SEED INTERFERON IMBIBITION LEADS SEEDLING GROWTH ENHANCEMENT ACCOMPANYING BY INCREASE IN SUPEROXIDE DISMUTASE ACTIVITY

Interferons (INFs) are proteins induced in the genome of vertebrates by viruses, double-stranded RNA, and some other agents [1]. It was shown unfractionated human leukocyte INF, as well as highly purified subspecies of this INF (alpha and beta), and a purified recombinant of human leukocyte INF produced in bacteria was active in suppressing multiplication of tobacco mosaic virus (TMV) in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) leaf discs [2]. INF-gamma application increased cytokinin activity and induced synthesis of pathogenesis-related and heat shock proteins in tobacco and wheat (*Triticum aestivum* L.) tissues [3]. Human INFs (alpha, beta, and gamma) antiviral activities were shown in datura *Datura stramonium* L. infected by TMV and globe amaranth *Gomphrena globosa* L. inoculated by potato virus X [4]. Some

studies were conducted for *inf* gene expression in plants to obtain ones with improved virus tolerance [5]. Numerous researches were focused to produce recombinant INFs in plants [6]. But INF effects did not investigate at whole plant level under non-stress conditions.

In animal cells exogenous INF-alpha application is accompanied by superoxide radical formation and superoxide dismutase (SOD) activity increasing. Thus, preincubation of intact human neutrophils with INF-alpha and subsequent stimulation with calcium ionophore A23187 significantly enhanced superoxide radical generation that reduced nitroblue tetrazolium into blue formazan [7]. Mouse (L, L929, L1210 S6, and L1210 R3) and a human (WISH) cell lines pretreated with homologous INF and different

concentrations of diethyldithiocarbamate (DDC) for various periods of time were also tested for their ability to support virus multiplication. Treatment of cells with DDC resulted in dose- and time-dependent inhibition of SOD activity and, simultaneously, in the reduction of antiviral protection by exogenous INF [8]. In addition, the antioxidant activity of INF- α was examined on rat hepatocytes undergoing oxidative stress and hepatic stellate cells (HSCs) in primary culture as well as isolated rat liver mitochondria [9]. INF- α activity led to dose-dependent increase of the immunoreactive protein levels of copper, zinc- and manganese-dependent SOD both in stressed hepatocytes and activated HSCs.

In plants elevated SOD activity is related with enhanced tolerance to various stresses in term of larger plant biomass which resistant cultivars or *sod* overexpressing plants can form in comparison with sensitive or wild-type ones [10, 11]. The aim of our study was to estimate effect of recombinant human INF- α application on canola seed germination and seedling growth by using fresh weight, total soluble protein content, and SOD activity evaluation.

Materials and methods

Plant material and INF treatment. Seeds of spring canola (*Brassica napus* L.) cv Lega were surface sterilized, dried by filter paper and imbibed on water INF solutions with different concentrations (10^2 , 10^3 , 10^4 IU/ml) for 30 min. Seeds were kindly provided by Slisarchuk M.V. (Department of linseed and rapeseed selection and seed production of National Scientific center "Institute of UAAS on agriculture"). There were three control treatments namely 1) pure water, 2) 10^2 IU/ml INF inactivated by boiling, 3) 10^2 IU/ml INF with 2 mM DDC. Then seeds were dried by filter paper again and placed into Petri dish with agar solidified MS [12] medium without hormones. Ten seeds were incubated in each Petri dish. Germination and seedling growth took place in thermostat at 24 °C. Laferon (recombinant human interferon α 2b, 1 MIU, Inter-Pharm-Biotek, Ukraine) was used for INF solution preparation. Seedling total fresh weight (FW), FW of cotyledons, hypocotyls and roots were measured using the scale Pioneer™ PA413C (Ohaus Corporation, USA).

The total soluble protein (TSP) content was determined using Bradford method [13]. The extracts from plant leaves were prepared in triple volume of 100 mM Tris/HCl buffer, pH 8.0. The optical density was detected at 595 nm by BioPhotometer Eppendorf, v.1.35 (Germany).

SOD activity was measured using photochemical oxidation of nitro blue tetrazolium method [14]. Fresh plant material (100 mg) was pounded with 1 ml of Tris-HCl buffer (pH 8.0) in mortar and centrifuged at 13000 g (4°C) for 15 min. The supernatant was used for analyses. Formazan formation was held in Eppendorf tube (1.5 ml). Plant extracts could inhibit this reaction due to SOD activity. One tube for each probe was retained in the dark. The others were illuminated with white light lamp (fluorescent lamp T5/G5, model ELI-230A-T5-8W) during 5 min in the thermostat at 24°C. Null probe had no leaf extract in its composition. In this probe oxidation was complete. The optical density of illuminated probe was measured at 550 nm by BioPhotometer Eppendorf (Germany) versus the optical density of dark probe.

Statistical analysis was performed according to Duncan multiple range test. Differences from control values were significant at $p \leq 0.05$. Three independent experiments were conducted in five replications. There were nine replications for formazan measurement.

Results and discussion

Canola seed germination started two days after experiment beginning. No differences in germination were detected between controls and INF treated seeds (fig. 1, A). Hypocotyls and roots of experimental seedlings were longer in comparison with controls (fig. 1, B). Seedlings which obtained from 10^3 IU/ml INF treated seeds were larger ones produced from seeds treated by 10^2 IU/ml INF (fig. 1, B) and 10^4 IU/ml INF solutions.

In seven-day-old seedlings total FW, FW of cotyledons, hypocotyls and roots were measured and these parameters for single seedling were calculated (fig. 2, A). INF application stimulated seedling biomass accumulation in canola up to 2, 2.4 and 1.7-fold after the imbibition with 10^2 , 10^3 and 10^4 IU/ml INF solutions, respectively, in terms of higher FW of hypocotyls and roots.

Differences in cotyledon TSP were not determined, but in hypocotyls TSP was 2 times higher in control seedlings in comparison with treated ones (fig. 2, B).

SOD activity was significantly lower in control seedlings (both cotyledons and hypocotyls) in comparison with INF treated ones (fig. 2, C). Moreover the highest SOD activity was detected in seedlings obtained from 10^3 IU/ml INF treated seeds. It was up to 2.18- and 1.47-fold higher in cotyledons and hypocotyls, respectively, in the latter in comparison with controls).

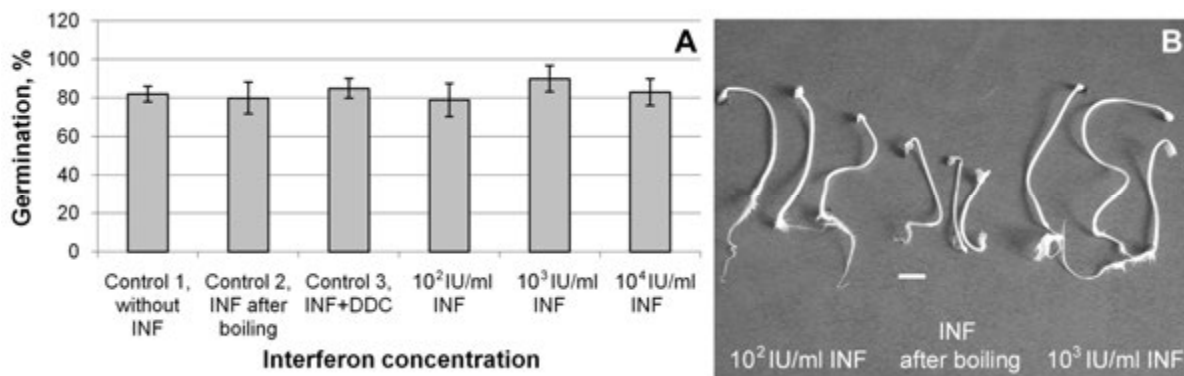


Fig. 1. Canola cv Lega seed germination (A); 7-day-old seedlings were grown on agar solidified hormone free MS medium in thermostat at 24 °C after seed treatment by water solutions with 10² IU/ml INF (left), INF inactivated by boiling (middle), and 10³ IU/ml INF, (right) (B). Scale bar: 1 cm

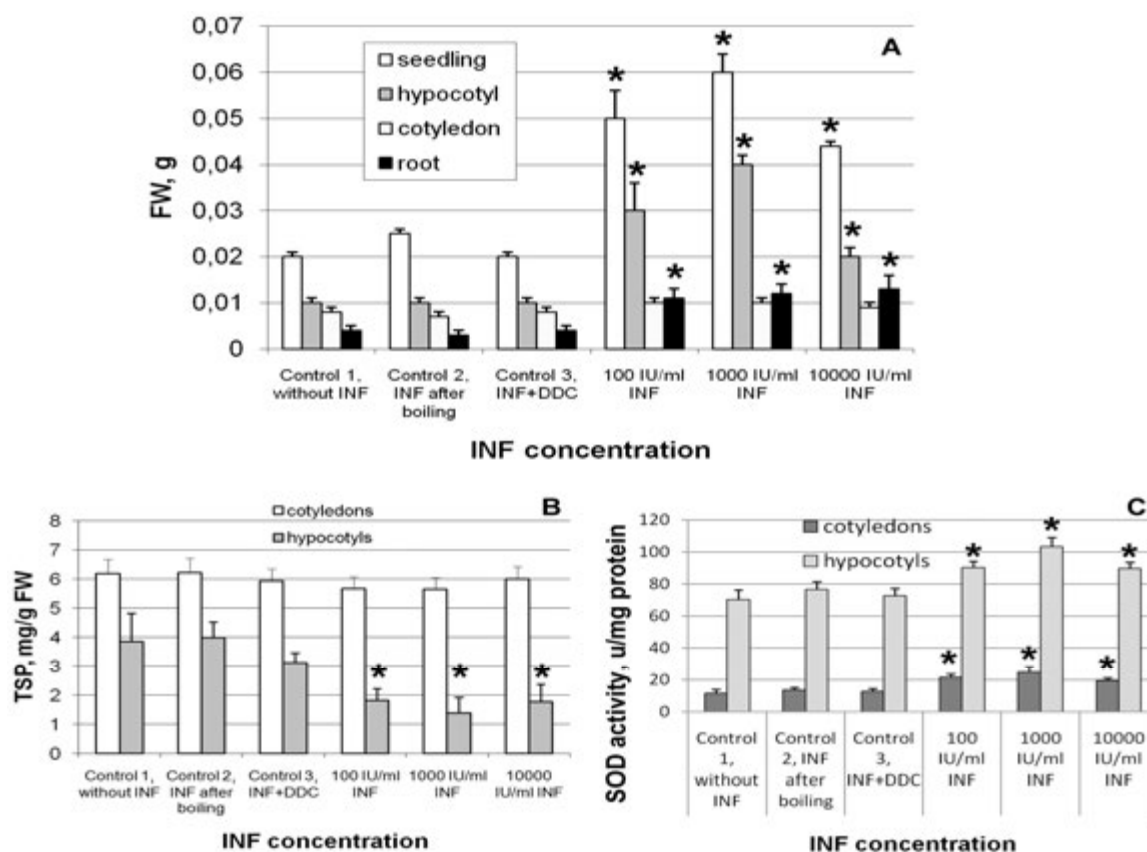


Fig. 2. Physiological and biochemical parameters of canola seedlings after INF imbibition (growth in thermostat at 24 °C): A – fresh weight of single 7-day-old seedling, B – cotyledon and hypocotyl total soluble protein content, C – SOD activity in cotyledons and hypocotyls. Error bars represent mean±one standard deviation and asterisk * indicates significant differences between experimental values compared with control ones ($p \leq 0.05$)

It was shown plant growth could be affected by treatments using substances both plant and animal origin. Thus, the growth of *Arabidopsis thaliana* L. seedlings was promoted by progesterone (mammalian gonadal hormone) at low

concentrations but suppressed at higher concentrations under both light and dark growth conditions. The growth of the gibberellin-deficient mutant of pea (*Pisum sativum*) was also promoted by progesterone [15]. Exogenous melatonin

treatment of wild type rice as well as its accumulation due to sheep serotonin N-acetyltransferase overexpression in transgenic one enhanced root growth by seminal root elongation [16]. Under non-stress conditions SOD activity increment by 10 % was detected in transgenic rice in comparison with wild-type plants. The melatonin-treated maize (*Zea mays* L.) plants produced up to 20 % more corn than controls [17]. Salicylic acid induced the synthesis of antioxidant enzymes (SODs) in treated *Arabidopsis* seedlings and improved their salinity tolerance [18]. In our canola seedlings FWs of control ones were lower in comparison with INF treated. Moreover INF dose-dependent increase in SOD activity was also detected in the latter.

SOD gene overexpression led to biomass enhancement both in favourable and stress conditions in laboratory as well as under field trials in alfalfa *Medicago sativa* L. [19], canola [20], rice *Oryza sativa* L. [21], cotton *Gossypium barbadense*

L. [22]. In plants expressing *huINF62b* gene SOD activity increase under non-stress *in vitro* conditions was detected in transgenic canola [23] and chicory (*Cichorium intybus* L.) [24]. We propose exactly heterologous gene expression resulting recombinant human INF-alpha accumulation affects SOD activity and others physiological and biochemical parameters in these plants.

Thus, substances which involve changes in SOD activity could affect seedling growth. Produced in bacteria human recombinant INF-alpha 2b caused FW improvement in canola seedlings.

Conclusions

Human recombinant INF-alpha 2b application caused an dose-dependent increase in canola seedling biomass (up to 2.4-fold) during *in vitro* growth. SOD activity rise and its positive correlation to FW accumulation were detected for these seedlings. We suppose SOD activity increment which occurred due to seed INF imbibition improved plant growth.

References

1. Staeheli P. Interferon-induced proteins and the antiviral state // *Adv. Virus Res.* – 1990. – 38. – P. 147–200.
2. Orchansky P., Rubinstein M., Sela I. Human interferons protect plants from virus infection // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* – 1982. – 79, N 7. – P. 2278–2280.
3. Kulaeva O.N., Fedina A.B., Burkhanova E.A., Karavaiko N.N., Karpeisky M.Ya., Kaplan I.B., Taliansky M.E., Atabekov J.G. Biological activities of human interferon and 2'-5' oligoadenylates in plants // *Plant Mol Biol.* – 1992. – 20, N 3. – P. 383–393.
4. Vicente M., De Fazio G., Menezes M.E., Golgher R.R. Inhibition of Plant Viruses by Human Gamma Interferon // *J. Phytopathology.* – 1987. – 119, N 1. – P. 25–31.
5. Смирнов С.П., Крашенинникова Л.В., Пухальский В.А. Устойчивость к вирусу табачной мозаики у трансгенных растений табака, продуцирующих б-интерферон человека // *Докл. АН СССР.* – 1991. – 317, № 3. – С. 732–734.
6. Arlen P.A., Falconer R., Cherukumilli S., Cole A., Cole A.M., Oishi K.K., Daniell H. Field production and functional evaluation of chloroplast-derived interferon- α 2b // *Plant Biotechnology Journal.* – 2007. – 5, N 4. – P. 511–525.
7. Al-Shabanah O.A., Mansour M.A., Elmazar M.M. Enhanced generation of leukotriene B4 and superoxide radical from calcium ionophore (A23187) stimulated human neutrophils after priming with interferon-alpha // *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.* – 1999. – 106, N 1–2. – P. 115–128.
8. Pottathil R., Chandrabose K.A., Cuatrecasas P., Lang D.J. Establishment of the interferon-mediated antiviral state: possible role of superoxide dismutase // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 1981. – 78, N 6. – P. 3343–3347.
9. Lu G., Shimizu I., Cui X., Itonaga M., Tamaki K., Fukuno H., Inoue H., Honda H., Ito S. Interferon-alpha enhances biological defense activities against oxidative stress in cultured rat hepatocytes and hepatic stellate cells // *J. Medical Investigation.* – 2002. – 49, N 3–4. – P. 172–181.
10. Jiang J., Su M., Chen Y., Gao N., Jiao C., Sun Z., Li F., Wang C. Correlation of drought resistance in grass pea (*Lathyrus sativus*) with reactive oxygen species scavenging and osmotic adjustment // *Biologia.* – 2013. – 68, N 2. – P. 231–240.
11. Sakhno L.O. Plant biomass increase: recent advances in genetic engineering// *Biopolym. Cell.* – 2013. – 29, N 6. – P.443–453.
12. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol Plant.* – 1962. – 15, N 3. – P. 473–497.
13. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal. Biochem.* – 1976. – 72, N 2. – P. 248–254.
14. Beyer W.F., Fridovich I. Assaying for superoxide dismutase activity some large consequences of minor changes in conditions // *Anal. Biochem.* – 1987. – 161, N 2. – P. 559–566.
15. Iino M., Nomura T., Tamaki Y. *et al.* Progesterone: Its occurrence in plants and involvement in plant growth // *Phytochemistry.* – 2007. – 68, N 12. – P. 1664–1673.

16. Park S., Back K. Melatonin promotes seminal root elongation and root growth in transgenic rice after germination // *J. Pineal Res.* – 2012. – 53, N 4. – P. 385–389.
17. Tan D.-X., Hardeland R., Manchester L.C., et al. Functional roles of melatonin in plants, and perspectives in nutritional and agricultural science // *J. Exp. Bot.* – 2012. – 63, N 2. – P. 577–597.
18. Rajjou L., Belghazi M., Huguet R., Robin C., Moreau A., Job C., Job D. Proteomic Investigation of the Effect of Salicylic Acid on Arabidopsis Seed Germination and Establishment of Early Defense Mechanisms // *Plant Physiology.* – 2006. – 141, N 3. – P. 910–923.
19. McKersie B.D., Bowley S.R. Jones K.S. Winter survival of transgenic alfalfa overexpressing superoxide dismutase // *Plant Physiology.* – 1999. – 119, N 3. – P. 839–847.
20. Gusta L.V., Benning N.T., Wu G., Luo X., Liu X., Gusta M. L., McHughen A. Superoxide dismutase: an all-purpose gene for agri-biotechnology // *Mol. Breeding.* – 2009. – 24, N 2. – P. 103–115.
21. Chen Z., Pan Y.H., An L.Y., Yang W.J., Xu L.G., Zhu C. Heterologous expression of a halophilic archaeon manganese superoxide dismutase enhances salt tolerance in transgenic rice // *Rus. J. Plant Physiol.* – 2013. – 60, N 3. – P. 359–366.
22. Luo X., Wu J., Li Y., Nan Z., Guo X., Nan Z., Guo X., Wang Y., Zhang A., Wang Z., Xia G., Tian Y. Synergistic Effects of *GhSOD1* and *GhCAT1* Overexpression in Cotton Chloroplasts on Enhancing Tolerance to Methyl Viologen and Salt Stresses// *PLoS ONE.* – 2013. – 8, N 1: e54002. doi:10.1371/journal.pone.0054002.
23. Sakhno L.O., Slyvets M.S. Superoxide dismutase activity in transgenic canola // *Cytology and Genetics.* – 2014. – 48, N 3. – P. 12–17.
24. Kvasko O. Yu., Matvieieva N. A. Increasing of antioxidant and superoxide dismutase activity in chicory transgenic plants // *Biopolym.Cell.* – 2013. – 29, N 2. – P. 163–166.

SAKHNO L.O.

*Institute of Cell Biology and Genetic Engineering NAS of Ukraine,
Ukraine, DSP-22, 03680, Kyiv, Zabolotnogo str., 148, e-mail: sakhno@icbge.org.ua*

SEED INTERFERON IMBIBITION LEADS SEEDLING GROWTH ENHANCEMENT ACCOMPANYING BY INCREASE IN SUPEROXIDE DISMUTASE ACTIVITY

Aim. We studied canola (*Brassica napus* cv Lega) *in vitro* seedling growth after seed imbibition by human recombinant interferon alpha 2b (INF) produced in bacteria. **Methods.** Germination, seedling fresh weight (FW), total soluble protein (TSP), and superoxide dismutase activity (SOD) measurements were conducted. **Results.** INF applications did not improve canola seed germination. TSP was not affected in cotyledons and decreased in hypocotyls. Seedling FW was increased by 100 % (10^2 IU/ml INF), 140 % (10^3 IU/ml INF), and 70 % (10^4 IU/ml INF) in comparison with controls (treatments by pure water, or INF after boiling, or INF with diethyldithiocarbamate) under growth in thermostat at 24°. Differences in seedling FW were due to differences in hypocotyl and root FWs. SOD activity increased up to 2.18-fold in cotyledons and 1.47-fold in hypocotyls. **Conclusions.** Human recombinant INF alpha 2b application caused an dose-dependent increase of canola seedling biomass (up to 2.4-fold) during *in vitro* growth. SOD activity rise and its positive correlation to FW accumulation were detected in these seedlings. We suppose SOD activity increment which occurred due to seed INF imbibition improved plant growth.

Key words: canola, fresh weight, interferon, superoxide dismutase activity.

ПРИКЛАДНА ГЕНЕТИКА І СЕЛЕКЦІЯ

УДК 633.31:631.527

БУГАЙОВ В.Д.¹, МАМАЛИГА В.С.², ГОРЕНСЬКИЙ В.М.¹, МАКСІМОВ А.М.²

¹ Інститут кормів та сільського господарства Поділля НААН,

Україна, 21100, м. Вінниця, пр. Юності, 16, e-mail: bugayov1949@yandex.ru

² Вінницький національний аграрний університет,

Україна, 21008, м. Вінниця, вул. Сонячна, 3, e-mail: stepanovich1@yandex.ru

ОЦІНКА ТА СТВОРЕННЯ ВИХІДНОГО МАТЕРІАЛУ ДЛЯ СЕЛЕКЦІЇ ЛЮЦЕРНИ ПОСІВНОЇ В УМОВАХ ПІДВИЩЕНОЇ КИСЛОТНОСТІ ҐРУНТІВ

Люцерна посівна – одна з найбільш продуктивних кормових культур. Важливу роль має ця культура і в біологізації землеробства. Проте за своїми біологічними особливостями рослини люцерни нормально розвиваються лише на ґрунтах з рН сольової витяжки від 6,0 до 7,5, тобто близької до нейтральної.

У той же час, в Україні за результатами агрохімічної паспортизації орних земель виявлено 3,7 млн. га (17 %) кислих ґрунтів, з них такі ґрунти на Поліссі займають 37 %, а в зоні Лісостепу – 25 %. Відмічається стійка динаміка до збільшення площ підкислених ґрунтів [1]. Такий стан сільськогосподарських земель та необхідність подальшого розширення посівів люцерни посівної диктує необхідність розвитку селекційних технологій з едафічної селекції і створення сортів люцерни, здатних нормально продукувати в умовах підвищеної кислотності ґрунту.

Селекція на стійкість до токсичності кислих ґрунтів стала можливою завдяки дослідженням спадковості ознаки стійкості до іонів алюмінію (Al^{3+}). Генетична та хромосомна локалізація генів стійкості до алюмінію найширше вивчена у зернових культур (пшениця, жито, тритикале, ячмінь, овес). Аналогічні дослідження з даного напрямку проводяться з бобовими (соя, горох, конюшина, частково люцерна) [2–6]. Зокрема, у люцерни встановлено, що стійкість до іонів алюмінію знаходиться під генетичним контролем, однак не виявлені та не ідентифіковані специфічні гени, що відповідають за цю ознаку [7]. Важливим при цьому є наявність відповідного вихідного матеріалу.

Матеріали і методи

Дослідження з оцінки та створення перспективного вихідного матеріалу проводились на дослідних полях Інституту кормів та сільського господарства Поділля

НААН в 1985–2012 рр. Ґрунти – сірі опідзолені з показником рН сольової витяжки від 5,0 до 5,5 та гідролітичною кислотністю 2,1–2,4 мг/екв. на 100 г ґрунту.

В якості вихідного матеріалу використовували селекційні сорти, місцеві дикорослі популяції люцерни мінливої і люцерни жовтої в кількості 394 сортозразки різного еколого-географічного походження та 87 гібридів, створені з їх участю. Посів колекційного та гібридного розсадників проводили вручну на ділянках 1,1–3,0 м літнім посівом безпокровним способом широкорядно (0,45 м).

Результати та обговорення

У результаті багаторічних досліджень із 394 колекційних сортозразків люцерни різного еколого-географічного походження виділені генотипи, толерантні до кислотності ґрунту з відносно високою кормовою і насінневою продуктивністю. Так, у середньому за 1986–1987 рр. за врожаєм сухої речовини (+ 10–19 % до стандартного сорту Веселоподолянська 11) виділились сортозразки: Тайожна (Росія); Anchor (США); Alfa II Lot B-001, Alfa II Lot B-003, Alfa II Lot B-004, Tuna і Sv-640 (Швеція); Du Puits E 4001/75 (Іспанія); Місцева (Росія); Комерційна 2-22-74 (Англія). Урожай сухої речовини стандартного сорту Веселоподолянська 11 складав 1,15 кг/м². Виявлено значний негативний вплив підвищеної кислотності ґрунту на формування насінневої продуктивності досліджуваних сортозразків. Більшість сортозразків взагалі не формували насіння в таких умовах.

Досить високим рівнем урожайності насіння характеризувались сорти з північних регіонів Європи, Канади і США. Із сортів української селекції виділився лише сорт Ярославна. При середній врожайності стандартного сорту Веселоподолянська 11 –

8,8 г/м² вказані сорти перевищили його за цим показником на 295–601 %. Урожайність сухої речовини таких сортів була достовірно нижчою стандартного сорту Веселоподолянська 11 (табл. 1).

За результатами послідовних досліджень (2012–2013 рр.) виділені як перспективні для подальшої селекції на стійкість до кислотності

ґрунтів ще 8 колекційних сортозразків. При цьому за стандарт взято сорт Синюха, враховуючи його підвищену стійкість до кислотності ґрунтів. Сортозразки Kisvardai (Угорщина), Месопотамська (Ірак), Місцева (Бразилія), Місцева (Еквадор) забезпечили в таких умовах підвищення кормової на 9–21 % та насінневої продуктивності на 14–78 % (табл. 2).

Таблиця 1. Характеристика колекційних зразків люцерни, виділених за насінневою продуктивністю на фоні підвищеної кислотності ґрунту (рН 5,2–5,3) (посів 1985 р., 1986–1987 рр.)

№ п/п	№ за каталогом ВІР	Сорт, походження	Урожай			
			насіння		суха речовина	
			г/мІ	% до St	кг/мІ	% до St
1		Веселгоподолянська 11(St)	8,8	100	1,15	100
2	40845	Ellerslie I, Канада	52,9	601	0,42	36,5
3	31071	Місцева 152, Литва	40,2	457	0,9	78,3
4	42257	Місцева, Данія	39,3	447	0,92	80
5	36622	Місцева, США	36,6	416	0,75	65,2
6	25784	Йигева 118, Естонія	35,7	406	0,92	80
7	38377	Місцева, Польща	34	386	0,96	83,4
8	42709	Verko, ФРН	33,1	376	0,78	67,8
9	42258	Vika, Данія	32,5	369	0,96	83,5
10	38914	Жидруне, Литва	32,3	367	0,74	64,3
11	39957	Agate, США	32	364	0,65	56,5
12	39111	Sverre, Швеція	31,1	353	0,91	79,1
13	31075	Межотненська, Литва	31	352	0,98	85,2
14	42716	Vela, Данія	29,3	333	0,71	61,7
15	4478	Ярославна, Україна	26	295	0,72	62,6
НІР _{0,05}						
1986			2,3		0,04	
1987			1,8		0,05	

Таблиця 2. Характеристика колекційних сортозразків люцерни з підвищеною кормовою та насінневою продуктивністю на фоні підвищеної кислотності ґрунту (рН 5,2–5,3) (посів 2010 р., 2011–2012 рр.)

№ п/п	Колекційний сортозразок	Висота рослин, см	Облистяність, %	Урожай			
				сухої речовини		насіння	
				кг/мІ	% до St	г/мІ	% до St
1	Синюха (St)	62	41	0,98	100	54,1	100
2	Kisvardai (Угорщина)	67	49	1,18	121	66,5	123
3	Месопотамська (Ірак)	72	43	1,19	121	92,2	171
4	Севані-1 (Росія)	59	49	1,13	116	54,4	101
5	Місцева (Бразилія)	67	43	1,1	112	91,7	169
6	Місцева (Еквадор)	67	48	1,07	109	96,2	178
7	Mogemmona (Італія)	58	46	1,04	106	61,5	114
8	Polihibrido Manfredi (Аргентина)	68	43	1,02	104	72,2	133
9	WL 508 (США)	68	46	1,01	103	63,7	118
НІР 0,05			2011р.	0,16	4,1		
			2012р.	0,05	2,5		

З використанням виділених у попередні роки колекційних сортозразків створено гібридний матеріал в кількості 87 популяцій та проведена його оцінка (табл. 3). З них 7 гібридних популяцій (F₂) в середньому (2011–2012 рр.) перевищили стандартний сорт Синюха за врожаєм сухої речовини на 2–8 % і насіння на 8–58 %.

За кормовою та насінневою продуктивністю гібриди F₂ в середньому за 2 роки (2011–2012 рр.) були на рівні або перевищували стандартний

сорт Синюха відповідно на 4–8 % і 8–58 %.

Висновки

Одержані результати досліджень свідчать про високу цінність як генетичних джерел ознаки толерантності до підвищеної кислотності ґрунтів сортозразків Жидруне (Литва), Vika (Данія), Ярославна та Синюха (Україна), Mega (Швеція) та перспективного вихідного матеріалу, гібридних популяцій, одержаних з їх участю.

Таблиця 3. Результати оцінки гібридів F₂ люцерни посівної з підвищеною кормовою та насінневою продуктивністю (рН 5,2–5,3) (посів 2010 р., 2011–2012 рр.)

№ п/п	Гібридна популяція	Висота рослин, см	Облистяність, %	Урожай				
				суха речовина		насіння		
				кг/мІ	% до St	г/мІ	% до St	
1	Синюха (St)	62	41	0,98	100	54,1	100	
2	Синюха / Жидруне	63	50	1,06	108	58,4	108	
3	Синюха / Vika	68	44	1,02	104	66,8	123	
4	Жидруне / Vika	67	47	1,0	102	73,2	135	
5	Ярославна / Синюха	64	47	0,99	101	54,3	100	
6	Ярославна / Жидруне	66	45	0,98	100	52,2	96	
7	Grilys / Mega	63	47	0,98	100	61,7	114	
8	Жидруне / Mega	67	45	0,98	100	85,4	158	
				НІР 0,05				
				2011р.	0,13		2,4	
				2012р.	0,04		2,7	

Література

1. Національна доповідь про стан родючості ґрунтів України за ред. Балюка С.А., Медведєва В.В., Тараріко О.Г. та ін. – К., 2010. – С. 16–22.
2. Bouton J.H. Screening the alfalfa core collection for acid soil tolerance // *Crop Sci.* – 1996. – № 36. – P. 198–200.
3. Camardo C.E.O., Terreira Filko A.W.P., Tulmam Neto A. Genetic diversity in wheat and breeding for tolerance to acid soils / *Induced Mutat. And Mol. Teclm. Crop Improv // Proc. Int. Symp. Vienua.* – 1995. – P. 321–333.
4. Campbell T.A., Jackson P.R., Baligar V.C. Diallel analysis of tolerance to aluminium in alfalfa // *Euphytica.* – 1993/1994. – 72, is. 3. – P. 157–162.
5. Xianguang Zhang, Alan Humphries, Geoff Auricht Genetic variability and inheritance of aluminium tolerance as indicated by long root regrowth in lucerne (*Medicago sativa* L.) // *Euphytica.* – September 2007. – 157, is. 1–2. – P. 177–184.
6. Жученко А.А. Мобилизация генетических ресурсов цветковых растений на основе их идентификации и систематизации. – М.: Типография, 2012. – 584 с.
7. Климов С.В. Селекция сельскохозяйственных культур на устойчивость к кислотности почвы // *Сельское хозяйство за рубежом.* – 1984. – № 10. – С. 18–22.

BUGAYOV V.D.¹, MAMALYGA V.S.², GORENSKIY V.M.¹, MAKSIMOV A.M.²

¹ *Institute of Feeds of National Academy of Agrarian Science, Ukraine, 21100, Vinnitsa, Yunosti, 16, e-mail: bugayov1949@yandex.ru*

² *Vinnytsia National Agrarian University, Ukraine, 21008, Vinnitsa, Sun str., 3, e-mail: stepanovich1@yandex.ru*

INITIAL MATERIAL FOR ALFALFA BREEDING ON THE CONDITION OF HIGH ACIDITY

Aims. The estimation and creation of the outgoing material for alfalfa crop selection in enhanceable acidity of soil (pH 5.0–5.5). The estimation of collective and hybrid material was done according common methods.

Results. According to results of long-term researches of 394 collective sort standards of alfalfa crop of various ecogeographical origin, the genotypes that are tolerant to the soil acidity with the relatively high feeding and seed productivity are mentioned. With the usage of mentioned in recent years collective sort standards the hybrid material has been created in the amount of 87 populations and the estimation of it has been done. Among them there are 7 hybrid populations (F₂) which exceed the average (in 2011–2012) the standard sort Syniukha as to the crop of the dry material 2–8 and seeds 8–58 %. **Conclusions.** The received results of investigation prove the high estimation as genetic sources tolerant signs to the higher soil acidity of sort standards Zhydrune (Litva), Vika (Denmark), Yaroslavna and Syniukha (Ukraine), Mega (Switzerland) and the perspective outgoing material hybrid populations received with their participation.
Key words: alfalfa crop, selection, soil acidity.

УДК 633.15:631.524:575.113:542.1

БУКРЄЄВА Н.І., ДОМЕНЮК В.П., БЕЛОУСОВ А.О., СОКОЛОВ В.М., СИВОЛАП Ю.М.

Селекційно-генетичний інститут – Національний центр насінництва та сортовивчення, Україна, 65036, м. Одеса, вул. Овідіопольська дорога, 3, e-mail: natastor@rambler.ru

МОЛЕКУЛЯРНІ МАРКЕРИ В ПРОГНОЗУВАННІ ГЕТЕРОЗИСУ У КУКУРУДЗИ

На сучасному етапі однією з головних задач селекції кукурудзи стає вирішення проблем як використання гетерозису так і поліпшення якості врожаю. Використання досягнень молекулярної генетики і, перш за все, ДНК-маркерів поглиблює знання про організацію та мінливість геному цієї культури і дозволяє вдосконалити селекційний процес та підвищити ефективність селекції і насінництва. Отже, добір конкретних індивідуумів з бажаними ознаками є фундаментальною основою селекції рослин.

Добір звичайно включає в себе візуальну оцінку селекційної популяції за одним або кількома ознаками в польових або тепличних випробуваннях (наприклад, агрономічні ознаки, стійкість до хвороб і толерантність до стресів) або лабораторні випробування за допомогою хімічних тестів (наприклад, якість зерна). Мета селекції рослин – об'єднання якомога більше бажаних комбінацій генів у нових сортів. При використанні загальноприйнятого методу педігрі добір бажаних рослин починається в ранніх генераціях за ознаками вищої спадковості. Однак, для ознак з низькою спадковістю, добір часто відкладено, поки лінії стануть більш гомозиготними в пізніших поколіннях (F₅ або F₆). Цей процес часозатратний (5–10 років для визнання елітних ліній) і ресурсовитратний.

Чисельність і склад популяції є важливим чинником для селекційних програм. Чим більше число генів, що сегрегують в популяції, тим більший розмір популяції потрібний для виявлення конкретних комбінацій генів. В

типових селекційних програмах зазвичай вирощують сотні або навіть тисячі популяцій і кілька тисяч або мільйони окремих рослин. Масштаби і складність добору, кількість і розмір популяцій в традиційних селекційних програмах потребують нових інструментів, до яких з впевненістю можна віднести добір за допомогою маркерів (Marker-Assisted Selection, MAS). Добір за молекулярними маркерами має величезний потенціал для підвищення ефективності та точності звичайної (традиційної) селекції рослин.

Успіхи гетерозисної селекції кукурудзи значною мірою залежать від генетичного різноманіття вихідного матеріала, яке обумовлює фізіологічний потенціал даної культури і сприяє створенню високоврожайних, адаптованих до певних природних зон гібридів з ефективними системами захисту, підвищеною врожайністю та покращеною якістю зерна. Наявність зв'язку між генетичною дивергенцією батьківських форм і гетерозисом простих гібридів, продемонстроване Моллом з співробітниками в 1962 р. [1], є початком аналізу кореляції між врожаєм зерна F₁-гібридів і генетичними дистанціями, розрахованими з використанням різних маркерів [2, 3]. У 1991 р. здійснено теоретичні розрахунки лінійної кореляції між показниками міжлінійних генетичних дистанцій, отриманими на основі інформації про маркерні локуси, та гетерозисом у відповідних F₁-гібридів [4]. Автори зробили висновок про те, що прогнозування гетерозиса F₁-гібридів на основі маркерних локусів може бути більш ефективним, якщо маркери

добирають за їх спорідненістю до алелів, пов'язаних з бажаними гетерозисними ознаками.

Основою маркування локусів кількісних ознак (Quantitative Trait Loci, QTL) [5, 6], до яких відносяться і так звані гетерозисні ознаки, є оцінка достовірності різниці між «селективною вагою» алелів певного маркерного локусу. Такий підхід забезпечує статистично коректне ДНК-маркування локусу кількісної ознаки й визначає селекційну цінність маркерних алелів. У зв'язку з цим у СГІ-НЦНС закладений досвід для розробки системи селекційного добору цінних генотипів на підставі молекулярного маркування QTL.

Мета наших досліджень полягала у визначенні маркуючої здатності поліморфних локусів ДНК, що перевіряється у двох послідовних генераціях для встановлення істинності зв'язку між маркером і QTL. Алелі маркерного локусу та QTL повинні мати досить близьку локалізацію у групі зчеплення і не відокремлюватися кросінговером, саме це є підставою для остаточного визнання цього локусу маркерним. Порівняння «селективної ваги» певних маркерів у двох послідовних генераціях за умови відтворення їх зв'язку з QTL дозволяє остаточно визначити «якість» маркерів.

Матеріали і методи

Вихідний матеріал – лінії кукурудзи ГК 26, Мо 17, сегрегуюча популяція (ГК 26 х Мо 17) F₂ і лінії-тестери (лінії, які використано у якості запилювачів на ділянках гібридизації з материнськими рекомбінантними інбредними лініями (PIJ) Одеська 308 MB, Одеська 221 MB і Одеська 329, надані лабораторією генетико-біотехнологічних методів селекції кукурудзи СГІ-НЦНС. Інбредні лінії суттєво різняться за основними морфобіологічними ознаками і належать до різних гетерозисних груп – Iodent, Lancaster, Mindszenpuszta, відповідно, а лінії Одеська 221 MB і Одеська 329 відносять до окремих гетерозисних груп, які утворюють з лініями інших груп високогетерозисні гібриди.

Схрещування рекомбінантних ліній популяцій F₄, F₆ з тестерами та сортовипробування отриманих гібридів проводили на експериментальних базах СГІ-НЦНС «Дачна» та «Новоселівське» протягом двох років. Гібриди з відповідними стандартами висівали рендомізованими блоками у трикратній повторності. Оцінювали врожай зерна в розрахунку на 14 % вологості, статистичну обробку даних проводили згідно загальнопоширених методів [7]. Рівень конкурсного

гетерозису визначали за формулою Peter and Frey у викладі Зенишевої Л.С. [8]:

$$H_k = \frac{F_1 - st}{st} 100\%$$

де F₁ – урожайність гібриду; st – урожайність стандартного гібриду.

Для детекції поліморфізму ДНК використано полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) з RAPD-, ISSR- та SSR-праймерами. ДНК виділяли з листків кукурудзи із застосуванням цетавлону. Умови ампліфікації ДНК оптимізовані для приладу MJ Research (PTC-200). Для ампліфікації використали оптимальні температурні режими в залежності від типу праймерів.

Електрофоретичну оцінку фрагментів ампліфікації проводили у 4 % агарозному та 10 % поліакриламідному гелях. Документували отримані електрофореграми за допомогою відеосистеми VDS (Pharmacia Biotech, США). Молекулярну масу поліморфних фрагментів ДНК підраховували за допомогою комп'ютерної програми «Image Master 1D Elite» згідно стандарту pUC19/MspI, pBR322/MspI та л/PstI (Fermentas, Латвія).

Побудову дендрограм та розрахунок генетичних дистанцій провадили за допомогою багатомірних статистичних методів пакета програм фірми StatSoft, Inc., (США) STATISTICA (V 8.0) з використанням критерія агломерації ближчого сусіда (Single linkage), який базується на матриці даних попарних генетичних дистанцій – кластери об'єднуються за мінімальною відстанню між двома ближчими сусідами при кожному циклі підрахунку. У якості функції відстані використовували евклідову метрику. Кореляційний аналіз провадили з застосуванням стандартної комп'ютерної програми «EXCEL» та пакета комп'ютерної програми «StatPlus».

Результати та обговорення

Успадковування кількісних ознак вивчали на гібридних популяціях (ГК26 х Мо17) F₂ та F₃. Загалом вивчено мінливість 18 агрономічно цінних ознак, серед яких ознаки, що формують габітус рослини, ознаки морфології волоті, складові продуктивності та біохімічні. Для детекції молекулярно-генетичного поліморфізму у батьківських ліній використано 15 SSR-, 20 RAPD- та 18 ISSR-праймерів. Орієнтовні дані маркування отримано на поколінні F₂, підтвердження маркуючої здатності – на F₃. Маркуюча здатність поліморфних локусів, тобто кількість ознак, маркованих одним локусом,

коливалася від 1 (*phi064_86-79*, P 21_612(+)) – «висота прикріплення качана»; *isp 5_1008(+)*, *isp 5_378(-)*, *isp 7_503(+)*, *isp 13_525(-)*, P 21_564(+)) – «глибина зерна»; *isp 7_797(+)* – «маса 100 зерен»; *isp 13_330(-)* – «вміст білку»; *isp 13_236(+)* – «волога зерна») до 4 (*nc030_108* – «висота рослини», «висота прикріплення качана», «ширина листа», «індивідуальна продуктивність»).

Кількість маркерів, що припадає на одну ознаку, змінювалася від 1 («волога зерна» – *isp 13_236(+)*, «вміст білку» – *isp 13_330(-)*, «довжина волоті» – *phi 083_178*, «ширина листа» – *nc 030_108*) до 9 («глибина зерна»). За цим показником найбільш маркованою можна вважати групу ознак продуктивності, найменш – групу біохімічних ознак.

У локусів, що маркують декілька ознак, виявлено два типа інформативності: 1) маркерний алель однаковий, наприклад, локус *isp 5_950* маркує ознаки «глибина зерна» та «індивідуальна продуктивність» одним алелем «aa», тобто у таких генотипів більш високі значення даних ознак. Такий тип маркування характерний також для локусів: *phi061*, *isp 5_511*, *isp 5_345*, *isp 7_466*. 2) маркерні алелі різні, наприклад, локус P 21_1016 маркує ознаки «довжина листа» і «глибина зерна» різними алелями, «aa» та «A-» відповідно. За таким типом маркують локуси: *nc030*, *phi083*. Маркерами можна вважати певні алелі цих локусів, оскільки спостерігається нерівновага за зчепленням між ними та QTL, що визначають відміни у прояві досліджених ознак [9–12].

Отже, розроблено технологію прогнозування рівня розвитку кількісних ознак у популяціях кукурудзи на підставі їх зв'язку з ДНК-маркерами. Отримані результати пропонуються використовувати для індивідуального генотипового прогнозу розвитку певних агрономічних ознак, що дозволить значно прискорити добір потрібного матеріалу вже за рік, починаючи з F₂, та для моделювання добору генотипів з високим рівнем розвитку ознак у субпопуляціях (сім'ях) за маркерними алелями, що дозволить генетично поліпшувати базові популяції кукурудзи і використовувати їх за вихідний матеріал для гетерозисної селекції.

З використанням 47 пар SSR-праймерів проведено порівняльний аналіз геномної ДНК елітних ліній GK 26 та Mo 17, на основі яких отримані сегрегуюча популяція F₂, а в результаті подальшого самозапилення – популяції P1L (GK 26 x Mo17) F₄, F₆. Добрано 10 пар поліморфних у

вихідних ліній GK 26 і Mo 17 локусів: *nc030*, *phi061*, *phi064*, *phi083*, *phi031*, *phi044*, *phi057*, *phi084*, *phi080*, *phi112* на восьми з 10 хромосом.

На основі SSR-аналізу, у рамках вивчення успадкування кількісної ознаки «Урожай зерна» у пізніх генераціях популяцій кукурудзи розроблено модельну схему прискорення селекційного процесу на основі поєднання традиційних методів селекції з ДНК-технологіями, яка показує принципову можливість прогнозування добору кращих генотипів батьківських форм для отримання високогетерозисних гібридів кукурудзи.

У основі розробки лежить принцип добору в популяціях тільки найбільш цінних батьківських генотипів для отримання високопродуктивних гібридів за рахунок використання генетичних дистанцій як інструменту для групування генотипів з подібною ідіоплазмою. Реалізація принципу відбувається у зменшенні обсягів робіт і ресурсних витрат у результаті прогнозування за генетичними дистанціями потенційно продуктивних генотипів в межах популяції на ранніх етапах селекційного процесу та зменшення кількості схрещувань для польової оцінки.

Ефективність схеми доведено експериментальним моделюванням ДНК-прогнозу добору генотипів у популяціях кукурудзи (GK 26 x Mo17) F₄, F₆ для отримання високогетерозисних гібридів. У процесі моделювання проводили формування класів у популяції P1L F₄, F₆ за генетичною дистанцією відносно ліній-тестерів Одеська 329 і Одеська 308 MB. Основою добору цінних генотипів у популяціях P1L є визначення індивідуальних генетичних дистанцій (ГД) для кожної P1L відносно кожної з ліній-тестерів та кластерний аналіз популяції P1L за розміром ГД. За генетичним профілем P1L і тестерів формували базу даних популяції та оцінювали внутрішньогрупові ліміти дистанцій. Визначали групи ліній: споріднені – з мінімальним значенням ГД, середнього віддалення та групи максимального генетичного віддалення від тестерів з максимальними значеннями середньої генетичної дистанції. Прогнозували добір потенційно цінних генотипів, що увійшли до максимально віддаленої групи за значенням генетичних дистанцій по відношенню до добраних тестерів.

Рекомбінантні лінії з популяцій F₄ та F₆, що ідентифіковано як клас з високим рівнем генетичної дистанції, виявили середній ($r \geq 0,5$)

або високий ($r < 0,7$) зв'язок з урожайністю зерна гібридів, отриманих на основі материнських ліній цього кластеру. Так, у гібридів з лінією-тестером Одеська 329 коефіцієнт кореляції між урожайністю і генетичною дистанцією РІЛ з класу з високим ступенем віддаленості (ГД > 5,000) склав за роками: $r = 0,55 - 0,63 - 0,72$. У гібридів з тестером Одеська 308 МВ: $r = 0,54 - 0,67$. Коефіцієнт добору, тобто частка добраних кращих ліній і гібридів для подальшої гібридизації і сортовипробування, складає 12–14 % від об'єму за традиційними методами селекції [13, 14].

Таким чином, кластеризація популяції і виділення класу РІЛ з високим рівнем генетичної дистанції на основі SSR-аналізу ще до проведення польового випробування дозволяє прогнозувати групу гібридів з максимальною врожайністю і значно (на 70–80 %) скорочувати обсяги сортовипробування.

Висновки

Розроблена технологія прогнозування рівня розвитку кількісних ознак у популяціях кукурудзи на підставі їх зв'язку з ДНК-маркерами, що дозволяє генетично поліпшувати базові популяції кукурудзи і використовувати їх за вихідний матеріал для гетерозисної селекції. Кластеризація популяції і виділення класу РІЛ з високим рівнем генетичної дистанції на основі SSR-аналізу і прогнозування добору потенційно цінних генотипів, що увійшли до максимально віддаленої групи за значенням генетичних дистанцій по відношенню до добраних тестерів, дозволяє скорочувати обсяги сортовипробування. Отже, на сучасному етапі молекулярні маркери є ефективним інструментом вирішення задач селекції кукурудзи, у тому числі, проблем використання гетерозису і поліпшення якості врожаю.

Дослідження (частково) виконано за рахунок бюджетних коштів – за фінансової підтримки Державного агентства з питань науки, інновацій та інформатизації України.

Література

1. Moll R. Heterosis and genetic diversity in variety crosses of maize // *Crop Sci.* – 1962. – N 2. – P. 197–198.
2. Stuber C., Goodman M. Allozyme genotypes for popular and historically important inbred lines of corn // *USDA, Agric. Res. Serv., Southern Series.* – 1983. – 16. – 28 p.
3. Smith J., Smith O. The use of morphological, biochemical, and genetic characteristics to measure distance and to test for minimum distance between inbred lines of maize (*Zea mays* L.) // *UPOV Document.* – 1989. – 18 p.
4. Charcosset A., Lefort-Buson M., Gallais A. Relationship between heterosis and heterozygosity at marker loci: a theoretical computation // *Theor. Appl. Genetics.* – 1991. – 81. – P. 571–575.
5. Guimaraes E. P., Ruane J., Schert B.D., Sonnino A., Dargie J.D. Marker – assisted selection. Current status and future perspectives in crops, livestock, forestry and fish. // *Food and agriculture organization of the united nations.* – Rome. – 2007. – 471 p.
6. Schrag T.A., Melchinger A.E. et al. Molecular marker-based prediction of hybrid performance in maize using unbalanced data from multiple experiments with factorial crosses // *Theor. Appl. Genet.* – 2009. – 118. – P. 741–751.
7. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта. – М.: Колос. – 1973. – С. 156–163.
8. Зенищева Л.С. Наследуемость количественных признаков, определяющих устойчивость растений к полеганию // *С.-х. биология.* – 1968. – Вып. 3. – С. 790–794.
9. Belousov A.A., Sokolov V.M., Sivolap Y.M., Domenjuk V.P., Storcheus N.I. Heterosis of maize hybrids developed using DNA technologies // *Acta Agronomica Hungrica. Budapest.* – 2006. – P. 391–396.
10. Доменюк В., Белоусов А., Сиволап Ю. ДНК-маркирование количественных признаков кукурузы // *Цитология и генетика.* – 2002. – № 6. – С. 12–19.
11. Доменюк В., Вербицкая Т., Белоусов А., Сиволап Ю. Маркерный анализ количественных признаков кукурузы при помощи ISSR-ПЦР // *Генетика.* – 2002. – 38, № 9. – С. 1–9.
12. Доменюк В.П., Белоусов А.О., Сиволап Ю.М. Добір за ДНК-маркерами локусів кількісних ознак в селекції кукурудзи // *Вісник Харківського національного аграрного університету.* – 2003. – № 3 (2). – С. 87–91.
13. Букреева Н.І. Букреева Н.І., Белоусов А.О., Сиволап Ю.М. Кластерно-кореляційний аналіз популяцій рекомбінантних ліній і гібридів кукурудзи на основі SSR-ПЛР // *Вісник ОНУ.* – 2011. – 16, вип. 6. – С. 23–33.
14. Белоусов А.О., Сиволап Ю.М., Соколов В.М., Букреева Н.І. Спосіб ДНК-прогнозування добору батьківських компонентів для отримання високопродуктивних гібридів кукурудзи // Патент на корисну модель № 72116. Заявник – Південний біотехнологічний центр. Отримано 10.08.12. Бюл. № 15.

BUKREYEVA N.I., DOMENYUK V.P., BELOUSOV A.A., SOKOLOV V.M., SIVOLAP YU.M.

*Plant Breeding and Genetics Institute, National Center for Plant Breeding and Cultivar Science, National Academy of Agrarian Sciences,
Ukraine, 65036, Odessa, Ovidiopolskaya road, 3, e-mail: natastor@rambler.ru*

MOLECULAR MARKERS BASED PREDICTION OF HETEROSIS IN MAIZE

Aims. Selection procedure based on the use of molecular markers, the so-called marker-assisted selection (MAS), has advantages over conventional selection methods, since MAS uses close associations between genetic markers and loci of important agronomic traits. **Methods.** The parental material, that is, the maize lines GK26 and Mo17, the segregating population (GK26 x Mo17) F₂ – F₆ and testers (used as pollinators on hybridization plots with parental recombinant inbred lines (RILs)) Od308MV, Od221MV and Od329, were combined with ISSR-, RAPD-, SSR-analysis of genetic diversity to characterize the populations. **Results.** Parental lines GK 26 and Mo 17 and lines-testers of Od 221 MB, Od 308 MB, Od 329 polymorphism was analyzed by SSR-PCR and genotyping RILs populations F₄, F₆ was conducted. The cluster and correlation analyses of RIL populations and dependence between the genetic distance and hybrid performance levels were determined. DNA-based prediction breeding of parental genotypes for creating of testcross with high performance using microsatellite marker information was simulated. The results allowed to predict high performance hybrids group and reduce analyzed samples on 70–80 %. **Conclusions.** The technology of prediction based on association with DNA markers and quantitative traits in maize populations was created. It was allowed to improve the genetic base of maize populations and their use for source material for heterosis breeding. Molecular markers are an effective tool for solving problems of breeding, including the use of heterosis problems and improve the quality of the crop.

Key words: RILs and hybrids of maize, SSR-analysis, genetic polymorphism, DNA-based prediction.

УДК 633.522:631.535.663.99

ВИРОВЕЦ В.Г.^{1,2}, ЛАЙКО И.М.¹, ГОРШКОВА Л.М.²

¹ *Опытная станция лубяных культур Института сельского хозяйства Северо-Востока НААН Украины,*

Украина, 41400, Сумская обл., г. Глухов, ул. Терещенков, 45, e-mail: ibc@sm.ukrtel.net

² *Глуховский национальный педагогический университет имени Александра Довженко,*

Украина, 41400, Сумская обл., г. Глухов, ул. Киево-Московская, 24, e-mail: gdpu@sm.ukrtel.net

ПУТИ НЕЙТРАЛИЗАЦИИ НАРКОТИЧЕСКОЙ ОПАСНОСТИ ДИКОЙ КОНОПЛИ

Наркомания (гр. narke – оцепенение, болезненное влечение) – широко распространенное в мире явление, которое возникло вследствие пристрастия к употреблению наркотиков (гр. narkotikos – приводящий в оцепенение, одурманивающий) – группы веществ растительного происхождения или искусственно созданных химическим путем, которые вызывают болеуспокаивающее или снотворное действие. Злоупотребление этими веществами приводит к наркомании. Сейчас известно целый ряд культур, среди которых наиболее популярными являются мак, конопля, кока, эфедр, левзея (маралий корень), мексиканский кактус-пейота, имбирь, некоторые грибы (мухоморы) и др. – это лишь маленькая частица огромного арсенала природных химических соединений, способных воздействовать на человеческий и животный

организмы.

Из известных органических природных источников, которые оказались пригодными для наркотического удовлетворения, была использована такая сельскохозяйственно значима широко известная волокнистая культура – конопля, основное назначение которой издавна заключалось в удовлетворении потребностей населения в изделиях ручного, а позже ткацкого производства [1, 2].

На основании научных поисков исследователи утверждают, что в любом человеческом или животном организме вырабатываются специфические вещества – «собственные наркотики» – анандамиды, что в переводе с санскрита означает «радость или экстаз». Профессоры Рафаэль Мешулам и Ихелем Гаони раскрыли механизм действия наркотиков на организм. С большим

сожалением следует отметить, что аналогичного состояния эффекта можно достичь и путем внешнего воздействия – употребления опиатов или других веществ [3, 4]. Также известно, что ощущение эйфории у некоторой категории людей может проявляться при увлечении любимой работой или творчеством, искусством [5]. Желание повторить удовольствие или чувство эйфории постепенно переходит в болезненную привычку, которая может привести к наркотической зависимости.

Уже в условиях неолита первобытный человек, чтобы забыть о опасностях, которые поджидали его на каждом шагу, старался каким-то образом выходить из стрессового состояния. Еще до изобретения огня и каменных орудий наш неолитовый предок уже употреблял хмельную, которая образовывалась путем брожения углеродных остатков под действием солнца в дождевых лужах. С изобретением огня спонтанно появилось курение конопли, за которой не нужно было далеко ходить, о чем неоднократно заявляли ученые-археологи на основании найденных окаменевших трубок с остатками сгоревшего наркотика [6].

Как же случилось, что посевная конопля, которую выращивали на протяжении тысячелетий, стала опасной культурой для общества? Ответ на этот вопрос следует искать в глубинах развития цивилизаций, которые привели к прогрессу, концентрации производства и увеличения густоты населения на примере возникновения мегаполисов. В таких условиях на фоне субкультурно-идеологической нагрузки проявляется влечение, например, к марихуане, как к усиливающему средству, в сложных условиях возрастающего столкновения или вообще со всеми принятыми нормами поведения в обществе.

Нельзя также сбрасывать со счетов и давние традиции курения табака и махорки. В этом плане трудно забываются целевые выпуски сигарет с примесью марихуаны для иностранных военнослужащих. И хотя это явление на сегодняшний день в армиях не практикуется, но в памяти молодежи оно периодически проявляется.

В последнее время все чаще появляются сообщения о менее вредном воздействии конопли на организм человека по сравнению с другими наркотиками и, соответственно, о возможной в будущем легализации употребления. Численность лиц употребляющих наркотики настолько возросла, что с этим явлением все тяжелее становится бороться.

Сейчас в мире по данным иностранной печати насчитывается около 200 млн. потребителей с оборотом 320 млрд. долларов. Количество их значительно увеличилось благодаря популярности конопли, 80 % наркоманов предпочитают употреблять коноплю. Большинство из них считают, что конопля имеет наименьшее негативное влияние на здоровье, чем другие психотомиметические вещества, имея в виду и алкоголь, как наиболее доступный и распространенный наркотик. Однако этим нисколько не уменьшается опасность конопли, как источника наркомании, поскольку постоянное употребление ведет к увеличению дозы и, соответственно, к прогрессированию влечения, как болезни.

Работники МВД и Государственной службы контроля за наркотиками и общественность Украины обеспокоены масштабами распространения наркомании, которая может угрожать национальной безопасности. Наркомания в Украине охватила почти 2 млн. населения или около 4,5 % жителей. Преодоление 7,8 % порога наркотизации страны может привести к необратимым процессам, ведущим к вырождению нации [7].

Данная проблема возникла в начале 50-х годов прошлого столетия. Увеличение случаев использования посевной конопли в качестве наркотического средства, производственные посевы которой занимали довольно значительные площади, вызывало обеспокоенность, что повлекло за собой ряд ограничительных мероприятий со стороны правоохранительных органов.

Одним из них явилось привлечение научной селекции для создания новых сортов посевной конопли, которые не обладали бы наркотической активностью. Эти исследования были начаты в 1972 году во Всесоюзном научно-исследовательском институте лубяных культур (г. Глухов, Сумская область), который входил в систему Министерства сельского хозяйства СССР при координации научных исследований со стороны Всесоюзной сельскохозяйственной академии им. В.И. Ленина.

Для того чтобы исключить посевную коноплю из списка наркотических культур, выращиваемую в производстве на значительных площадях (около 200 тыс. га), было принято кардинальное, беспрецедентное правительственное решение о создании впервые в мире новых сортов с пониженным содержанием канна-

биноидов. В результате значительных усилий коллектива селекционеров в научном плане при консолидации трех министерств бывшего СССР – сельского хозяйства, внутренних дел и здравоохранения и ВАСХНИЛ в скором времени культивируемая конопля стала социально безопасной [8, 9].

Создание ненаркотических селекционных сортов посевной конопли явилось значительным событием в науке и практике, но это не было окончательным решением в распространении наркомании, поскольку на территории бывшего СССР оставались значительные природные ареалы дикой конопли. В планах Государственного комитета СССР по борьбе с наркоманией было намечено ряд мероприятий по ограничению использования дикой конопли в качестве наркотического источника. Единственное, что удалось сделать, это провести в начале 80-х годов сотрудниками института и заинтересованных министерств учет резерваций дикой конопли в Приморском крае и республиках Средней Азии и наметить планы по их уничтожению. По некоторым сведениям в Джамбульской области было ликвидировано 40 тыс. га [11].

Повсеместное распространение конопли по Земному шару в процессе эволюции привело к формированию различных видов в зависимости от географических условий ее произрастания и хозяйственного применения или использования. Однако большинство систематиков и ботаников все разнообразие ограничивают двумя видами: *Cannabis sativa* L. (конопля посевная) и *Cannabis indica* L. (конопля индийская или гашишная) [12].

Как известно, все культурные растения планеты происходят из диких, которые человек стал использовать для своих потребностей. Если говорить о происхождении вообще, то все исследователи подчеркивают о роли одомашнивания дикой конопли. При полюсном рассмотрении пространственного размещения конопли и соответственного ее использования в зависимости от хозяйственного назначения и этнических традиций – на волокно и семена или для получения наркотиков (марихуаны и гашиша) все же основные производственные массивы ее расстилаются, примерно, между 40°–55° северной широты [13]. Оставшиеся растения внехозяйственной деятельности, которые встречаются в диком состоянии на огромной территории Азии и юго-восточной части Европы, можно отнести к интергеографическому типу, внутри которого также можно

свободно выделить ряд географических типов аналогично культурной посевной конопле. Предложения о возможности промышленной переработки дикой конопли в хозяйственных целях связано со значительными рисками и материальными затратами [14, 15].

Наряду с этим, существует реальная опасность использования дикой конопли особенно в южных регионах в качестве наркотического сырья. Трудность борьбы усугубляется еще и тем, что ее практически невозможно ограничить и поэтому на территории СНГ сохранились значительные площади ее произрастания. Все это создает определенную опасность и усложняет меры борьбы с распространением наркомании. Европейские сообщества обеспокоены тем, что дикорастущая конопля занимает площадь в тысячи квадратных миль, превышая более чем в 25 раз посевы культурной конопли во всем мире. Около 1 млн. га дикорастущей конопли насчитывается на Дальнем Востоке, Сибири, Бурятии и Хакасии. В странах бывшего СССР запасы наркосырья не меньше, чем в Бирме, Таиланде и Лаосе, составляющих так называемый «Золотой треугольник» и «Золотой полумесяц» (Пакистан, Афганистан, Иран) [16].

Следует также учитывать, что дикорастущая конопля в экосистеме определенных регионов представляет собой неотъемлемую часть агробиоценоза, выполняя покровную роль кормовой растительности, которая в свою очередь является естественной преградой движению песков и барханов на культивируемые поля (Чуйская долина). Некоторые ареалы дикой конопли находятся в труднодоступных местах – на болотах и поймах рек (Украина, Россия) или в горах (Бирма, Пакистан, Иран, Афганистан и др.), куда сложно или невозможно добраться и применить технику для ее ликвидации. Сплошное уничтожение ее с помощью авиации может привести к нарушению природного баланса [17–22].

Нельзя также не учитывать в этих регионах сложные хозяйственные и экономические ситуации, усугубляющиеся иногда вспышками гражданских военных конфликтов на фоне этнических взаимоотношений и действий наркомафиозных структур. При таких обстоятельствах местное население вынуждено прибегать к сбыту наркосырья – как мака, так и конопли, чтобы выжить в сложных условиях безработицы и нищеты.

Известно, что наркотичность дикой конопли возрастает с северо-запада на юго-

восток. Наименьшим уровнем накопления наиболее наркотически активного компонента каннабиноидов – тетрагидроканнабинола (ТГК) отличается дикая конопля, произрастающая в зонах возделывания культурной конопли. Южные регионы произрастания характеризуются высоким содержанием ТГК, которое определяется климатическими факторами – высокой температурой, солнечной радиацией и низкой влажностью [23].

Таким образом, на основании созданных новых сортов без каннабиноидов и 40-летнего опыта селекционной работы по элиминации наркотической активности предлагаем начать исследования с дикой коноплей в направлении нейтрализации ее наркотической опасности.

Теоретической основой данных исследований являются классические труды Ч. Дарвина, Г. Менделя и Н.И. Вавилова, а разработанные Г.И. Сенченком, В.Г. Вировцом, Л.М. Горшковой, И.М. Лайко и др. методы селекции и созданные впервые в мире высокопродуктивные сорта однодомной посевной конопли с пониженным содержанием и полным отсутствием не только ТГК, но и других компонентов каннабиноидов могут служить убедительным доказательством успешного выполнения крайне актуальной острой и сложной проблемы [24–27].

Украинскими селекционерами в процессе исследований по снижению наркотической активности посевной конопли было установлено, что при переопылении растений с высоким и низким ТГК в потомстве происходит постепенное увеличение количества растений с более низким содержанием. Также опыт выращивания сорта ЮСО-45, в котором отсутствуют каннабиноиды при высоком урожае волокна и семян, на полях Узбекской опытной станции кенафа (г. Чирчик Ташкентской

области) свидетельствует о том, что в условиях высоких температур и низкой влажности воздуха не произошло появления не только ТГК, но и других компонентов каннабиноидов. На основании исследований можно утверждать о том, что у современных высокопродуктивных сортов однодомной конопли, не обладающих наркотической активностью, на генетическом уровне отсутствуют способности к синтезу каннабиноидных соединений.

При свободном опылении рядом произрастающих сортов без пространственной изоляции (посевной, итальянской, японской, индийской и дикой конопли) происходит усреднение показателей продуктивности, возрастающих по мере увеличения кратности действия, что доказывает об эффективности насыщения популяции желательным признаком [28].

С созданием новых ненаркотических сортов однодомной конопли ЮСО-31, Гляна, Виктория, Золотоношская 15, Зоряна, Ника и др. сложились реальные возможности прямого воздействия на природные резервации спонтанно произрастающей дикой конопли в Украине, России и странах Средней Азии с целью постепенной нейтрализации наркотической активности [29, 30] (табл.).

Как видно из представленной таблицы, в образцах селекционных сортов, которые отбирались при участии сотрудников МВС Украины, содержание ТГК, как основного компонента каннабиноидов, в большинстве случаев не выявлено. Количественное определение каннабиноидов было проведено на газовом хроматографе. В отдельные годы было зафиксировано следовое количество ТГК, которое в десятки или сотни раз меньше допустимой нормы – 0,15 %, что не позволяет эти сорта использовать в качестве наркотического средства.

Таблица. Содержание каннабиноидов (ТГК) в новых сортах посевной конопли (Государственный экспертно-криминалистический центр МВД Украины)

Сорт	Содержание ТГК по годам, %						
	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013
ЮСО-31	0,015	0,005	0,039	0,000	0,0001	0,000	0,000
Гляна			0,006	0,000	0,000	0,015	0,000
Виктория			0,000	0,000			
Золотоношская 15	0,028	0,0008		0,000			0,000
Зоряна							
Ника							0,000
Глесия							0,000

Неоднократное рассеивание семян или по возможности подсев ненаркотических сортов в определенных резервуарах приведет к переопылению растений дикой конопли на значительной территории, поскольку пыльца легко переносится ветром на большие расстояния, подымаясь в высоту до 40 м [31] и проявлению на следующий год растений с меньшим содержанием ТГК.

Наличие современных селекционных сортов конопли является главным условием нейтрализации наркотической опасности дикой конопли. Однако для осуществления этой

работы необходимы значительные материально-финансовые затраты как для проведения исследований, экспедиций, привлечения научных кадров, так и для приобретения современного лабораторного оборудования и т. д.

Таким образом, реализация намеченных мероприятий, опираясь на ненаркотические сорта посевной конопли в комплексе с другими организационными и хозяйственными приемами, поможет снизить, хотя бы в отдельных регионах, остроту опасности, исходящей от произвольно растущей дикой конопли.

Література

1. Голобородько П.А. Коноплі – культура невичерпаних можливостей / П.А. Голобородько, В.Г. Вировець // Пропозиція. – 1996. – № 2. – С. 28–29.
2. Вировець В.Г., Солдатенко В.А., Лайко І.М. Конопля-культура ХХІ століття // Аграрна наука. – 1999. – № 11. – С. 5–7.
3. Лазурьевский Г. В., Николаева Л.А. Каннабиноиды. – Кишинев: Штиинца, 1972. – 68 с.
4. Корсак К. Наркотики – нова небезпека для України // Науковий світ. – 2000. – № 7. – С. 24–26.
5. Вильям Э. Наркомания без наркотиков // За рубежом. – 1993. – № 37 (1702). – С. 21.
6. Наш предок «*Homo Narcoticus*» // Коментарі тижневика «Дзеркало тижня». – 1994. – № 6.
7. Малишев В. Поширення наркоманії – загроза національній безпеці України: деякі шляхи розв'язання проблеми // Голос України. – 25 травня 2011. – № 93 (5093). – С. 4–5.
8. Сенченко Г.И., Горшкова Л.М. Перспективы селекции на снижение содержания наркотических свойств конопли // Биология, возделывание и первичная обработка конопли и кенафа: сб. научн. тр. ВНИИЛК. – Глухов, 1976. – Вып. 39. – С. 27–33.
9. Вировець В.Г., Сенченко Г.И., Горшкова Л.М. и др. Наркотическая активность конопли (*Cannabis sativa* L.) и перспективы селекции на снижение содержания каннабиноидов // Сельскохозяйственная биология. – 1991. – № 1. – С. 34–49.
10. Вировець В.Г., Горшкова Л.М., Ситник В.П. и др. Новые сорта однодомной конопли // Лен и конопля. – 1980. – № 6. – С. 28–29.
11. Дугашев Р.С. Деятельность органов МВД Казахской ССР по борьбе с наркоманией и епрофилактике // Проблемы экспериментального исследования наркотических веществ: тез. докл. всесоюзн. научн. конф. (14–16 мая 1974 г.). – Алма-Ата, 1974. – С. 21–23.
12. Серебрякова Т.Я. Конопля // Всес. ин-т прикл. бот. и новых культур. – Л., 1929. – 84 с.
13. Храменко Г.И. Систематическая характеристика конопли // Биология конопли: труды ВНИИК. – К.–Х.: Держсільгоспвидав, 1935. – Вып. 8. – С. 9–21.
14. Прозоровский А.В. Дикая конопля (распространение, биологические особенности в связи с эксплуатацией диких зарослей) // Растительное сырье: труды Ботанического института АН СССР. – М., 1938. – 1, сер. V. – С. 79–90.
15. Янишевский Д.Е. Форма конопли на сорных местах в юго-восточной России // Ученые записки Саратовского университета. – Саратов, 1924. – 2. – Вып. 3.
16. Вировець В.Г., Лайко І.М., Щербань І.І. та ін. Передумови селекції ненаркотичних конопель // Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів. – 2010. – 8, № 2. – С. 279–290.
17. Хребтов А.А. Дикая конопля на Урале и перспективы ее использования // Пермский с.-х. ин-т. – 1935. – 5.
18. Ильичевский С.О. Дикая конопля в районах Нижнего Днепра // Ботанический журнал. – 1953. – 38.
19. Caddy B.A, Fish F. screening technique for Indian hemsps (*Cannabis sativa* L.) // J. Chromatog. – 1967. – N 31. – P. 584–587.
20. Gaoni Y., Mechoulam R. The isolation and structure of Δ -tetrahydrocannabinol and other neutral cannabinoids from haschisch // J. Amer. Chem. Sci. – 1971. – 93, N 1. – P. 10–13.
21. Fairbrain J.W., Liebman J.A. The cannabinoid content of *Cannabis sativa* L. grown in England // J. Pharm. and Pharmacol. – 1974. – N 26. – 6 p.
22. Domenico Al. Lanuova sanapicoltura italiana // Italia agricola. – 1962. – N 3. – 99 p.
23. Давидян Г.Г., Захарова Н.С., Семкин Е.П. Изучение динамики накопления каннабиноидов в различных органах растений посевной конопли // Проблемы экспериментального исследования наркотических веществ: тез. докл. всесоюзн. научн. конф. (14–16 мая 1974 г.). – Алма-Ата, 1974. – С. 35–36.

24. Сенченко Г.И., Горшкова Л.М., Вировец В.Г., Сажко М.М. Предварительные итоги селекции на снижение содержания каннабиноидов в растениях конопли // Криминалистичні комплексне дослідження наркотических речовин. – Фрунзе, 1976. – С. 63–67.
25. Вировец В.Г. Создание высокопродуктивных сортов конопли, не обладающих наркотической активностью: автореф. дис. на соискание науч. степени докт. с.-х. наук: спец. 06.01.05 «Селекция и семеноводство». – Глухов, 1992. – 42 с.
26. Горшкова Л.М. Біологічні основи формування каннабіноїдних сполук у конопель та розробка методів визначення їх вмісту в селекційних цілях: автореф. дис. на здобуття ступеня докт. с.-г. наук: спец. 06.01.05 «Селекція та насінництво». – К., 1994. – 49 с.
27. Пат. 52427 (А) Україна, А 01 Н 1/04, Спосіб оцінки рослин конопель на наявність каннабіноїдів / Лайко І.М.; заявник і патентовласник Інститут луб'яних культур Української академії аграрних наук. – № 2002053930; заяв. 14.05.02; опубл. 16.12.02. Бюл. № 12.
28. Сенченко Г.И., Вировец В.Г. Изменение хозяйственно-ценных качеств конопли сорта ЮС-6 при свободном и принудительном опылении другими сортами // Вопросы селекции и семеноводства конопли и кенафа. – К.: Урожай, 1971. – С. 125–134.
29. А. с. 07251, Коноплі Гляна / І.І. Щербань, І.М. Лайко, В.Г. Вировець, Г.І. Кириченко, В.П. Ситник (Україна). – № 05014001; заявл. 02.05.05; опубл. 11.01.07.
30. А. с. 110029, Коноплі Вікторія / І.М. Лайко, В.Г. Вировець, Г.І. Кириченко І.І. Щербань (Україна). – № 09014001; заявл. 05.11.09; зареєстр. 14.01.11.
31. Демкин А.П., Астахова А.И. Дальность полета и жизнеспособность пыльцы конопли // Работы по биологии, селекции и семеноводству конопли: сб. науч. тр. ВНИИ лубяных культур. – М., 1952. – Вып. 21. – С. 77–85.

VYROVETS V.G.^{1,2}, LAYKO I.M.¹, GORSHKOVA L.M.²

¹ *Research Station of Bast Crops of the Institute of Agriculture of Northern-East NAAS, Ukraine, 41400, Sumy region, Glukhov, Tereschenko str., 45, e-mail: ibc@sm.ukrtel.net*

² *Glukhov National Pedagogical University named after Aleksandr Dovzhenko, Ukraine, 41400, Sumy region, Glukhov, Kievo-Moskovskaya str., 24, e-mail: gdpu@sm.ukrtel.net*

WAYS OF NEUTRALIZATION OF DRUG DANGER OF WILD HEMP

Aims. Among narcotic influence lovers many drug users give preference to hemp, in their opinion as the least to the dangerous drug. **Methods.** The increase of cases of industrial hemp use as a narcotic mean, sowing of which in Ukraine were the most considerable, compelled to apply a successful scientific selection on creation drug-free varieties, as a method of fight against a social evil. **Results.** As a result of long-time researches and long-term plant-breeding work first in the world drug-free highly productive varieties with minimum and complete absence of cannabinoid compounds were created. **Conclusions.** The presence of these varieties gives possibility to make first advances on a way to neutralization of danger, outgoing from spontaneous natural reservations. The repeated dispersion of seed of drug-free varieties, taking into account the capacity of hemp for crosspollination, will result in the stage-by-stage decline of narcotic activity of wild hemp.

Key words: industrial drug-free hemp, wild hemp, free crosspollination, cannabinoids.

УДК 636.7:611.63:615

ВАСИЛЬЕВ В.С., ХОХЛОВ А.М.

Харьковская государственная зооветеринарная академия,

Украина, 62341, Харьковская обл. Дергачевский район, п/о Малая Даниловка, ул. Академическая, 1, e-mail: zoovet.kharkov@gmail.com

ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ПОЛОВЫХ КЛЕТОК И ПРОЦЕСС ОПЛОДОТВОРЕНИЯ У СВИНЕЙ

Предком одомашненных свиней Украины можно считать дикого европейского кабана (*Sus scrofa ferus*), который стал генетическим корнем пороодообразовательного процесса в Европе.

По данным А. Банникова, В. Флинта,

дикий кабан появился в нижнем олигоцене в Европе и был самым первым диким животным из семейства Suidae, подвергнувшись процессу доместикации [1].

Свиньи – это наиболее распространенный

вид одомашненных животных с широким ареалом. По данным ФАО, в настоящее время в мире насчитывается около 730 пород и породных типов свиней, большую часть из которых разводят в Европе и Китае, в частности, 270 из них считаются редкостными. Одновременно 58 пород (25 региональных и 33 международных), зарегистрированных как широко распространенных, то есть они размножаются более чем в одной стране [3]. Достоверно, что в мире наиболее распространенными являются пять пород: крупная белая (117 стран), дюрок (93 страны), ландрас (91 страна), гемпшир (54 страны) и пьетрен (35 стран) [2]. Возникает вопрос, каков же путь филогенеза этого вида, какие биологические и генетические различия между современными породами свиней и их исходными формами.

Материалы и методы

Для изучения биологических и генетических особенностей исследовали нативную сперму хряков современных мясных пород в сравнении с особенностями половых клеток спермы хряков дикого европейского кабана, который является генетическим корнем при создании отечественных и зарубежных пород свиней. Мазки спермы хряков для интерференционной микроскопии изучали при использовании микроскопа МР1-5, состоящего из поляризатора, анализатора и двоякопреломляющих призм Волластона, позволяющих получать раздвоенные изображения спермиев с противоположенными сдвигами фаз световых волн [4].

При этом изучали как морфологические, так и генетические показатели спермы. Частоту дефектов строение подсчитывали в процентах к общему числу спермиев в поле зрения в интерференционном контрасте, подсчитывалось не менее 1000 половых клеток на различных участках мазка. В интерференционном микроскопе различимы дефекты спермиев, классифицируемые по Э. Блему [5]: мажорные дефекты – дегенеративные, двойные формы, пуговичная акросома, подвижный отдельный хвост, диадема головки, грушеобразные головки, маленькие аномальные головки, отдельные патологические головки, штопорообразный митохондриальный чехлик, проксимальная капелька, псевдо капелька и др. До мажорных относят 15 дефектов спермы. До минорных относят узкие головки, маленькие нормальные головки, гигантские и широкие короткие головки, дистальная капелька, простой

излом хвоста, кольцеобразный хвост и др., всего 9 дефектов.

Появление минорных аномалий спермиев, в основном обусловлены действием внешних факторов (содержание, кормление животных и т.д.), а появление мажорных дефектов очень часто обусловлено как генотипом производителя, так и влиянием некоторых паратипических факторов.

Результаты и обсуждения

При исследовании спермы хряков домашних и диких животных, наиболее информативными показателями ее качества являются не только подвижность спермиев, концентрация, но и целостность структуры клеток, количество ДНК и белков в головках спермиев. Исследовали нативную сперму хряков крупной белой породы, ландрас, уэльс, дюрок и пьетрен, а так же сперму дикого европейского кабана. Морфофункциональные показатели спермиев дикого кабана и хряков современных пород представлены в таблице 1.

Анализ данных таблицы 1 показал, что у дикого европейского кабана длина головки спермия достоверно уступала по размерам половых клеток современным отечественным и зарубежным породам свиней. Однако по ширине головки спермия и длине средней части спермия наблюдается достоверное превосходство у *Sus scrofa ferus*. Средняя часть сперматозоида или тело спермия имеет мощный митохондриальный аппарат, который способствует как активности, так и адаптивности спермы у дикого европейского кабана. По общей площади головки спермия различия не достоверные.

Содержание сухого вещества в головке спермия и соотношение белка и ДНК представлено в таблице 2.

Исследования показали, что если по сухой массе головки спермиев у дикого кабана и одомашненных свиней различия незначительные, то в соотношении дезоксирибонуклеиновой кислоты и белка в головке спермия и частоте дефектов в строении половых клеток наблюдаются более существенные различия. Так, крупная белая порода свиней, созданная в 1851 году в Великобритании, по происхождению от дикого европейского кабана имеет с ним общее филогенетические корни и одинаковое соотношение в головке спермия белка и ДНК (67,4–32,6). Датская порода ландрас и английская порода уэльс филогенетически созданы при широком участии крупной белой породы свиней.

Таблица 1. Морфологические показатели спермы диких и домашних хряков

Хряки	Число эякулятов	Длина головки спермия, мкм	Ширина головки спермия, мкм	Длина средней части спермия, мкм	Площадь головки спермия, мкм ²
Дикий кабан	15	8,2 ± 0,2	4,6 ± 0,1	14,2 ± 0,2	29,6 ± 0,4
Крупная белая	28	9,1 ± 0,2	4,15 ± 0,1	11,2 ± 0,3	29,5 ± 0,3
Ландрас	14	9,02 ± 0,1	4,0 ± 0,2	11,0 ± 0,3	28,3 ± 0,3
Уэльс	15	9,15 ± 0,2	4,05 ± 0,2	11,1 ± 0,3	29,1 ± 0,4
Дюрок	11	9,1 ± 0,2	4,1 ± 0,2	11,1 ± 0,3	29,3 ± 0,3
Пьетрен	15	9,05 ± 0,2	4,1 ± 0,2	11,2 ± 0,3	29,2 ± 0,4

Таблица 2. Содержание сухого вещества в головках спермиев хряков

Хряки	Число эякулятов	Сухая масса головки спермия, мг	Содержание в головке спермия, мг		Соотношение, %		Частота дефектов строения, %
			Белка	ДНК	Белка	ДНК	
Дикий кабан	15	8,60	5,80	2,80	67,40	32,60	7,20
Крупная белая	28	8,61	5,81	2,80	67,40	32,60	7,10
Ландрас	14	8,58	5,98	2,60	69,60	30,40	7,30
Уэльс	15	8,49	5,79	2,70	68,20	31,80	6,50
Дюрок	11	8,50	5,40	3,10	63,50	36,50	12,30
Пьетрен	15	8,56	5,66	2,90	66,10	33,90	5,10

Исследования показали, что у хряков породы ландрас соотношение в головке спермия белка и ДНК (69,6 и 30,4 %), а уэльс (68,2 и 31,8 %).

Сперматогенез происходит у хряков во все сезоны года и в течении всего периода половой жизни. У дикого европейского кабана этот процесс изучен недостаточно. У вида *Sus scrofa* мужская половая клетка резко отличается от женской по величине, форме и подвижности. Длина спермиев колеблется от 35 до 78 мкм., а длина головки от 7 до 10 мкм. Основой головки сперматозоида является ядро, где от 30,4 до 36,5 % сухого вещества содержится ДНК.

Яйцевые клетки самки – самые крупные в организме. Они богаты желтком – запасные питательные материалы. У свиноматок диаметр яйцеклетки и зародыша на первых стадиях дробления – 165 ± 0,8 мкм, объем 3,6240 млн. м³, максимальный диаметр 188,8 мкм. При этом проявляются как возрастные так и видовые особенности. Наши расчеты показали, что при средней площади головки спермия 32 мкм² и толщине – 1,2 мкм, объем головки спермия – 38,4 м³ или в 110 тыс. раз меньше, чем объем яйцеклетки.

Процесс оплодотворения. Особенность оплодотворения у свиноматок заключается в том, что яйцеклетки благодаря биологической жидкости, выделяющейся из фолликулов, и

засасывающим сокращением яйцевода быстро проходят верхнюю половину яйцевода. Располагаются яйцеклетки обычно группой. Процесс оплодотворения происходит в верхней трети яйцевода в результате чего образуется зигота. Зигота способна к дальнейшему росту и развитию. В самом процессе оплодотворения выделено четыре следующие одна за другой стадии.

В первой стадии в верхней трети яйцевода происходит встреча яйцеклеток со сперматозоидами. При этом сперматозоиды, выделяя фермент гиалуронидазу, разрыхляют фолликулярные клетки яйца. В разрыхлении фолликулярных клеток яйца не существует строго видовой специфичности сперматозоидов по отношению к яйцеклетке. Здесь могут участвовать сперматозоиды и другого вида животных. У свиней стадия разрыхления фолликулярных клеток почти отсутствует, так как яйцеклетки при прохождении яйцепровода освобождаются от фолликулярного слоя клеток.

Во второй стадии сперматозоиды проникают через прозрачную оболочку яйцеклетки. В этой стадии уже существует строгая видовая избирательность сперматозоидов. Исследования показали, что сперматозоид проникает в тело яйцеклетки наклонно, внедряясь в её плазму головкой вместе с протоплазматической частью хвоста. При этом

акросома спермия является важнейшей органеллой половой клетки, состояния которой в значительной степени определяет оплодотворяющую способность яйцеклетки. Это связано с тем, что внутри акросомы содержится фактор первого этапа оплодотворения – фермент гиалуронидаза, необходимый для разрыхления клеток лучистого венца яйцеклетки, скрепленного гиалуроновой кислотой. Кроме того, в акросоме содержится ингибитор другого важного фактора оплодотворения – трипсиноподобный фермент акрозин, который локализован под акросомой в протоплазме спермия и во внутренней ядерной мембране. Акрозин необходим для осуществления важного этапа оплодотворения – проникновения спермия через прозрачную оболочку яйца. Акрозин разжижает небольшой участок в оболочке и открывает проход для проникновения спермия. Ингибиторы акрозина содержащиеся в акросоме, не позволяют ферменту проявить свою активность раньше времени и произвести разрушительное действие на другие структуры спермия. Кроме того, неповрежденная акросома не дает возможности вытечь акрозину во внешнюю среду. После контакта спермия с яйцеклеткой происходит так называемая акросомная реакция – отторжение акросомы, а с ней и ингибиторов акрозина, что обеспечивает возможность прохождения второго этапа оплодотворения. Морфологически акросома формирует передний край головки сперматозоидов и может быть выявлена микроскопически с использованием фазового контраста или флюоресценции.

В третьей стадии происходит проникновение сперматозоида в тело яйцеклетки. В результате избирательности в тело яйцеклетки из прозрачной оболочки проникает только один сперматозоид, растворяющий ферментом гиалуронидазой протоплазму яйца, в результате чего выделяется второе полярное тельце яйцеклетки с половинным набором хромосом. В этот период происходит полное созревание яйца. Протоплазма сперматозоида растворяется в протоплазме яйца, и их пронуклеусы (ядра) сливаются.

В четвертой стадии происходит ассимиляция ядер сперматозоида и яйцеклетки с

образованием зиготы. Вначале зигота делится на два шара, затем образуется многоклеточная морула с большим числом шаров. Морула преобразуется в бластоцисту. Неоплодотворенные яйцеклетки подвергаются дегенерации, лизису и фагоцитозу, так же как и оставшиеся в половых путях сперматозоиды. Следует различать многоплодие потенциальное, эмбриональное и фактическое. Под потенциальным многоплодием – подразумевают число образовавшихся яйцеклеток в яичниках маток за один половой цикл. У свиней созревает за один половой цикл в среднем 15–25 яйцеклеток, однако около 30–50 % их погибает до и после оплодотворения на различных стадиях развития плода. По этому показателю оценивают эмбриональное многоплодие. Фактическое многоплодие – это количество родившихся живых поросят за один опорос. Потенциальное многоплодие у свиноматок базовых пород (крупная белая, ландрас) в норме 17–25 яйцеклеток, а фактическая – 10–15 поросят в гнезде, хотя биологический потенциал свиноматки по многоплодию – 30–40 яйцеклеток и 26–34 поросят за опорос от свиноматки.

Выводы

1. Впервые удалось получить нативную сперму у дикого европейского кабана (*Sus scrofa ferus*) и провести сравнительный анализ морфофункциональных показателей спермы дикого кабана и хряков современных пород.

2. Вариабельность сухой массы головок нативных спермиев у всех исследуемых пород хряков была сравнительно не большой и находилась в пределах 5–7 %, что указывает на высокое качество спермы.

3. Оплодотворяющая способность спермы зависит от сухой массы головок спермиев, количества ДНК в них и целостности структур клеток.

4. Метод интерференционной микроскопии позволяет достоверно производить морфологическую оценку размеров половых клеток, определять количество сухого вещества, белков и ДНК в головках спермиев и дифференцировать различные дефекты в строении спермиев.

Литература

1. Банников А.Г., Флинт В.Е. Жизнь животных. – М.: Просвещение, 1989. – 7. – С. 426–434.
2. Гладырь Е.А., Эрнст Л.К. Изучение генома свиней (*Sus scrofa*) с использованием ДНК-маркеров // Сельскохозяйственная биология. – 2009. – № 2. – С. 16–27.

3. Состояние мировых генетических ресурсов животных. Доклад по состоянию мировых генетических ресурсов животных. – Рим: Секретариат ФАО, 2002. – 63 с.
4. Bath A.D., Oke R.J. Abnormal morphology of bovine spermatozoa // Iowa State University Press. – 1989. – 281 p.
5. Blom E. Sperm morphology with reference to bull infertility // First All – Indian Symp. Anim. Reprod. Ludhiana. – 1977. – P. 61–81.

VASILEV V., KHOHLOV A.M.

Kharkov State Zooveterinary Academy,

Ukraine, 62341, Kharkov region, Dergachi district, v. Malaya Danilovka, Academichna str., 1, e-mail: zoovet.kharkov@gmail.com

THE PHYLOGENETIC PECULIARITY OF SEXUAL MALE CELLS AND PROCESS OF CONCEPTION IN SWINE

Aims. During many years history of domestication of swine the profound morphological, physiological and genetical changes have been occurred. Aim of our investigations was estimation of morphological and biochemical peculiarity of sperm in *Sus scrofa ferus* and boars of modern breeds. **Methods.** The fresh sperm of *Sus scrofa ferus* have been investigated. By traditional methods the volume, concentration, activity, biochemical and other indexes of sperm wild and domestic boars have been determined. Used interference microscope the frequents of various defects in structures of sperm, size, dry matter of heads, quantity DNA and protein have been determined. **Results.** In *Sus scrofa ferus* length of sperm heads was reliable smaller of sizes sexual cells of modern swine breeds boars. However, for width of sperm heads and length of middle parts take place reliable advantage in boars *Sus scrofa ferus*. Middle part of sperms has mitochondrial apparatus that promoting higher activity and better adaptation of wild *Sus scrofa ferus* sperm. **Conclusions.** At first time the native sperm from wild *Sus scrofa ferus* have been received and comparative analysis morphofunctional indexes of sperm wild boars and boars of modern breeds have been made. Method of interference microscoping permissible reliable to estimate the morphological and genetical indexes of sperm wild and domestic boars.

Key words: spermatozoa, DNA, protein, interference microscopy.

УДК 633.111 «324»:631.524.84

ВЛАСЕНКО В.А., БАКУМЕНКО О.М., ОСЬМАЧКО О.М.

Сумський національний аграрний університет,

Україна, 40021, м. Суми, вул. Г. Кондратьєва, 160, e-mail: vlasenkova@ukr.net

ХАРАКТЕРИСТИКА КОМЕРЦІЙНИХ СОРТІВ ПШЕНИЦІ М'ЯКОЇ ОЗИМОЇ З ПШЕНИЧНО-ЖИТНИМИ ТРАНСЛОКАЦІЯМИ ЗА ЕЛЕМЕНТАМИ ПРОДУКТИВНОСТІ

За останні 100 років урожайність пшениці зросла у 2,5–3,0 рази. Вважається, що половина зростання врожайності досягнута завдяки генетичним змінам, шляхом створення нових сортів у процесі селекції [1].

Для поліпшення господарсько-цінних ознак пшеничних генотипів селекціонерами широко використовуються пшенично-житні транслокації. За допомогою інтрогресивної гібридизації відбувається перенесення нових генів до геному пшениці від її дикорослих родичів або інших культурних видів *Triticaceae* [2]. У цьому відношенні інтерес представляє жито посівне *Secale cereale* L., яке, будучи цінною продовольчою культурою, використовується в схрещуваннях з пшеницею для створення як

тритикале, так і пшенично-житних транслокацій [3]. До теперішнього часу широкого поширення набули сорти пшениці м'якої, що несуть пшенично-житну транслокацію 1BL/1RS (транслокація короткого плеча хромосоми 1R жита на довге плече хромосоми 1B пшениці) і меншою мірою транслокацію 1AL/1RS (транслокація короткого плеча хромосоми 1R жита на довге плече хромосоми 1A пшениці) [4].

Компенсаційна здатність хромосоми жита 1R стосовно гомеологічних хромосом м'якої пшениці обумовлена тим, що в процесі еволюції ця хромосома, на відміну від більшості інших хромосом *S. cereale*, не була залучена в міжхромосомні перебудови [5]. У результаті таких гомеологічних заміщень цілої хромосоми

пшениці, або її короткого плеча, відбувається утворення цитологічно стабільних і фертильних рослин [6]. Крім того, селекційна цінність сортів пшениці м'якої, які несуть транслокації 1BL/1RS і 1AL/1RS, обумовлена стійкістю рослин до біотичних стресів, що визначається впливом короткого плеча хромосоми жита 1RS [7].

Плеце хромосоми жита у складі транслокації 1BL/1RS, поширене в більш ніж 650 сортах пшениці м'якої [7]. Джерелом цієї транслокації у більшості сучасних сортів пшениці є лінія Riebesel 47-51, створена Г. Рібезелем (G. Riebesel) з транслокацією від жита Petkus (2x). Сорти Аврора і Кавказ Краснодарської селекції стали батьківськими формами для створення багатьох сортів світової селекції з цією транслокацією [8].

Транслокація 1AL/1RS вперше була отримана у США. Фрагмент житньої хромосоми походить від аргентинського сорту жита Insave [9] через сорт октоплоїдного тритикале Gaucho (гібрид м'якої пшениці з Китаю сорту Chinese Spring з Insave). Першим сортом озимої пшениці з цією транслокацією став Amigo, допущений до виробничого застосування з 1976 р. Він має високу сортостворюючу здатність, адже на його основі виведено цілий ряд нових сортів – TAM 107, Century, TAM 200, TAM 201, TAM 202, Nekota, Niobrara, OH 416 [10].

Присутність 1AL/1RS транслокації, на відміну від 1BL/1RS, не призводить до різкого зниження у пшениці показників хлібопекарської якості зерна [8]. За даними показника седиментації та оцінки мікрограм рекомендують надавати перевагу саме цій транслокації при використанні як джерела цінних ознак у селекційних програмах.

Адаптація 1AL/1RS транслокації в умовах України є значним успіхом селекційної роботи. Вперше в Україні, а саме в Миронівському інституті пшениці імені В.М. Ремесла, з її участю був створений сорт Експромт, а на його основі – перший серед занесених до Державного реєстру України – Колумбія, а також пізніше – Смуглянка, Веснянка, Золотоколоса та інші [10].

Мета роботи. Провести структурний аналіз елементів зернової продуктивності у сортів пшениці – озимої носіїв пшенично-житніх транслокацій, які придатні для поширення в Україні.

Матеріали і методи

Матеріалом для наших досліджень є сорти пшениці м'якої озимої різних селекційних установ, які занесені до Державного реєстру сортів рослин, придатних для поширення в

Україні у 2012 р. Серед них виділено 7 сортів пшениці м'якої озимої – носіїв пшенично-житніх транслокацій. Сорти носії 1AL/1RS транслокації – Смулянка, Золотоколоса, Веснянка та 1BL/1RS – Ремеслівна, Миронівська 65, Калинова, Крижинка. Стандартом був сорт Подолянка, він не містить транслокацій.

Польові дослідження проводили у 2012–2013 р. на дослідному полі Сумського національного аграрного університету, що входить до північно-східної частини Лісостепу України. Ґрунти – чорноземи типові, добре оструктурені, вміст гумусу коливається близько 3,0%. Клімат даної території континентальний. Середньодобова (середньорічна) температура повітря в 2012–2013 році була 9,2 °С, що на 1,8 °С вище багаторічного показника (7,4 °С), абсолютний максимум її 39 °С відмічений у третій декаді серпня, мінімум – мінус 21,0°С в третій декаді грудня, та в першій декаді січня. Сума опадів за 2012–2013 сільськогосподарський рік становила 597,3 мм, що на 4,3 мм більше багаторічної норми (593 мм). Кількість днів з опадами за рік досліджень – 101. Гідротермічний коефіцієнт у весняно-літній період становить 1,1–1,2.

Сівбу проводили в оптимальні строки (25 вересня) ручною сівалкою СР-1 у 3-кратній повторності. Ділянки, розміщували у повтореннях систематичним способом. Норма висіву насіння склала 5 млн. шт./га. Площа ділянки 1 м², попередник – гречка. Було проведено припосівне внесення мінеральних добрив Суперагро (N₁₅P₁₅K₁₅ д.р.) і ранньовесняне підживлення аміачною селітрою (N₃₀ д.р.). Дослідження виконувалися з використанням польових, лабораторних і математично-статистичних методів. Фенологічні спостереження, обліки і оцінки, збирання врожаю проводили згідно загально прийнятих методик [11–13].

Результати та обговорення

На нашу думку, вивчення генетичних параметрів кількісних ознак та їх динаміки у сортів пшениці озимої м'якої в умовах Лісостепу України на даний час є важливим для селекції рослин. Виділені сорти мають комерційну цінність, яка визначається високою і стабільною врожайністю, стійкістю до бурої іржі та борошнистої роси, доброю якістю зерна. Ці сорти можуть бути використані в якості донорів господарсько-цінних і адаптивних ознак у селекційних програмах при створенні нових сортів пшениці. Для детального вивчення їх селекційного потенціалу варто провести аналіз елементів продуктивності як зернової, так і

вегетативної маси.

Одним з показників продуктивності вегетативної маси є висота рослин і у її складі – довжина колосу. За результатами цих показників (табл. 1) слід зазначити, що сорти Миронівська 65 та Крижинка перевищували сорт-стандарт ($78,7 \pm 3,1$) за висотою рослин на 12,1–13,4 см, а сорти Смуглянка, Веснянка та Ремеслівна мали нижчу висоту рослин на 6,6–9,7 см. За довжиною колосу стандарт перевищували сорти Смуглянка, Ремеслівна, Миронівська 65 та Крижинка на 0,8–1,2 см.

Коефіцієнт варіації у досліджуваних сортів за показниками довжини колосу, кількості колосків на колосі та маси 1000 зерен не перевищує 10 %, що свідчить про незначну мінливість. Висота рослин, кількість зерен у колосі, маса зерна з рослини мають середній (11,3–15,4 %) коефіцієнт варіації. Значний коефіцієнт варіації (22,4 %), спостерігався за показником маса зерен у колосі.

Основними елементами продуктивності колоса пшениці озимої є кількість зерен та маса зерен у колосі, які знаходяться у прямій залежності з урожайністю. За цими ознаками можна виділити сорти Смуглянка, Золотоколоса, Миронівська 65, Калинова та Крижинка, в яких ці показники перевищують стандарт. Кількість зерен у колосі в сортів склала 30,4–42,3 шт. Найбільшу кількість зерен мав сорт Миронівська 65 (42,3 шт.), перевищуючи стандарт на 8,5 шт. Маса зерен у колосі найвища була у сорту Золотоколоса (2,4 г), перевищуючи стандарт на 0,8 г. Озерненість та маса зерна з колоса визначається метеорологічними умовами і моделлю технології. Ці показники практично залежать від усіх агрозаходів та агрометеорологічних умов у період росту і формування зернівки.

У середньому сорти – носії пшенично-житніх транслокацій – перевищували стандарт за параметрами основного колосу та масою зерна з рослини. Проте деякі з сортів виділяються кращою продуктивністю за окремими показниками. Так, сорти Веснянка, Миронівська 65 та Крижинка мають масу 1000 насінин 51,6 г, що перевищує стандарт на 2,9 г. Сорти Смуглянка, Золотоколоса, Миронівська 65, Калинова та Крижинка перевищують стандарт за кількістю зерен у колосі на 3,6 шт.

Статистичні характеристики аналізу врожайності досліджуваних сортів пшениці

м'якої озимої – носіїв пшенично-житніх транслокацій – вказують на значний мінливості (табл. 2) – від 58 до 248 г/м². Коефіцієнт варіації у сортів Смуглянка, Золотоколоса, Миронівська 65, Калинова, Крижинка не перевищує 10 %, що свідчить про незначну мінливість показника. У сорту Веснянка коефіцієнт варіації середній і становить 17 %. Значний коефіцієнт варіації, більше 20 %, спостерігався у сорту Ремеслівна.

Статистичні дані свідчать про те, що середня урожайність по досліді в сортів пшениці озимої, які є носіями пшенично-житніх транслокацій, в умовах північно-східного Лісостепу становила 669 г/м². Урожайність залежала від сорту та умов вегетації рослин і варіювала від 508–791 г/м². У сорту-стандарту Подолянка врожайність становила 678–689 г/м². У середньому за показниками більшу урожайність, порівняно із стандартом мали сорти Золотоколоса (698 г/м²), Ремеслівна (693 г/м²), Миронівська 65 (743 г/м²). Сорти Смуглянка та Калинова за даним показником опинилися на рівні стандарту. Решта сортів мали меншу врожайність.

Сорти носії 1AL/IRS транслокації мали середню врожайність 654 г/м², а сорти з 1BL/IRS – 680 г/м². Загалом сорти з 1AL/IRS транслокацією порівняно з 1BL/IRS показали нижчу врожайність. Проте цей показник у сортів з 1AL/IRS транслокацією обумовлений тим, що сорт Веснянка є ранньостиглим, який поступався урожайністю середньостиглим сортам. Окрім цього транслокація 1AL/IRS має менший негативний вплив на формування хлібопекарської якості зерна. Тому сорти з 1AL/IRS транслокацією відносяться до сильних (Смуглянка, Веснянка) та цінних (Золотоколоса) пшениць, а сорти з 1BL/IRS – до цінних пшениць.

Розглянувши область похибки показників урожайності сортів виявили, що суттєве відхилення спостерігалось між сортами Веснянка (524–630 г/м²) і Миронівська 65 (715–770 г/м²), вони не перекривались один з одним, а значить між ними є істотна різниця. Ці сорти універсальні, але різняться за групою стиглості, очевидно, цей фактор має вплив на рівень загального врожаю. З наведених даних видно, що в інших досліджуваних сортів у даних умовах досліджень відсутня істотна різниця за показниками врожайності.

Таблиця 1. Характеристика сортів пшениці м'якої озимої, які є носіями пшенично-житніх транслокацій, за показниками продуктивності (2012–2013 рр.)

Сорт	Висота рослин, см	Параметри основного колосу				Маса 1000 насінин, г	Маса зерна з рослини, г
		Довжина колосу, см	Кількість колосків на колосі, шт.	Кількість зерен у колосі, шт.	Маса зерен у колосі, г		
Подольнка (St)	78,7	7,6	16,8	33,8	1,6	48,7	3,0
Смуглянка	69,8	8,5	18,1	36,1	1,7	46,9	3,4
Золотоколоса	76,4	7,4	16,7	34,8	2,4	48,1	2,9
Веснянка	72,1	7,2	14,9	30,4	1,5	51,9	3,2
Ремеслівна	69,0	8,6	16,4	32,3	1,1	38,1	2,2
Миронівська 65	92,1	8,8	19,1	42,3	2,1	53,5	3,9
Калинова	79,5	7,5	16,7	36,4	1,7	48,6	3,3
Крижинка	90,8	8,4	18,5	37,6	1,9	49,4	3,3
V, %	11,3	7,9	7,8	10,1	22,4	9,5	15,4
\bar{x}	78,6	8,0	17,2	35,5	1,8	48,2	3,2
S \bar{x}	3,1	0,2	0,5	1,3	0,1	1,6	0,2

Таблиця 2. Статистичні характеристики врожайності у сортів пшениці м'якої озимої – носіїв пшенично-житніх транслокацій

Сорт	Ліміти варіації,		Розмах варіювання, г/м ²	V, %	Врожайність (г/м ²)		S \bar{x} , г/м ²	Область похибки, г/м ²
	min.	max.			\bar{x}	St +/-		
Смуглянка	656	740	85	7	686	2	27	658-713
Золотоколоса	650	735	85	6	698	14	25	673-723
Веснянка	508	681	173	16	577	-107	53	524-630
Ремеслівна	529	778	248	20	693	9	82	611-775
Миронівська 65	694	791	97	6	742	59	28	715-770
Калинова	634	731	96	7	682	-2	28	655-710
Крижинка	572	630	58	5	603	-81	3	601-606

Висновки

За основними елементами продуктивності колоса (кількістю та масою зерен у колосі) виділилися сорти Смуглянка, Золотоколоса, Миронівська 65, Калинова, Крижинка, в яких ці показники перевищують стандарт. Найбільшу кількість зерен у досліді мав сорт Миронівська 65, а найвищу масу зерен у колосі – Золотоколоса. В середньому за параметрами основного колосу та масою зерна з рослини сорти – носії пшенично-житніх транслокацій – перевищують стандарт. Високою урожайністю,

порівняно з стандартом, виділились – Золотоколоса, Ремеслівна, Миронівська 65. Загалом, урожайність сортів залежала від групи стиглості, про що свідчить суттєве відхилення показника врожайності у сортів Веснянка та Миронівська 65.

На нашу думку є актуальним подальше вивчення сортів – носіїв пшенично-житніх транслокацій – та залучення їх до подальшої роботи при створенні нового селекційно-цінного вихідного матеріалу пшениці м'якої озимої.

Література

1. Бондар Л.П. Генетичний аналіз господарських ознак сортів озимої м'якої пшениці різних років селекції: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. біологічних наук: спец. 03.00.15 – «Генетика» / Л.П. Бондар. – Одеса – 2003. [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://disser.com.ua/contents/14615.html>.
2. Jiang J., Friebe B., Gill B.S. Recent advances in alien gene transfer in wheat // *Euphytica*. – 1994. – 73. – P. 199–212.
3. Lukaszewski A.J., Gustafson J.P., Apolinarska B. Transmission of chromosomes through the eggs and pollen of triticale × wheat F1 hybrids // *Theor. Appl. Genet.* – 1982. – 63. – P. 49–55.
4. Козуб Н.А., Созинов И.А., Собко Т.А., Колючий В.Т., Власенко В.А., Нецветаев В.П., Созинов А.А. Сорты мягкой пшеницы украинской и российской селекции с геном устойчивости к стеблевой ржавчине SrRS^{Amigo} // Управление производственным процессом в агротехнологиях 21 века: реальность и перспективы. Материалы Междунар. науч.-практ. конф., посвящ. 35-лет. образования Белгородского НИИСХ, 15–16 июля 2010 г. – Белгород: «Отчий край», 2010. – С. 222–225.
5. Naranjo T., Fernandez-Rueda P. Homeology of rye chromosome arms to wheat // *Theor. Appl. Genet.* – 1991. – 82. – P. 577–586.
6. Friebe B., Jiang J., Raupp W.J. et al. Characterization of wheat-alien translocations conferring resistance to diseases and pests: current status // *Euphytica*. – 1996. – 91. – P. 59–87.
7. Белан И.А., Россеева Л.П., Трубачева Н.В. и др. Особенности хозяйственно ценных признаков линий сорта яровой мягкой пшеницы омская 37, несущих пшенично-ржаную транслокацию 1RS.1BL // *ВОГиС*, № 4, 2010. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.bionet.nsc.ru/vogis/pict>.
8. Власенко В.А., Кочмарський В.С., Колючий В.Т., Коломієць Л.А., Хоменко С.О., Солоня В.Й. Селекційна еволюція миронівських пшениць / під заг. ред. В.А. Власенко. – Миронівка, 2012. – 330 с.
9. Rabinovich S.V. Importance of wheat-rye translocations for breeding modern cultivars of *Triticum aestivum* L. // *Euphytica*. – 1998. – 100. – P. 323–340.
10. Колючий В.Т. Селекція пшениці озимої на якість зерна в Лісостепу України [Електронний ресурс] // Селекція і насінництво. – 2011. – № 100. – Режим доступу: <http://archive.nbuv.gov.ua/portal>.
11. Методика державного випробування сортів рослин на придатність до поширення в Україні: Загальна частина // Охорона прав на сорти рослин: Офіційний бюл. / гол. ред. В.В. Волкодав. – К.: Алефа, 2003. – Вип. 1, ч.3. – 106 с.
12. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта. – М.: Агропромиздат, 1985. – 352 с.
13. Руденко М.И., Шитова И.П., Корнейчук В.А. Методические указания по изучению мировой коллекции пшеницы: Издание третье, переработанное / под ред. В.Ф. Дорофеева. – Л., 1977. – 28 с.

VLASENKO V.A., BAKUMENKO O.M., OS'MACHKO O.M.

National Agrarian University of Sumy,

Ukraine, 40021, Sumy, G. Kondratiev str., 160, e-mail: vlasenkova@ukr.net

DESCRIPTION OF COMMERCIAL CULTIVARS OF WINTER BREAD WHEAT WITH WHEAT-RYE TRANSLOCATIONS ON THE ELEMENTS OF THE PRODUCTIVITY

Aims. In commercial cultivars of bread winter wheat – carrier of wheat-rye translocation – to conduct a structural analysis of the productivity elements. **Methods.** Studies were conducted using field, laboratory and mathematical-statistical methods. Phenological observation, calculation and evaluation of harvesting was performed according to generally accepted methods. **Results.** Cultivars – carrier of wheat-rye translocations – are high yielding potential and not inferior to the elements of the productivity standard. Cultivars Smuglyanka, Zolotokolosa, Myroniv'ska 65 Kalynovaya and Kryzhynka distinguished by the number and weight of grains in the ear. Yield grades depended on the group of the maturity. Zolotokolosa, Remeslivna and Myroniv'ska 65 had higher yields compared to the standard. **Conclusion.** Cultivars with the best indicators of productivity elements are recommended for breeding.

Key words: Winter wheat, yielding capacity, cultivars, wheat-rye translocations.

МІНЛИВІСТЬ КІЛЬКІСНИХ ОЗНАК СЕЛЕКЦІЙНО-ЦІННИХ ЗРАЗКІВ ПЕРЦЮ СОЛОДКОГО ЗА УМОВ АПОМІКТИЧНОГО РОЗМНОЖЕННЯ

На теперішній час найбільшого поширення у сортовій і гібридній селекції перцю солодкого набув досить трудомісткий за кількістю операцій та часовою тривалістю спосіб генетичної стабілізації селекційного матеріалу, який ґрунтується на використанні родинного відбору із гібридних популяцій рослин. Такий процес відбору може тривати протягом 5–7 поколінь залежно від досягнення потрібної стабільності спадкування досліджуваних господарсько-цінних ознак [1]. Селекційна технологія цього відбору ґрунтується на постійному відборі рослин із популяцій родин, які в принципі не можуть бути стопроцентними диплоїдними гомозиготами за всіма комплексами генів, оскільки завжди знаходяться у гетерозиготному стані [1]. Так навіть при самозапиленні на протязі 10 поколінь гомозиготність за двома аелями одного гена буде дорівнювати 98 %, чим більше генів використовується у процесі родинного добору, тим менший буде ступінь гомозиготності спостерігатиметься у рослин, що входять до популяції родин [2].

Для підвищення результативності селекції перцю солодкого існує нагальна потреба у розробці більш ефективних та прискорених методів генетичної стабілізації селекційно-цінних матеріалів. Для досягнення практично 100 % диплоїдної гомозиготизації цінних генотипів цієї овочевої рослини у селекційній практиці доцільно використовувати генетичне явище нерегулярного апоміксису. В Інституті овочівництва і баштанництва НААН протягом 2007–2013 років за даним напрямом проводяться генетико-селекційні дослідження, розроблено ефективний спосіб стимуляції росту незапліднених насінневих зародків перцю солодкого, створено лінії перцю солодкого апоміктичного походження. Останніми роками проводиться їх оцінка за комплексом господарсько-цінних ознак за умов вирощування у відкритому і захищеному ґрунті.

Матеріали і методи

У досліді використовувалися лінії перцю солодкого, які були утворені від селекційно-цінних форм, здатних формувати апоміктичне насіння після розробленого способу стимуляції

росту з незапліднених насінневих зародків [3].

Оцінку ліній перцю солодкого за комплексом кількісних ознак проведено за умов їх вирощування у захищеному ґрунті, згідно методичних рекомендацій ВІР [4] та класифікатору [5]. Біометричні показники рослин перцю солодкого проводилися у період біологічної стиглості плодів за такими кількісними показниками: «Висота рослин», «Довжина листка», «Ширина листка», «Діаметр плоду», «Довжина плоду», «Товщина перикарпю», «Кількість плодів на рослині», «Маса плоду». Статистичний обробіток експериментального матеріалу проведено за методиками Деревицького [6] і Доспехова [7].

Рівень мінливості характеризували за допомогою таких статистичних показників: « X_m » – середнє арифметичне; « m_x » – похибка середньоарифметичної, « σ » – середнє квадратичне відхилення; « $Lim = v_{min} \times v_{max}$ » – ліміт варіювання ознаки, « $Am = v_{max} - v_{min}$ » – амплітуда варіювання ознаки, « $CV, \%$ » – коефіцієнт варіації.

Результати та обговорення

Протягом 2012–2013 років проведено дослід з визначення особливостей прояву кількісних ознак ліній-апоміктів перцю солодкого, які вирощувалися в умовах скляної теплиці без обігріву. Всього досліджено 11 ліній: К-30314 Д183А, К-30315 Д184А, К-30316 Д185А, К-30317 Д185А, К-30318 Д187А, К-30319 Д194А, К-30320 Д195А, К-30321 Д201А, К-30325 Д204А, К-30323 Д203А та F1 Злагода лінія 01 К304497. За стандарт були прийняті два сорти перцю солодкого Піонер і Дружок. На відміну від сортів-стандартів, які розмножувалися шляхом вільного перезапилення рослин в межах популяції сорту, розмноження відібраних ліній супроводжувалося виключно методом індукованого апоміксису, тобто за рахунок стимуляції росту незапліднених зародків, відповідно до розробленої нами методики [3].

Мета досліду – провести порівняльний аналіз ефективності генетичної стабілізації кількісних ознак селекційно-цінних зразків перцю солодкого за умов вільного запилення та апоміктичного розмноження. Нижче надано найменші та найбільші значення статичних

показників кількісних ознак рослин перцю, що належать до різних сортових і лінійних популяцій (табл.). Дані статистичні показники використовуються в селекційній практиці як критерії ступеню генетичної стабілізації кількісних ознак [6, 7].

За ознакою «Висота рослин» уся вибірка селекційно-цінних зразків перцю солодкого варіювала в межах 45,02–71,54 см. Найменшим значенням цієї ознаки відзначився зразок К-30316 Д185А, найбільшим сорт-стандарт Дружок. При цьому розмах значень показника « σ » для дослідженої вибірки зразків перцю солодкого становив 6,48–15,38, «CV» = 12,68–26,41 %. Найбільш генетично стабільним виявився зразок К-30317 Д185А (« σ » = 6,48 і «CV» = 12,68 %). Найбільше значення статистичного показника « σ » = 15,38 відмічено у зразка F1 Злагода лінія 01 К304497, найбільше значення «CV» = 26,41 % відмічено у зразка К-30319 Д194А.

За ознакою «Довжина листка» уся вибірка селекційно-цінних зразків перцю солодкого варіювала в межах 10,68–14,74 см. Найменшим значенням цієї ознаки відзначився зразок К-30316 Д185А, найбільшим сорт-стандарт Піонер. При цьому розмах значень показника « σ » для дослідженої вибірки зразків перцю солодкого становив 1,60–3,62, «CV» = 12,54–28,57 %). Найбільш генетично стабільним виявився зразок К-30315 Д184А (« σ » = 1,6 і «CV» = 12,54 %). Найбільше значення статистичного показника « σ » = 3,37 і «CV» = 28,57 % відмічено у зразка К-30319 Д194А.

За ознакою «Ширина листка» уся вибірка селекційно-цінних зразків перцю солодкого варіювала в межах 4,74–6,84 см. Найменшим значенням цієї ознаки відзначився зразок К-30316 Д185А, найбільшим сорт-стандарт Піонер. При цьому розмах значень показника « σ » для дослідженої вибірки зразків перцю солодкого становив 0,80–2,38, «CV» = 12,61–40,48 %. Найбільш генетично стабільним виявився зразок К-30315 Д184А (« σ » = 1,6 і «CV» = 12,54 %). Найбільше значення статистичного показника « σ » = 2,38 і «CV» = 40,48 % відмічено у зразка К-30325 Д204А.

За ознакою «Довжина плоду» уся вибірка селекційно-цінних зразків перцю солодкого варіювала в межах 7,22–9,81 см. Найменшим значенням цієї ознаки відзначився зразок К-30323 Д203А, найбільшим зразок F1 Злагода лінія 01 К304497. При цьому розмах значень показника « σ » для дослідженої вибірки зразків перцю солодкого становив 0,89–2,46, «CV» = 9,06–29,57 %. Найбільш генетично стабільним

виявився зразок К-30323 Д203А (« σ » = 0,89 і «CV» = 9,06 %). Найбільше значення статистичного показника « σ » = 2,46 і «CV» = 29,57 % відмічено у зразка F1 Злагода лінія 01 К304497.

За ознакою «Діаметр плоду» уся вибірка селекційно-цінних зразків перцю солодкого варіювала в межах 5,11–6,38 см. Найменшим значенням цієї ознаки відзначився зразок К-30316 Д185А, найбільшим сорт-стандарт Дружок. При цьому розмах значень показника « σ » для дослідженої вибірки зразків перцю солодкого становив 0,56–1,81, «CV» = 10,24–35,28 %. Найбільш генетично стабільним виявився зразок К-30321 Д201А (« σ » = 0,56 і «CV» = 10,24 %). Найбільше значення статистичного показника « σ » = 1,81 і «CV» = 35,28 % відмічено у зразка К-30325 Д204А.

За ознакою «Товщина перикарпію» уся вибірка селекційно-цінних зразків перцю солодкого варіювала в межах 3,50–4,71 см. Найменшим значенням цієї ознаки відзначився зразок К-30325 Д204А, найбільшим зразок К-30320 Д195А. При цьому розмах значень показника « σ » для дослідженої вибірки зразків перцю солодкого становив 0,46–1,99, «CV» = 11,05–51,36 %. Найбільш генетично стабільним виявився зразок К-30315 Д184А (« σ » = 0,46 і «CV» = 11,05 %). Найбільше значення статистичного показника « σ » = 1,99 і «CV» = 51,36 % відмічено у зразка К-30314 Д183А.

За ознакою «Кількість плодів на рослині» уся вибірка селекційно-цінних зразків перцю солодкого варіювала в межах 4,75–11,0 см. Найменшим значенням цієї ознаки відзначився зразок К-30316 Д185А, найбільшим зразок К-30319 Д194А. При цьому розмах значень показника « σ » для дослідженої вибірки зразків перцю солодкого становив 2,05–6,12, «CV» = 25,05–55,64 %. Найбільш генетично стабільним за двома статистичними показниками виявився сорт Піонер (« σ » = 2,11 і «CV» = 25,05 %). Найбільше значення статистичного показника « σ » = 6,12 і «CV» = 55,64 % відмічено у зразка К-30319 Д194А.

За ознакою «Маса плоду» уся вибірка селекційно-цінних зразків перцю солодкого варіювала в межах 60,42–108,25 см. Найменшим значенням цієї ознаки відзначився зразок К-30319 Д194А, найбільшим зразок К-30320 Д195А. При цьому розмах значень показника « σ » для дослідженої вибірки зразків перцю солодкого становив 15,51–48,02, «CV» = 20,73–74,78 %. Найбільш генетично стабільним за двома статистичними показниками виявився зразок К-

30318 Д187А («σ» = 15,51 і «CV» = 22,58 %). Найбільше значення статистичного показника «σ» = 48,02 і «CV» = 74,78 % відмічено у зразка К-30325 Д204А.

Усі досліджені зразки перцю солодкого мали розмах значень коефіцієнту варіації в межах 30 % за такими ознаками, як «Висота рослин», «Довжина листка» і «Довжина плоду». В таблиці 1 представлено дані по зразкам перцю солодкого, які мали найменший розмах варіювання окремих кількісних ознак рослин у фазі біологічної стиглості плодів. Серед досліджених зразків лідируюче місце займають п'ять ліній-апоміктів – К-30315 Д184А, К-30317 Д185А, К-30321 Д201А, К-30323 Д203А, К-30318 Д187А. Найбільш генетично-стабільною виявилася лінія К-30315 Д184А, у якої за трьома ознаками «Довжина листка», «Ширина листка» і «Товщина перикарпію» спостерігалось найменше варіювання статистичних показників. Слід, також, відзначити, що у 5 ліній-апоміктів, окрім ліній К-30317 Д185А і К-30318 Д187А, значення статистичного показника «σ» (середнє квадратичне відхилення) було в межах одиниці або навіть менше одиниці (табл.), що є свідченням високої генетичної стабільності дослідженої кількісної ознаки. Серед сортів-стандартів, лише сорт Піонер відзначився

найменшим розмахом варіювання за такою ознакою, як «Кількість плодів на рослині».

Висновки

Проведено порівняльний аналіз мінливості 8 кількісних ознак («Висота рослин», «Довжина листка», «Ширина листка», «Діаметр плоду», «Довжина плоду», «Товщина перикарпію», «Кількість плодів на рослині», «Маса плоду») селекційно-цінних зразків перцю солодкого за різних способів розмноження – шляхом вільного переzapилення рослин та шляхом індукованого апоміксису. Встановлено, що найбільш генетично стабільними за фенотипічним проявом виявилися кількісні ознаки рослин, що належать популяціям ліній-апоміктів. Серед сортів-стандартів, що розмножувалися методом внутрішньосортного вільного переzapилення лише сорт Піонер відзначився найменшим розмахом варіювання за ознакою «Кількість плодів на рослині». Таким чином, в наших дослідженнях на рівні біометричного аналізу рослин перцю солодкого було доведено переваги розробленого методу індукованого апоміксису, який дозволяє більш ефективно проводити генетичну стабілізацію вихідного селекційного матеріалу на від відміну від традиційного методу, який ґрунтується на тривалому у часі родинному відборі із гібридних популяцій рослин.

Таблиця. Кількісні ознаки досліджених зразків перцю солодкого, що мали найменший розмах варіювання кількісних ознак у фазі біологічної стиглості плодів, середнє за 2012–2013 рр.

Зразок	Статистичні показники кількісних ознак				
	$X_m \pm m_x$	σ	CV, %	$Lim = v_{min} \times v_{max}$	$A_m = v_{max} - v_{min}$
	Висота рослин, см				
К-30317 Д185А	51,12±1,87	6,48	12,68	42,40 × 66,30	23,90
	Довжина листка, см				
К-30315 Д184А	12,76±0,48	1,60	12,54	10,20 × 15,50	5,30
	Ширина листка, см				
К-30315 Д184А	6,37±0,24	0,80	12,61	5,20 × 7,50	2,30
	Кількість плодів на рослині, шт.				
с. Піонер, st	8,42 ± 0,61	2,11	25,05	5,0 × 12,0	7,00
	Довжина плоду, см				
К-30323 Д203А	9,81 ± 0,26	0,89	9,06	8,50 × 11,0	2,50
	Діаметр плоду, см				
К-30321 Д201А	5,47 ± 0,16	0,56	10,24	4,20 × 6,00	1,80
	Маса плоду, г				
К-30318 Д187А	68,69 ± 4,30	15,51	22,58	66,0 × 120,0	54,00
	Товщина перикарпію, мм				
К-30315 Д184А	4,18 ± 0,14	0,46	11,05	3,50 × 5,00	1,50

Література

1. Куракса Н.П., А.В. Мельник Рід перець (*Capsicum* Tourm.) // Сучасні методи селекції овочевих і баштанних культур. – Харків, 2001. – С. 287–300.
2. Тоцький В.М. Генетика. Одеса: Агропринт, 2002. – 712 с.
3. Кондратенко С.І., Куракса Н.П., Крутько Р.В., Пилипенко Л.В., Гарт О.Ю., Корнієнко С.І. Спосіб стимуляції росту незапліднених насінневих зародків перцю солодкого (*Capsicum spec* L.) для одержання апоміктичного насіння. Патент на корисну модель № 83962 від 10.10.2013. Бюл. № 19.
4. Методические указания по изучению и поддержанию мировой коллекции овощных пасленовых культур (томаты, перцы, баклажаны). – Л., 1977. – 24 с.
5. Международный классификатор СЭВ вида *Capsicum annum* L. – Л., 1986. – 40 с.
6. Деревицкий Н.Ф. Опытное дело в растениеводстве. – Кишинев: Штиинца, 1962. – 616 с.
7. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта. – М.: Колос, 1985. – 351 с.

GART O.U., KONDRATENKO S.I., KURAKSA N.P.

Institute of Vegetable and Melon Growing or Natl. Acad. Agr. Sci of Ukraine, Ukraine, 62478, p.o. Seleksiynе, Kharkiv rg., Institutskaya str., 1, e-mail: ovoch.iob@gmail.com

VARIABILITY OF QUANTITATIVE TRAIT OF BREEDING SWEET PEPPER SAMPLES UNDER APOMICTIC REPRODUCTION

Aims. A comparative analysis of the effectiveness of stabilization genetic breeding and quantitative traits of samples of sweet pepper under free pollination and apomictic reproduction. **Methods.** In the experiment used a line of sweet pepper, which were derived from breeding and of forms that can generate apomictic seed after developed a method of stimulating the growth of unfertilized seed embryos. **Results.** A comparative analysis of the variability of quantitative traits 8 (“Height of plant”, “Leaf length”, “Width leaf”, “Turning fruit”, “Fruit length”, “Wall thickness fruit”, “Number of fruits per plant”, “Weight of the fetus”) selection and designs of sweet pepper by different methods of reproduction – by free pollination of plants and by means of induced apomixis. Found that the most genetically stable for phenotypic expression were quantitative traits of plants belonging to populations of apomictic lines. **Conclusions.** Thus, in our studies at the level of biometric analysis of sweet pepper plants have been proven advantages of the developed method induced apomixis, which allows for more efficient conduct genetic stabilization source of breeding material in contrast to the traditional method, which is based on long-time family selection of hybrid populations of plants.

Key words: sweet pepper, induced apomixis, reproduction, quantitative trait, line.

УДК 636.4.082:575.827

ДРАГУЛЯН М.В.¹, КОСТЕНКО С.А.², СИДОРЕНКО Е.В.³

¹ *Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Украина, 03143, г. Киев, ул. Акад. Заболотного, 150, e-mail: parus_major@ukr.net*

² *Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины, Украина, 03041, г. Київ, вул. Героїв Оборони, 15, e-mail: swetakostenko@mail.ru*

³ *Институт разведения и генетики животных НААН Украины, Украина, 08321, Київська обл., с. Чубинське, вул. Погребняка, 1, e-mail: sydorenkoolena@ukr.net*

КОМПЛЕКСНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СВИНЕЙ ПО ЦИТО- И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИМ МАРКЕРАМ

Гормон пролактин – полифункциональный белок, он участвует в регуляции ряда физиологических функций в организмах млекопитающих, включая процессы осморегуляции, размножения, иммунорегуляции, роста и развития. Рецепторы пролактина обнаруживаются почти во всех органах и тканях, и размещаются преимущественно на поверхности

мембраны, а также в аппарате Гольджи [7]. Известно, что геномный дисбаланс имеет связь с активностью генов [1]. К сожалению, на сегодняшний день большинство исследований направлено на изучение дифференцированного влияния генотипов гена *PRLR* на репродуктивные качества свиней, но недостаточно внимания уделяется изучению связи желаемых

генотипов гена со стабильностью генома животного.

Целью данной работы было выявление и анализ полиморфизма гена *PRLR* и его связь с репродуктивными качествами свиноматок украинской мясной и уэльской пород, а также связи генотипов со стабильностью генома животного.

Материалы и методы

Отбор генетического материала (кровь, волосяные фолликулы) проводили у свиноматок пород уэльской ($n = 120$) и украинской мясной ($n = 73$), которых разводят в ДП ДХ «Гонтаровка» Харьковской области. Генетический анализ осуществляли в лаборатории генетики Института разведения и генетики животных УААН.

Для изучения стабильности генома использовали микроядерный тест. Подсчет микроядер (МЯ) осуществляли на цитогенетических препаратах. Препараты готовили стандартным методом. Классификация и учет цитогенетических нарушений проводили в соответствии с общепринятыми рекомендациями [5]. Для анализа клеток использовали световой микроскоп LOMO-65 с использованием штатного набора объективов при увеличении 90x15. Геномную ДНК выделяли с помощью комплекта реактивов «ДНК – сорб В» (АмплиСенс, Россия). Анализ полиморфизма гена *PRLR* проводили методом ПЦР – ПДРФ по методике С. Drogemuller et al. [6].

Результаты и обсуждение

Исследованные нами микропопуляции пород свиней оказались полиморфными по гену *PRLR*. Обнаружены высокие частоты генотипа *AA* у свиней украинской мясной породы ($AA - 0,52 \pm 0,058$), в то время как у свиноматок уэльской породы частота генотипа *AA* составляла лишь $0,34 \pm 0,043$ (табл. 1). Разница между распределением частот генотипа *AA* среди исследованных пород достоверна ($p < 0,01$).

Отмечалась разница между распределением частот аллелей в исследованных микропопуляциях свиней. Сравнивая полученные данные по частотам распределения генотипов с результатами исследований других авторов обнаружены высокие частоты генотипа *AA* у свиней украинской мясной породы ($AA - 0,52 \pm 0,058$), в то время как по данным А.А.

Епишко [2] частота генотипа *AA* у свиней аналогичной породы (белорусская мясная) была $0,22$.

Изучение связи полиморфизма гена *PRLR* с многоплодием свиноматок украинской мясной и уэльской пород при первом опоросе показало, что аллель *A* гена ассоциирован с большим количеством поросят при рождении, и с более высокими показателями сохранности молодняка (%). У свиноматок уэльской породы многоплодие животных генотипа *AA* по сравнению с животными генотипа *AB* было больше на $1,72$ гол. ($p < 0,001$), животные с генотипом *AA* при первом опоросе в гнезде имели на $1,87$ поросят ($p < 0,001$) больше по сравнению со свиноматками генотипа *BB*. Свиноматки украинской мясной породы генотипа *AA* при первом опоросе рождали больше на $0,52$ поросенка по сравнению с животными генотипа *AB*, животные с генотипом *AA* при первом опоросе имели больше на $0,22$ поросенка по сравнению с животными генотипа *BB* (табл. 2).

На следующем этапе нашего исследования нас интересовала связь генотипов *PRLR* со стабильностью генома животного. Были построены индивидуальные маркерные профили свиноматок исследованных пород отдельно для животных-носителей желаемого аллеля ($PRLR^{AA} + PRLR^{AB}$) и для животных с гомозиготным генотипом носителей нежелательного аллеля $PRLR^{BB}$.

У животных-носителей желаемого аллеля даже при высоком уровне лейкоцитов с микроядрами сохраняется высокое многоплодие и процент сохранности потомства (табл. 3).

У свиноматок, которые не имели желаемого аллеля с увеличением уровня клеток крови с МЯ – уменьшается процент сохранности и многоплодие (табл. 3).

Индивидуальные профили свиноматок двух пород подтверждают взаимосвязь стабильности генома животного от генотипа гена *PRLR*. Доказано, что пролактин в относительно высоких концентрациях стимулирует лимфоциты, которые начинают вырабатывать цитокины провоспалительного спектра действия, регулирующие апоптоз клеток [3], производит протеин, регулирует иммунитет животного. Лимфоцит, в свою очередь, синтезирует пролактин [4].

Таблица 1. Распределение частот генотипов по гену PRLR у свиней украинской мясной и уэльской пород

Порода	n	Частота								χ^2
		Генотип						аллель		
		AA		AB		BB		A	B	
Уэльская	120	Ф	0,34 ± 0,043	Ф	0,38 ± 0,044	Ф	0,28 ± 0,041	0,53 ± 0,016	0,47 ± 0,017	6,75
		О	0,28 ± 0,041	О	0,22 ± 0,038	О	0,50 ± 0,046			
Украинская мясная	73	Ф	0,52 ± 0,058 ***	Ф	0,13 ± 0,039	Ф	0,35 ± 0,056	0,58 ± 0,019	0,42 ± 0,022	38,90
		О	0,33 ± 0,055	О	0,18 ± 0,045	О	0,49 ± 0,059			

Примечание: Желаемый аллель выделен жирным шрифтом; Ф – частота фактического генотипа; О – частота теоретически ожидаемого генотипа; *** $p < 0,001$ по сравнению с уэльской породой.

Таблица 2. Сравнительный анализ многоплодия свиноматок украинской мясной и уэльского пород в зависимости от генотипа PRLR (первый опорос)

Генотип	Количество животных	Многоплодие, гол.	Разница к AA
Уэльска порода			
BB	35	9,34 ± 0,34***	
AB	53	11,06 ± 0,21***	+1,72
AA	32	11,21 ± 0,36***	+1,87
Украинская мясная порода			
BB	27	10,48 ± 0,33	
AB	9	11,0 ± 0,28	+0,52
AA	36	10,26 ± 0,21	-0,22

Примечание: Желаемый аллель выделено жирным шрифтом; *** $p < 0,001$ между генотипами PRLR^{BB} и PRLR^{AB}, между генотипами PRLR^{BB} и PRLR^{AA}.

Таким образом, экспрессия пролактина ассоциирована с активностью репарационных систем ДНК. Не следует забывать, что половые гормоны существенно влияют на функции не только репродуктивной, но и других систем организма. В медицине половые гормоны применяются как для заместительной терапии эндокринных заболеваний, так и при лечении акушерско-гинекологических болезней и как противоопухолевое средство при новообразованиях предстательной и молочных желез. Поэтому проведение генотипирования животных с целью изучения полиморфизма гена PRLR может быть полезно не только с точки зрения повышения многоплодия животных, но и с точки зрения устойчивости организма к заболеваниям.

Выводы

Исследованные микропопуляции свиней украинской мясной и уэльского пород были полиморфными по гену рецептора пролактина (PRLR). Аллель A оказался ассоциированным с большим количеством одившихся поросят и их сохранением. У животных-носителей желаемого аллеля A даже при повышенном уровне лейкоцитов с микродрями сохраняется высокое многоплодие. Животные генотипа BB имеют тесную отрицательную связь частоты микроядерных клеток с многоплодием. Отсутствие связи цитогенетической нестабильности животных генотипов AA и AB с многоплодием свиноматок свидетельствует о наличии в репродуктивной системе компенсаторных механизмов, в которые вовлечен рецептор пролактина.

Таблица 3. Связь генотипов *PRLR* со стабильностью генома свиноматок

Идентификационный номер	Семейство	Генотип	Микроядра, %	Многоплодие, гол.	Сохранность, %
Уэльская порода					
470	Лайк Герл	AA	4,25	11	100
356	Лайк Герл	AA	5,3	12	91,6667
200	Лайк Герл	AA	3,3	11	90,9091
342	Импоузин	AA	6,7	10	80
8520	Импоузин	AB	4,6	12	83,3333
8478	Дон Мист	AB	5,2	12	83,3333
5078	Лайк Мейд	AB	4	11	100
6512	Лайк Герл	AB	4,8	11	90,9091
1598	Лайк Герл	AB	5,25	9	100
34	Лайк Герл	AB	4,5	15	86,6667
1014	Лайк Герл	AB	4	11	90,9091
5144	Лайк Герл	AB	7	11	72,72727
8542	Емма	BB	3,7	11	81,8182
6348	Лайк Герл	BB	5	11	90,9091
5614	Импозиум	BB	4,7	10	100
330	Импоузин	BB	3,98	7	100
1000	Лайк Мейд	BB	3,5	9	88,8889
4802	Дон Мист	BB	6,5	12	75
1090	Лайк Герл	BB	5,8	5	0
Украинская мясная порода					
220	Цапля	AA	4,6	10	100
694	Цапля	AA	3,5	11	100
214	Цапля	AA	4,56	11	90,90909
32	Цапля	AA	6,56	10	60
674	Церера	AA	4,5	11	81,81818
638	Целина	AA	1,55	11	100
208	Целина	AA	1,67	10	100
66	Целина	AA	2	11	100
852	Церера	AB	4,2	10	100
640	Цензура	AB	3,4	12	100
1074	Цапля	BB	3,4	10	90
1070	Цапля	BB	4,67	10	100
616	Цапля	BB	3,5	12	91,66667
230	Цапля	BB	7,6	8	0
816	Цензура	BB	3	11	72,72727
808	Цензура	BB	3,4	6	91,66667
28	Цензура	BB	5,9	5	100

Литература

1. Анацкая О.В., Виноградов А.Е. Полиплоидия мышечных клеток сердца // Цитология. – 2004. – 46. – № 2. – С. 105–113.
2. Епишко О.А. Гены, детерминирующие воспроизводительную функцию свиноматок // Весці нацыянальнай акадэміі навук Бэларусі. – 2008. – № 2. – С. 81–85.
3. Пролактин защищает от воспаления суставов [Электронный ресурс] / Новости из медицинских лабораторий США – август 2013. – Режим доступа: <http://medbe.ru/news/meditsina/novosti-iz-meditsinskikh-laboratoriy-ssha-avgust-2013/>
4. Фролов А.К., Фролова Л.А., Федотов Е.Р., Копейка В.В. Характеристика популяций лимфоцитов крови у женщин в перименопаузе на фоне артериальной гипертензии // Проблемы экологии та медицини. – 2007. – 11. – № 3–4. – С. 10–14.
5. Яковлев А.Ф. Цитогенетическая оценка племенных животных. – М.: Агропромиздат, 1985. – 256 с.
6. Drogemuller C., Hamann H., Dist O. Candidate gene markers for litter size in different German piglines // J. Anim. Sci. – 2001. – N 79. – P. 2565–2570.
7. Кмієж М., Terman A. Associations between the prolactin receptor gene polymorbism and reproductive traits of boars // J. Appl Gene. – 2006. – 47. – N 2. – P. 139–141.

DRAHULYAN M.¹, KOSTENKO S.O.², SIDORENKO O.V.³

¹ Instytut Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine, Ukraine, 03143, Kyiv, Akad. Zabolotnoho, 150, e-mail: parus_major@ukr.net

² Natsionalnyy University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, Ukraine, 03041, Kyiv, Heroes of Defense, 15, e-mail: swetakostenko@mail.ru

³ Institute of Animal Breeding and Genetics NAAS of Ukraine, Ukraine, 08321, Kyiv region, p. Chubinskoe str, Pogrebnyak, 1, e-mail: sydorenkoolena@ukr.net

INTEGRATED RESEARCH PIGS BY CYTO- AND MOLECULAR- GENETIC MARKERS

Aim. The aim of this work was to identify and analyze the PRLR gene polymorphism and its association with reproductive qualities of sows Ukrainian meat and Welsh breeds as well as communication with the stability of genotypes animal genome. **Methods.** PRLR gene polymorphism analysis was performed by PCR – RFLP. To study the stability of the genome using the micronucleus test. **Results.** Ukrainian meat and Welsh breeds pigs mikropopulations were polymorphic by prolactin receptor gene (PRLR). A allele was associated with a greater number of born piglets and conservation. Animals, the desired allele carriers even elevated levels of white blood cells with micronuclei preserved high prolificacy. Animals BB genotype have a close negative correlation frequency of micro nucleated cells with multiple pregnancy. **Conclusions.** Lack of communication cytogenetic instability animal genotypes AA and AB with multiple pregnancy sow syndicates the presence in the reproductive system of compensatory mechanism involved in that prolactin receptor.

Key words: PRLR, prolactin receptor gene, the pig home, micronuclei, multiple pregnancy.

УДК [581.5+582.623:630*1]

ДЕЛЕГАН І.І.

Національний лісотехнічний університет України,
Україна, 79057, м. Львів, вул. Генерала Чупринки, 103, e-mail: i.delegan@i.ua

МОРФОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ФОРМУВАННЯ КРОН БУКА ЛІСОВОГО В МОЛОДОМУ ВІЦІ

Форма крони визначається генетичними ознаками, віком дерева, просторовим розміщенням, місцевими екологічними чинниками і господарськими заходами та іншими впливами. Проекція крони, а отже і її діаметр та об'єм, істотно залежать не тільки від інтенсивності вибірки дерев, але і від типу

розміщення дерев на площі [1].

Дослідження особливостей формування крони має велике значення для визначення господарських заходів щодо інтенсифікації асиміляційних процесів, життєвості деревних рослин, а також впливу на приріст у висоту і за діаметром та товарної якості деревини [2].

Матеріали і методи

Об'єкт досліджень – географічні культури бука лісового в умовах Львівського Розточчя закладені весною 1995 року, в рамках Міжнародної програми «Оцінка генетичних ресурсів бука у Європі». Аналогічні культури бука, за уніфікованою методикою створено в 23 пунктах Європи, проектом охоплено 17 країн. В українській частині експерименту представлено 70 екотипів із 10 країн Європи. Створені культури на вершині плато, на зрубі букового лісу (*Carpineto-Fageta*). Склад попереднього деревостану – 10Бкл, тип лісу – свіжа дубово-грабова бучина (D₂-д-ГБкл). Ґрунти дерново-підзолисті середньої потужності. Географічні координати ділянки: широта 49° 55', довгота 23° 42', висота над рівнем моря 330 м. [3]. Географічний спектр представлених в експерименті екотипів охоплює значну частину природного ареалу бука лісового у Європі, з його орографічними, кліматичними та типологічними особливостями [4].

Для вивчення біометричних показників росту обліковано усі дерева кожного екотипу. Форми крон бука лісового у молодому віці визначали за методикою Ролоффа (A. Roloff, 1986), класифікуючи їх за способом галуження осьових пагонів та відстанню закладання першої бічної бруньки відносно ростової (рис. 1) [5]. Результати польових спостережень для кожного екотипу опрацьовували статистичними методами, із використанням табличного редактора Microsoft® Excel та мови програмування Visual Basic for Applications (VBA), а також пакету для усестороннього статистичного аналізу STATISTICA (StatSoft).

Результати та обговорення

Результати дослідження географічних культур бука на Розточчі свідчать, що переважаючою є стрижнеподібна форма крони, її частка становить 50 % від усіх дерев бука, представлених в експерименті. З розгалуженою (вінікоподібною) формою виявлено 32 % дерев, а решті – 18 % дерев притаманна роздвоєна (двійчатка) форма (рис. 1).

У екотипів Рава-Руська (Україна), Валлорх (Італія), Ділленбург, Герренберг, Гермескайл (Німеччина) не виявлено жодного дерева «двійчатки». У 23 екотипи частка цієї форми складає до 10 %, понад 50 % дерев з роздвоєним галуженням скелетних гілок крони виявлено в екотипів Завадів, Свалява – 2

(Україна) та Остенгольц-Шармбек (Німеччина).

Кількість дерев розгалуженої (вінікоподібною) форми в межах екотипу коливається від 3 до 73 %. У 11 екотипів її частка не перевищує 10 %, понад 50 % – у 22 екотипах, понад 70 % виявлено у екотипів Грифіно (Польща) та Глоруп (Данія).

Кількість дерев із стрижнеподібною (стрижневерхівковою) формою в межах екотипу коливається від 17 до 94 %. Понад 80 % у екотипів Сіннтал, Герренберг, Бухенвальд (Німеччина), Свалява – 1, Рава-Руська (Україна), Медзілаборце (Словаччина), Грастен (Данія).

Кластерний аналіз форм крони дерев бука лісового у географічних культурах (рис. 2) дозволяє окреслити тенденції апікального росту екотипів та класифікувати їх на три групи: перша група – 18 екотипів із стрижнеподібною кроною (I); друга група – 20 екотипів із роздвоєною кроною (V); третя група – 32 екотипи із розгалуженою кроною (W).

Порівняно значна чисельність третьої групи (W) очевидно генетично обумовлена [6], проте в стиглих букових деревостанах, нормальної повноти, дерева з розгалуженою кроною трапляються рідко. В лісових умовах, де суттєвий вплив на формування крон має просторова та світлова конкуренція, розгалужена форма трансформується, в залежності від умов, у стрижнеподібну чи роздвоєну [5, 7, 8].

За результатами досліджень способу галуження осьового пагона та відстані розміщення першої бічної бруньки від ростової (верхівкової) в дерев бука лісового у географічних культурах на Розточчі встановлено, що формування крони дерев бука суттєво залежить від типу галуження осьового пагона та розміщення першої бічної бруньки (рис. 3).

Лінійну залежність формування стрижнеподібною форми крони при чітко вираженому моноподіальному галуженні осьового пагона з віддаленим розміщенням бічної бруньки (B^I) можна виразити рівнянням: $y = 76,354x + 5,7308$ (RI = 0,4648), коефіцієнт кореляції дорівнює 0,69 (p = 0,01). Залежність формування розгалуженої форми при перехідному галуженні з наближеним розміщенням бічної бруньки (B^W) описується рівнянням: $y = 99,868x - 2,0571$ (RI = 0,7692), коефіцієнт кореляції дорівнює 0,88 (p = 0,01).

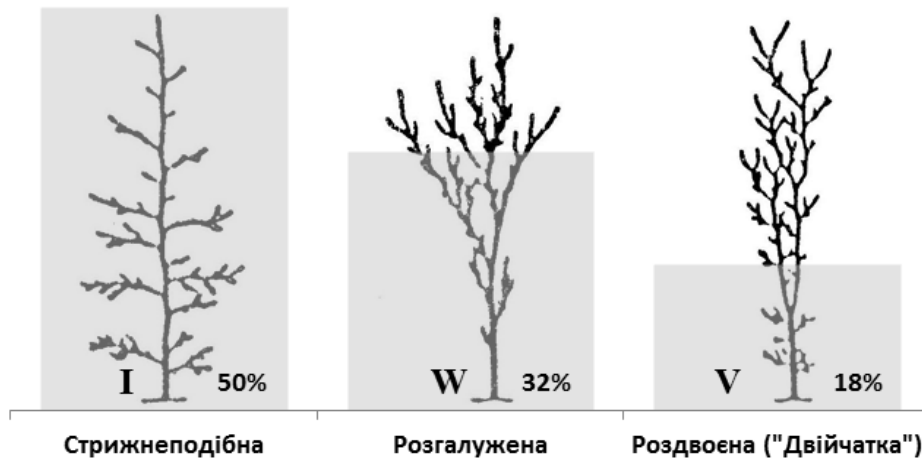


Рис. 1. Розподіл екотипів бука за формами крони (%): I – стрижнеподібна; W – розгалужена (віникоподібна); V – роздвоєна («двійчатка») (за A. Roloff, 1986)

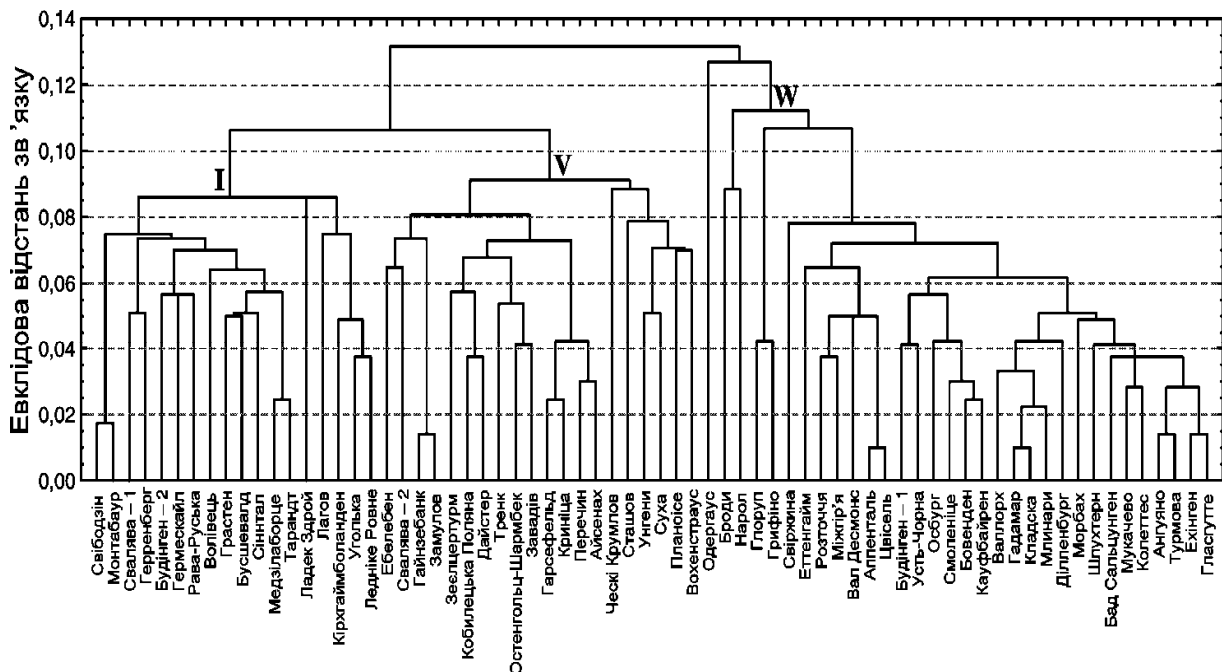


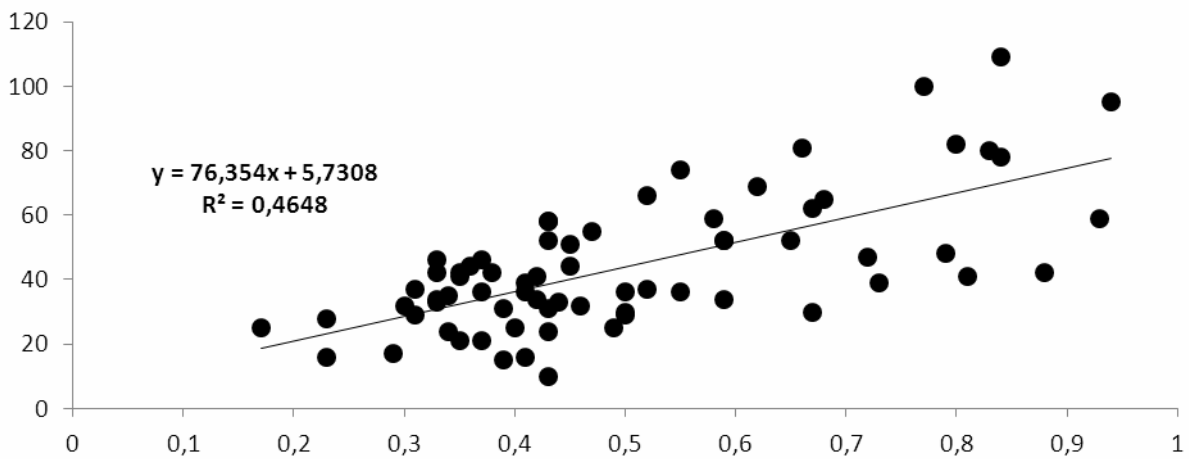
Рис. 2. Групування екотипів за переважаючою формою крони

Формування двійчатки або роздвоєної форми крони також значною мірою ($r = 0,88$, $p = 0,01$) обумовлено галуженням наближеним до несправжнього дихотомічного зі зближеним розміщенням бічної бруньки (B^V), цю залежність можна виразити рівнянням: $y = 80,196x + 1,2459$ ($RI = 0,7639$).

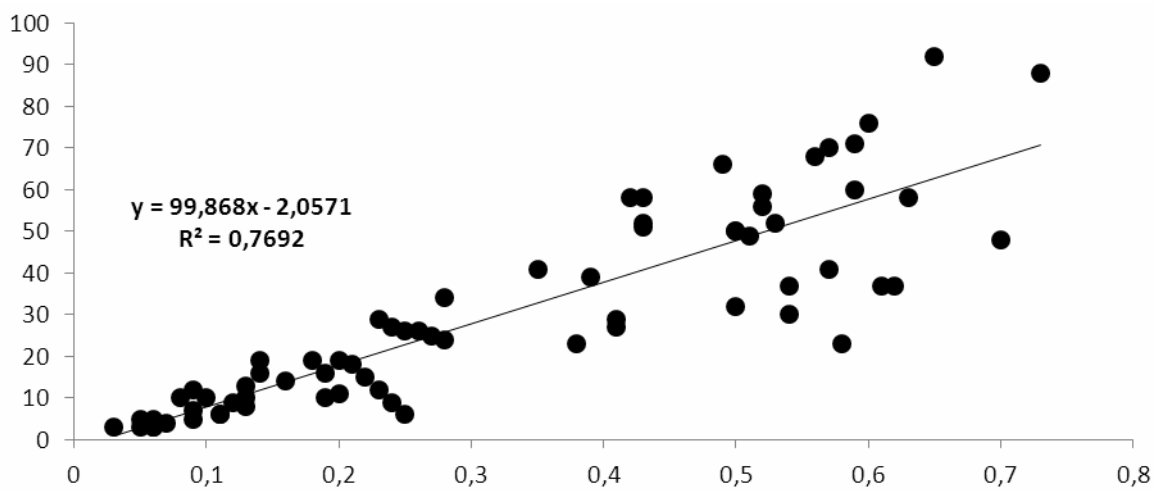
На підставі виявлених залежностей нами розраховані парні коефіцієнти кореляції для типів галуження осьового пагона та розміщення першої бічної бруньки і основних форм крони дерев бука лісового в географічних культурах на Розточчі, а також коефіцієнти детермінації, що

вказують на відносну частку змін залежної ознаки (форми крони) під впливом незалежної (типу галуження осьового пагона та розміщення першої бічної бруньки). Коефіцієнти детермінації представлено у вигляді матриці в таблиці.

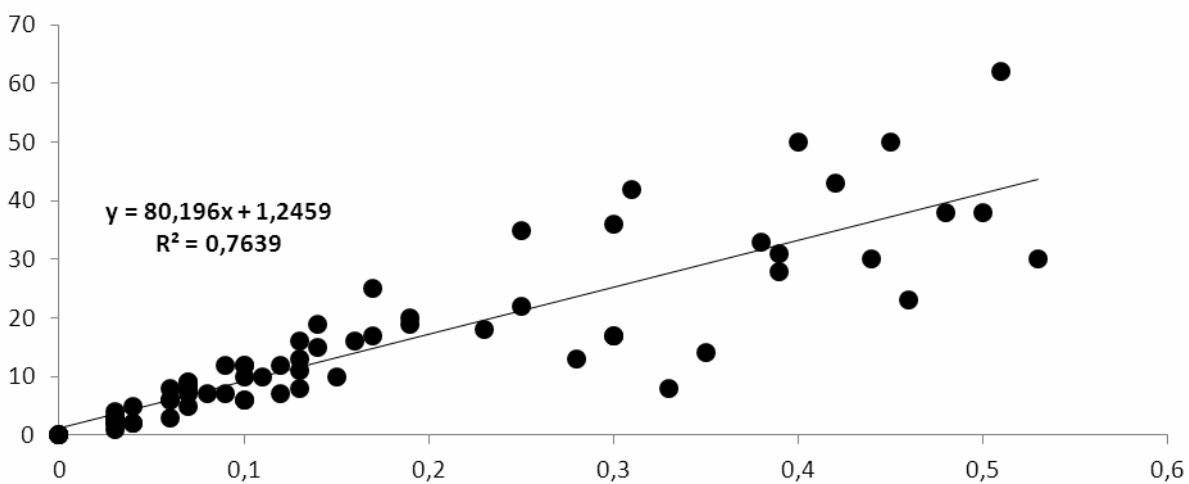
З табл., видно, що від типу галуження осьового пагона та розміщення першої бічної бруньки суттєво залежить формування крони дерев бука, найвища частка змін залежної ознаки під впливом незалежної 77 % для B^W до W та 76 % B^V до V.



А



Б



В

Рис. 3. Кореляційні залежності форм крон від типу галуження осьового пагона і розміщення першої бічної бруньки: А – для стрижнеподібних (I до B^I); Б – для розгалужених (W до B^W); В – для роздвоєних (V до B^V). Вісь абсцис – кількість дерев (у відносних одиницях) з відповідним типом галуження осьового пагона та відстанню розміщення бічних бруньок (B^I, B^W, B^V), вісь ординат – кількість дерев (шт.) з відповідною формою крони (I, W, V)

Висновки

Переважаючою формою крони бука в географічних культурах є стрижнеподібна форма. Її частка становить 50 % від усіх дерев бука у географічних культурах. З розгалуженою (віникopodobною) формою виявлено 32 % дерев, а решті – 18 % дерев притаманна роздвоєна форма (двійчатка).

За виявленими тенденціями апікального росту дерев досліджувані екотипи класифіковано на три групи: перша – 18 екотипів із стрижнеподібною кроною; друга – 20 екотипів із роздвоєною кроною; третя – 32 екотипи із розгалуженою кроною.

Формування крони дерев бука суттєво залежить від типу галузнення осьового пагона та розміщення першої бічної бруньки. При моноподіальному галузненні осьового пагона з віддаленим розміщенням бічної бруньки переважно формується стрижнеподібна форма крони ($d = 46\%$), з меншою ймовірністю – розгалужена ($d = 17\%$) та роздвоєна ($d = 8\%$). При перехідному галузненні з наближеним розміщенням бічної бруньки з високою ймовірністю ($d = 77\%$) формується розгалужена крона, менша ймовірність утворення

стрижнеподібною крони ($d = 41\%$), і низька – двійчатки ($d = 16\%$). При галузненні наближеному до несправжнього дихотомічного зі зближеним розміщенням бічної бруньки, ймовірність формування стрижнеподібною чи розгалуженою формою крони є низькою ($d = 10\%$ та $d = 13\%$), проте високою для утворення «двійчатки» ($d = 76\%$, $p = 0,01$).

Для формування високопродуктивних, товарно-цінних букових деревостанів та збереження їх генофонду доцільно:

– при створенні лісових культур відбраковувати сіянці та саджанці бука лісового з роздвоєним осьовим пагоном чи типом галузнення, наближеним до несправжнього дихотомічного зі зближеним розміщенням бічної бруньки;

– при проведенні освітлення вилучати дерева бука лісового з роздвоєною кроною («двійчатки») та дерева з типом галузнення осьового пагона, наближеним до несправжнього дихотомічного зі зближеним розміщенням бічної бруньки;

– при проведенні прочищень вилучати дерева бука лісового з роздвоєною кроною.

Таблиця. Коефіцієнти детермінації (%) залежності форми крони від способу галузнення та відстані закладання бруньок

Спосіб галузнення з врахуванням відстані закладання бруньок	Форми крони		
	I	W	V
V^I	46	17	8
V^W	41	77	16
V^V	10	13	76

Примітка: $p = 0,01$.

Література

1. Kramer H. Waldwachstumslehre / H. Kramer. – Hamburg-Berlin : Verlag Paul Parey, 1988. – 374 p.
2. Dmyterko E., Bruchwald A. Poszukiwanie powiązań między przyrostem pieńnicy a stanem rozwoju korony buka pospolitego (*Fagus sylvatica* L.) // Sylwan. – Warszawa: Rozwoj SGGW, 2000. – R. CXLIV (7). – P. 15–33.
3. Яхницький В.Й., Заяць Я.І., Тереля І.П., Делеган І.І. Страдцівський навчально-виробничий лісокомбінат: історія і сьогодення // Івано-Франкове: ТзОВ «Простір-М», 2009. – 70 с.
4. W̄hlisch G., Alna R. Final Meeting of COST E52 «Evaluation of beech genetic resources for sustainable forestry» // Genetic Resources of European Beech (*Fagus sylvatica* L.) for Sustainable Forestry: Proceedings of the COST E52 Final Meeting (46 May 2010, Burgos, Spain) Monografias Inia: Serie Forestal. – Madrid: Torrejen de Ardoz, 2011. – N 22–2011. – P. 9–11.
5. Roloff A. Baumkronen: Verstandnis und praktische Bedeutung eines komplexen Naturphanomens. – Stuttgart: Ulmer, 2001. – 164 p.
6. Ромэдэр Э., Шёнбах Г. Генетика и селекция лесных пород: Пер. с нем. // М. : Сельхозиздат, 1962. – 268 с.
7. Dupr̄ S., Teissier du Cros E., Thiebaut B. Polycyclisme vigoureuse et forme chez de jeunes hetres plantes (*Fagus sylvatica* L.) // Revue Forestier Francaise. – 1985. – 37, N 6. – P. 456–464.
8. Junod P. Neuere Tendenzen bei der Pflege von Buchenjungbestangen der Schweiz // 3. IUFRO – Buchensymposium (Zvolen, 3.-6.6.1988). – Zvolen: Vysoka skola lesnicka a drevarska, 1991. – P. 255–276.

DELEGAN I.I.

National Forestry Engineering University of Ukraine,
Ukraine, 79057, Lviv, Generala Chuprynky str., 103, e-mail: i.delegan@i.ua

MORPHOLOGICAL FEATURES FORMATION CROWN EUROPEAN BEECH AT A YOUNG AGE

Aims. Studies of the formation of the crown to determine the economic impact on measures for marketable quality wood. **Methods.** Forms crowns beech forest at a young age was determined by the method of A. Roloff (1986). **Results.** Results of the study of geographical beech crops on Roztotchya indicate that the predominant form of rod is Crown. According tendencies apical growth of trees studied ecotypes classified into three groups. The research method of branching axial shoot and lateral distance of the location of the first buds of the growth in European beech trees in geographical cultures in Roztotchya found that the formation of a beech tree crown essentially depends on the type of shoot branching axial and lateral placement of the first bud. **Conclusions.** To form the inventory of beech stands proposed a number of forest management in the creation of forest plantations and during the Cutting.

Key words: beech, forming the crown.

УДК 633.16:631.527:575

КОЗАЧЕНКО М.Р., ВАЖЕНІНА О.Є., ВАСЬКО Н.І., СОЛОНЕЧНИЙ П.М., НАУМОВ О.Г.

Інститут рослинництва ім. В.Я. Юр'єва НААН України,
Україна, 61060, м. Харків, проспект Московський, 142, e-mail: yuriev1908@gmail.com

ГЕНЕТИЧНІ ТА АДАПТИВНІ АСПЕКТИ СЕЛЕКЦІЇ ЯЧМЕНЮ ЯРОГО

З історичного огляду етапів селекції (первісний несвідомий і свідомий добори, науковий етап), методів (негативний і позитивний масовий добір, індивідуальний добір, гібридизація з використанням методів педігрі та масових популяцій при пересіві, зворотні беккросні схрещування, міжвидові та міжродові схрещування, експериментальний мутагенез, генна інженерія, ідентифікація молекулярними маркерами), напрямів (урожайність та інші кількісні ознаки, пивоварні, харчові та кормові якості, стійкість до біотичних і абіотичних чинників, відповідність сортів вимогам виробництва і вимогам відмінності, однорідності і стабільності), а також досягнень в селекції ячменю видно, що основним найбільш доступним для масового використання методом селекції є гібридизація зі створення популяції рекомбінантних біотипів з наступним добором і оцінкою цінних біотипів [1].

У зв'язку з цим важливим є підбір вихідного матеріалу для гібридизації за рівнем необхідних ознак та їх генетичними особливостями і закономірностями успадкування і їх передачі в рекомбінаційному процесі [2–3].

Матеріали і методи

Дослідження морфо-біологічних, генетичних, адаптивних і цінних селекційних особливостей сортів ячменю ярого проведено

протягом усього селекційного циклу 2004–2013 рр., починаючи з F₁ і закінчуючи добором цінних ліній.

Вихідний матеріал для досліджень: 10 сортів вітчизняної і 16 зарубіжної селекції, які було занесено до Державного реєстру сортів рослин, придатних для поширення в Україні [4], F₁–F₃ гібридів топкросів, селекційні лінії ячменю ярого.

Методи досліджень: польовий (одержання потомств гібридів і рослин), лабораторний (структурний аналіз рослин, визначення урожайності та цінності ліній), генетико-статистичний (дисперсійний, генетичний [5]), визначення адаптивності [6].

Результати та обговорення

У 2004–2006 рр. встановлено особливості за неоднаковим рівнем кількісних морфологічних і якісних ознак 10 сортів ячменю ярого вітчизняної (Джерело, Бадьорий, Фенікс, Парнас, Едем, Етикет, Ефект, Екзотик, Звершення, Гама) та 16 сортів зарубіжної селекції (Annabelle, Scarlett, Ceylon, Tolar, Pasadena, Philadelphia, Danuta, Jersey, Barke, Marnie, Astoria, NS1, NS2, NS3, Adajio, Linus), які використано в схрещуванні в системі топкросів (табл. 1).

Згідно екологічної оцінки за нижчими рангами генотипового ефекту (фактично за загальною адаптивною здатністю), коефіцієнту

регресії (ступеня пластичності за вищими, або зворотно ступеня стабільності за нижчими значеннями) та екологічної стабільності за меншою сумою їх рангів визначено відносну практичну цінність сортів ячменю ярого за окремими ознаками (зокрема, за продуктивністю рослин у сортів Бадьорий, Едем, Ефект, Звершення, Scarlett, Ceylon, Philadelphia, NS2, Linus), що важливо враховувати при доборі вихідного матеріалу для селекції.

Установлено адаптивну здатність і стабільність сортів ячменю ярого за кількісними ознаками, а також диференціюючу здатність середовища (умов років вирощування). Згідно високих параметрів селекційної цінності генотипу (СЦГ) при одночасній оцінці за

загальною адаптивною здатністю (ЗАЗ) і варіансою специфічної адаптивної здатності (σ^2 САЗ) виділено кращі сорти за кількісними ознаками.

Зокрема, за продуктивністю рослин високі параметри СЦГ були у сортів Бадьорий, Екзотик, Danuta, Jersey, NS1, Adajio, Linus з високою продуктивністю та її стабільністю (при низьких значеннях параметрів варіанси σ^2 САЗ, відсутністю ефекту дестабілізації при коефіцієнті компенсації $K < 1$), найбільшим значенням параметру відносної стабільності s (аналогічно коефіцієнту варіабільності), серед яких сорти Linus і NS1, а також Звершення і Danuta мали найвищу ЗАЗ.

Таблиця 1. Продуктивність (маса зерна) рослини, г

№ з/п	Сорт (А)	Рік (В)			X_A
		2004	2005	2006	
1	Джерело	1,20*	2,7 0	2,60	2,17
2	Бадьорий	2,90	2,60	2,20	2,57
3	Фенікс	2,35	2,50	2,30	2,38
4	Пафос	2,35	2,50	2,55	2,47
5	Едем	4,95*	2,35	1,30*	2,87
6	Ефект	2,45	3,15	1,50*	2,37
7	Екзотик	2,10	2,95	2,25	2,43
8	Звершення	2,60	2,15	1,55*	2,10*
9	Гама	1,65*	1,15*	3,75*	2,18
10	Annabelle	1,75*	3,20	1,70*	2,22
11	Scarlett	3,05	2,55	1,50*	2,37
12	Ceylon	3,10	1,45*	3,15	2,57
13	Tolar	2,20	1,30*	3,15	2,22
14	Pasadena	2,30	1,75*	3,35	2,47
15	Philadelphia	2,85	3,05	3,35	3,08*
16	Danuta	2,45	3,65*	3,25	3,12*
17	Jersey	2,20	2,70	3,20	2,70
18	Barke	1,35*	3,50	3,65*	2,83
19	Marnie	1,60*	2,65	3,15	2,47
20	Astoria	2,85	2,95	3,10	2,97
21	NS1	3,10	4,35*	4,35*	3,93*
22	NS2	2,20	1,70*	2,05	1,98*
23	NS3	1,85	3,75*	3,45*	3,02
24	Adajio	2,40	2,20	3,10	2,57
25	Linus	2,85	2,95	3,50	3,10*
26	Етикет	2,45	2,25	2,65	2,45
X_B		2,43	2,62	2,76	2,60

Примітка: * – достовірні відмінності від середньої на 5-ти процентному рівні при HIP_{05} по $A = 0,449$, $B = 0,127$, $AB = 0,793$ для порівняння з середньою (для попарного порівняння HIP_{05} по $A = 0,648$, $B = 0,290$, $AB = 1,127$).

Це підтверджено у сортів Бадьорий, Звершення і особливо цінного Linus за меншою сумою рангів генотипового ефекту і коефіцієнту регресії. За ознакою вміст білку в зерні сорти Джерело і Звершення мали високі значення ознаки та її стабільності, сорти Гама і Етикет – середні значення і високу стабільність ознаки, сорти Едем і Екзотик – низькі значення і високу стабільність ознаки, з підтвердженням по сортах Джерело, Звершення, Етикет, Едем і Екзотик за методикою рангової оцінки, що необхідно враховувати при селекції на кормові чи

пивоварні якості зерна (табл. 2).

Визначено особливості диференціюючої здатності середовища (умов 2004–2006 рр.) як фону для добору за різними кількісними морфологічними (продуктивність рослин, її структурні елементи та інші ознаки) та якісними (вміст білку в зерні) ознаками сортів ячменю ярого. Середовище було аналізуючим (ефективним для добору) за більшістю ознак, окрім продуктивної кущистості, висоти рослин і вмісту білку в зерні, за якими середовище було нівелюючим (при неефективності добору).

Таблиця 2. Параметри адаптивної здатності та стабільності сортів ячменю ярого за ознакою продуктивність рослин

Сорт	$U + V_i$	$V_i =$ ЗАЗ	$\sigma^2 (G \times E)$ g_i	σ^2 САЗ _i	σ САЗ _i	Lg_i	$sg_i, \%$	СЦГ _i	Kg_i
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Бадьорий	2,57	-0,03	0,16	0,02	0,13	9,28	5,2	2,27	-0,22
Екзотик	2,43	-0,17	0,09	0,10	0,32	0,94	13,0	1,71	-1,27
Danuta	3,12*	0,52*	0,15	0,27	0,52	0,58	16,6	1,94	-3,41
Jersey	2,70	0,10	0,01	0,14	0,38	0,08	14,1	1,84	-1,84
NS-1	3,93*	1,33*	0,23	0,42	0,64	0,56	16,4	2,47	-5,29
Adajio	2,57	-0,03	0,04	0,12	0,34	0,36	13,4	1,79	-1,50
Linus	3,10*	0,50*	-0,06	0,02	0,13	-3,30	4,2	2,81	-0,21
Джерело	2,17	-0,43	0,39	0,60	0,77	0,65	35,7	0,41	-7,61
Фенікс	2,38	-0,22	-0,06	0,09(0)	0	0	0	0	0
Пафос	2,47	-0,13	-0,10	0,09(0)	0	0	0	0	0
Едем	2,87	0,27	4,07*	3,43	1,85*	1,19	64,6	-1,34	-43,61
Ефект	2,37	-0,23	0,75*	0,58	0,76	1,29	32,2	0,64	-7,39
Звершення	2,10	-0,50*	0,37	0,17	0,41	2,18	19,7	1,16	-2,19
Гама	2,18	-0,42	1,51*	1,80	1,34*	0,84	61,4	-0,86	-22,89
Annabelle	22,22	0,38	0,64	0,62	0,79	1,03	35,5	0,43	-7,90
Scarlett	2,37	0,23	0,80	0,52	0,72	1,54	30,5	0,73	-6,62
Ceylon	2,57	-0,03	0,88	0,83	0,91*	1,06	35,5	0,50	-10,57
Tolar	2,22	-0,38	0,65	0,75	0,87*	0,86	39,1	0,25	-9,55
Pasadena	2,47	-0,13	0,43	0,56	0,75	0,78	30,2	0,77	-7,07
Philadelphia	3,08*	0,48*	-0,09	0,04(0)	0	0	0	0	0
Barke	2,83	0,23	1,19*	1,55	1,25*	0,77	43,9	0,01	-19,74
Marnie	2,47	-0,13	0,29	0,52	0,72	0,56	29,2	0,83	-6,62
НІР ₀₅ з середнім	0,449	0,449	0,635	-	0,448	-	-	-	-

Примітка: $U + V_i$ – середні значення ознаки генотипів; V_i – ефекти загальної адаптивної здатності (ЗАЗ) значення ознаки генотипів; $\sigma^2 V_i (G \times E) g_i$ – дисперсія (варіанса) взаємодії генотипів; σ^2 САЗ – дисперсія (варіанса) специфічної адаптивної здатності (САЗ) значення ознаки генотипів; σ^2 САЗ – специфічна адаптивна здатність (САЗ) значення ознаки генотипів; Lg_i – показник нелінійності відповіді і-го генотипу на середовище; sg_i – показник відносної стабільності і-го генотипу; СЦГ_i – комплексний показник селекційної цінності і-го генотипу; Kg_i – коефіцієнт компенсації і-го генотипу.

Установлено селекційно-генетичні особливості ознак 23 сортів ячменю ярого за рівнем елементів загальної (ЗКЗ) і специфічної (СКЗ) комбінаційної здатності в системі топкросів. Визначено детермінацію певних ознак адитивними чи неадитивними ефектами генів за більшим чи меншим значенням співвідношення варіанс ЗКЗ і СКЗ, від чого залежить ефективність доборів (табл. 3).

Установлено ефективність доборів цінних ліній гібридів у системі топкросів ячменю ярого за

ознакою урожайності на етапах селекційного процесу в 2007–2013 рр. Цінні за урожайністю лінії виділено в конкурсному сорто випробуванні 2011–2013 рр. у комбінаціях схрещування сортів з високими, в основному, значеннями загальної комбінаційної здатності (Tolar, Pasadena, Гама, Adajio, Ефект, Звершення). Високоврожайні лінії розмножуються для передачі до Державного сорто випробування. Лінію 08-73 (Pasadena / Tolar) передано як сорт Мальовничий до Державного сорто випробування з 2013 р (табл. 4).

Таблиця 3. Ефекти ЗКЗ в F₁ за ознаками материнських сортів в 3-тестерних схрещуваннях

Сорт	Рік	Продуктивність рослини	Продуктивна куцистість	Маса 1000 зерен	Кількість зерен	Кількість колосків у колосі	Маса зерна колосу	Щільність колосу	Довжина колосу	Висота рослини	Вміст білку в зерні
Ефект	2004	0,24*	0,18*	1,57*	-0,36*	0,75	0,00	-0,09	1,07*	9,27*	0,30*
	2005	0,22	0,27*	2,07*	2,22*	2,30*	0,22*	-0,87*	1,60*	6,61*	0,72*
	2006	-0,99*	0,45*	-0,20	-0,22	-0,38	0,00	-0,44*	0,47*	4,47*	0,36*
Звершення	2004	0,22*	-0,03	1,57*	-2,06*	-1,25*	-0,07*	0,24*	-1,06*	-5,90*	0,01
	2005	0,15*	0,15*	1,41*	-0,08	0,30	0,13*	0,79*	-0,90*	-0,44	0,03
	2006	0,38*	-0,37*	0,53*	1,54*	0,79*	-0,05*	0,16*	-0,14*	-4,70*	0,10*
Гама	2004	0,15*	-0,43*	1,57*	-0,56*	0,08	0,30*	0,14*	0,50*	5,77*	-0,04
	2005	0,32*	-0,20*	1,07*	-0,01	-0,04	0,29*	-0,01	0,33*	9,94*	0,30*
	2006	0,36*	-0,70	0,14	-0,49*	-0,38	-0,08*	0,46*	-0,71*	4,64*	-0,37*
Tolar	2004	0,09	0,03	-3,76*	2,14*	2,41*	0,13*	-0,21*	0,64*	4,10*	-0,13*
	2005	0,15*	-0,24*	-3,26*	-0,11*	-0,87*	0,09*	0,03	-0,67*	-4,22*	-0,65*
Pasadena	2004	0,55*	0,33*	-1,09*	0,09*	0,41	0,06*	0,42*	-0,86*	-4,90*	-0,64*
	2005	0,30*	0,53*	-1,93*	-0,56*	-1,54*	0,14*	0,29*	-0,82*	-3,72*	-0,22*

Примітка: * – достовірність різниці з стандартом.

Таблиця 4. Характеристика ліній ячменю ярого, одержаних від схрещування за схемою топкросів, у сорто випробуванні

Лінії	Родовід	Урожайність, т/га			
		2011 р.	2012 р.	2013 р.	X
Стандарт	(сорт Взірець)	4,61	4,35	2,23	3,73
08-73	Pasadena / Tolar	5,55*	4,63*	2,24	4,14
08-2321	Звершення / Tolar	4,84*	4,57*	2,24	3,88
02-2322	Звершення / Tolar	4,75*	4,50*	2,31	3,85
08-2455	Гама / Adajio	5,49*	4,83*	2,59*	4,30
09-932	Гама / Adajio	5,26*	4,72*	2,77*	4,25
09-837	Annabelle / Adajio	5,62*	4,75*	3,16*	4,51
09-1133	Ефект / Едем	5,12*	4,47	3,07*	4,22
09-1287	Ефект / Adajio	5,49*	4,43	2,47*	4,13
НІР ₀₅		0,13	0,14	-0,19	

Примітка: * – достовірність різниці з стандартом.

Висновки

Установлено морфо-біологічні, генетичні, адаптивні та селекційні особливості сортів ячменю ярого на протязі одного селекційного циклу зі створення цінних ліній.

Установлено високі параметри селекційної цінності генотипів при одночасній оцінці за загальною адаптивною здатністю і варіансою специфічної адаптивної здатності за кількісними ознаками, зокрема продуктивності рослин у сортів Бадьорий, Екзотик, Danuta, Jersey, NS1, Adajio і Linus з високою продуктивністю, що, в основному, підтверджено

і за ранговою оцінкою генотипового ефекту і коефіцієнту регресії (пластичності).

Показано ефективність доборів цінних ліній в системі топкросів у комбінаціях схрещування сортів з високою загальною комбінаційною здатністю (Pasadena, Tolar, Adajio, Гама, Ефект, Звершення).

Лінію 08-73 (Pasadena / Tolar) передано до Державного сортовипробування з 2013 р. як сорт Мальовничий. Високоврожайні лінії з інших гібридних комбінацій розмножуються для передачі до Держсортівипробування.

Література

1. Козаченко М.Р. Селекція і насінництво ячменю ярого // Спеціальна селекція і насінництво польових культур. – Х.: IP ім. В.Я. Юр'єва, 2010. – С. 168–202.
2. Лукьяненко М.В., Бугаев В.Д., Макагонов Е.Н. Оценка общей и специфической комбинационной способности в селекции ячменя на продуктивность // Тр. по прикл. бот., ген. и сел. – Л.: ВИР, 1982. – 73, вып. 1. – С. 70–78.
3. Ващенко В.В. Селекция ячменя ярового на основе эколого-генетической модели количественного признака // Вісник ДДАУ. – 2012. – № 2. – С. 38–42.
4. Державний реєстр сортів рослин, придатних для поширення в Україні. – К.: Алефа, 2012. – С. 34–41.
5. Федин М.А., Силис Д.Я., Смирняев А.В. Статистические методы генетического анализа. – М.: Колос, 1980. – 207 с.
6. Кильчевский А.В., Хотылёва Л.В. Метод оценки адаптивной способности и стабильности генотипов, дифференцирующая способность среды. Сообщение II. Числовой пример и обсуждение // Генетика. – 1985. – 21, № 9. – С. 1491–1498.

KOZACHENKO M.R., VAZHENINA O.E., VASKO N.I, SOLONECHNYI P.M., NAUMOV O.G.

Plant production institute nd. a V. Ya. Yuriev of NAAS,

Ukraine, 61060, Kharkiv, Moskovskiyi aven., 142, e-mail: yuriev1908@gmail.com

GENETICAL AND ADAPTICAL ASPECTS OF SPRING BARLEY BREEDING

Aims. Definition of effectiveness of the selection of the valuable lines depending on the genetical peculiarities of spring barley varieties in the topcrosses system. **Methods.** Hybridization in the topcrosses system. Definition of adaptability and general combining ability. Estimation and selection of lines on the stages of the breeding process. **Results.** Morfo-biological, genetical, adaptal and selective peculiarities of spring barley varieties are defined. Dependence of the valuable lines breeding from plant productivity of spring barley varieties used in the full topcrosses was defined. Valuable lines with high productivity was created. Line 08-73 (Pasadena / Tolar) called the variety of Malovnychiy was transferred to the State varieties testing since 2013. **Conclusions.** Effectiveness of the selection of the valuable lines in the full topcrosses system in the stages of the breeding process depending on the genetical peculiarities of spring barley varieties was defined.

Key words: spring barley varieties, genetical and adaptal peculiarities, topcrosses system, breeding process, lines.

РЕАКЦІЯ ПРОСТИХ СТЕРИЛЬНИХ ГІБРИДІВ ЦУКРОВИХ БУРЯКІВ ЗА ЗБОРОМ ЦУКРУ НА РЕГУЛЬОВАНІ ФАКТОРИ СЕРЕДОВИЩА

Збір цукру – важливий показник, який залежить від двох складових – врожайності і цукристості що контролюються полігенно і є наслідком їх взаємодії, а також значною мірою підпадає під вплив середовища. Кільчевський А.В. та Хотильова Л.В. (1997) вказували на те, що у селекції, на відміну від еволюції, рушійні форми переважають стабілізуючі, які зумовлюють зростання реакції на регульовані фактори і падіння стійкості на нерегульовані фактори середовища [1]. У зв'язку з тим, що сучасним напрямом у селекції є створення генотипів, адекватних певним технологіям, тобто «low input variety high input variety» – сортів з низьким і високим енерговнесенням в технологію, важливим елементом у селекційному процесі став добір стабільних у своєму прояві ліній на аналізуючих фонах [2]. Створення і застосування таких агрофонів у селекційній практиці в культурі цукрових буряків належить вітчизняним вченим Мазлумову А.Л. та Грицику М.С. [3, 4].

Матеріали і методи

Досліди проводили на Верхняцькій ДСС у 2011–2012 рр. До створення простих стерильних гібридів було залучено 5 закріплювачів стерильності (ЗС) і 5 чоловічо-стерильних ліній (ЧС). Стерильність і однонасінність ЧС ліній була перевірена за загальноприйнятою методикою [5], причому відбирали лінії з однонасінністю 98–100 % і стерильністю на рівні 97–99 %.

Схрещування проводили на ділянках вільного перезапилення з достатньою ізоляцією по типу топкрос з решіткою 5×5 [6]. Було отримано 20 гібридних комбінацій зі стерильним пилком, які будуть у майбутньому використовуватись як материнський компонент ЧС гібридів цукрових буряків.

Сортовипробування проводили на звичайному (ЗФ) та підвищеному фоні (ПФ) мінерального живлення, а площу живлення однієї рослини використовували у двох варіантах: звичайній (ЗП) – 45×22,5 (см²) і розширеній (РП) 45×45 (см²) [7]. Отже регульованими факторами середовища при вивченні специфічних реакцій генотипу

материнського компоненту у формі простих стерильних гібридів були: ЗФЗП (звичайний фон звичайна площа), ЗФРП (звичайний фон розширена площа), ПФЗП (підвищений фон звичайна площа) і ПФРП (підвищений фон розширена площа).

Комбінаційну здатність компонентів простих стерильних гібридів оцінювали за методикою Вольфа В.Г та Літуна П.П. [8], а дисперсійний аналіз – за Доспеховим Б.О. [9].

Результати та обговорення

Під впливом регульованих факторів середовища комбінаційна здатність досліджуваних компонентів проявляла мінливість.

Звичайний фон звичайна площа

Гібриди (як материнська форма) у цьому середовищі мали достовірні відмінності між собою $F_{\text{факт}} = 6,87 > F_{\text{теор}} = 2,01$. По компонентам простих стерильних гібридів відмінності були теж суттєвими: для ЗКЗ ЧС ліній $F_{\text{факт}} = 11,18 > F_{\text{теор}} = 2,65$, для О типів $F_{\text{факт}} = 7,04 > F_{\text{теор}} = 2,92$ і для їх взаємодії $F_{\text{факт}} = 5,38 > F_{\text{теор}} = 2,09$.

Внесок простих стерильних гібридів був різним (рис. 1). Частка впливу генотипу ЧС ліній на мінливість ознаки «збір цукру» була майже вдвічі більшою, ніж О типів і становила 34,3 % проти 16,2 %. Внесок взаємодії компонентів був найвищим серед джерел варіювання, і становив 49,5 % від генотипової варіації ознаки.

Істотність відмінностей між компонентами гібридизації дозволила встановити рівень комбінаційної здатності (ЗКЗ і СКЗ) кожного із них (табл. 1).

Аналіз даних таблиці 1 показав, що істотно високу ЗКЗ за збором цукру проявили дві ЧС лінії – це ЧС 3 (+0,48*) та ЧС 5 (+0,45*). Лінія ЧС 1 характеризувалася позитивним (+0,27), але неістотно доведеним ефектом ЗКЗ, відносно добре вона комбінувалася з От 4 (+0,58). Лінія ЧС 3 проявила один із найвищих ефектів взаємодії (+1,00*) з От 2. Лінія ЧС 4 з От 5 за сумою ефектів неадитивної взаємодії аallel них генів переважала над всіма 20 гібридними комбінаціями, що були в досліді (СКЗ = 1,42*).

Звичайний фон розширена площа

У цілому, вплив генотипу гібридів у варіанті ЗФЗП оцінювався у 77,0%, тоді як на розширеній площі він виявився більшим і становив 92,4% (рис. 2). Це свідчить про те, що фактор «розширена площа живлення» дозволяє краще проявитися генотиповим особливостям кожної гібридної комбінації.

Між генотипами гібридів були суттєві відмінності: $F_{\text{факт}} = 24,58 > F_{\text{теор}} = 2,01$.

Дисперсійний аналіз даних показав, що і між компонентами ПСГ, а також їх взаємодією, теж існують достовірні відмінності: $F_{\text{факт}} = 47,94 > F_{\text{теор}} = 2,69$ (для ЧС ліній); $F_{\text{факт}} = 21,43 > F_{\text{теор}} = 21,43$ (для О типів); $F_{\text{факт}} = 17,54 > F_{\text{теор}} = 2,09$ (для їх взаємодії). Це дозволило оцінити внесок кожного із компонентів у генотипову варіацію ознаки збір цукру (рис. 3).

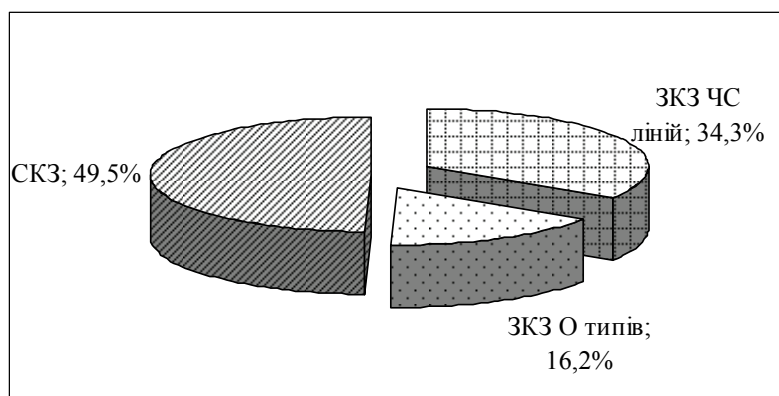


Рис. 1. Частки генотипової варіації компонентів простих стерильних гібридів і їх взаємодії, ЗФЗП

Таблиця 1. Ефекти ЗКЗ і СКЗ за збором цукру ЧС ліній і О типів, ЗФЗП

ЧС лінії	Ефекти ЗКЗ ЧС ліній	Ефекти СКЗ				
		От 1	От 2	От 3	От 4	От 5
ЧС 1	0,27	#	-0,10	-0,25	0,58	-0,23
ЧС 2	-0,25	0,82*	#	-0,43	0,63	-1,02*
ЧС 3	0,48*	0,25	1,00*	#	-1,27*	0,02
ЧС 4	-0,95*	-0,92*	-0,33	-0,17	#	1,42*
ЧС 5	0,45*	-0,05	0	0,23	-0,18	#

Примітка: * – достовірно високі ефекти комбінаційної здатності на 5 % рівні значущості.



Рис. 2. Внесок генотипу гібрида у генотипову мінливість збору цукру на різних площах живлення

Диференціація компонентів за ефектами комбінаційної здатності показала деяке зміщення оцінок залежно від дії фактору «розширена площа живлення». Так, лінія ЧС 1 характеризувалася істотно високою ЗКЗ (+1,23*), а лінія ЧС 3 підтвердила свою оцінку (+0,27*) (табл. 2). Ці лінії є носіями цінних адитивних комплексів генів, що позитивно впливатимуть на прояв ознаки у гібридному генотипі.

Порівнюючи наведені дані таблиць 1 і 2, можна констатувати, що компоненти ПСГ ЧС 3/От 2 на обох площах живлення проявили істотно високий ефект взаємодії: на ЗП +1,00*, на РП +1,43*. Аналогічно підтверджені оцінки неадитивної взаємодії генів у гібрида ЧС 4/От 5: на ЗП +1,42*, на РП +1,34*. У компонентів гібриду ЧС 2/От 1 також на різних площах живлення проявився подібний ефект СКЗ – відповідно +0,82* (табл. 1) і 0,96* (табл. 2). Тобто ці гібриди мали стабільно позитивну реакцію взаємодії компонентів незалежно від даного середовищного фактору.

Розширена площа живлення слугувала модифікуючим чинником для прояву неадитивних ефектів у комбінації ЧС 4/От 3, ЧС 1/От 3, ЧС 5/От 2 – збільшуючи величину їх ефектів.

Підвищений фон звичайна площа

У цьому варіанті ПСГ, створені на основі п'яти ЧС ліній, показали вищий збір цукру, порівняно із варіантом ЗФЗП (рис. 4).

На рис. 4 видно, що у гібридів, створених на основі всіх ЧС ліній, на підвищеному фоні удобрення збір цукру збільшувався на 0,4...1,1 т/га (залежно від генотипу компонентів), тобто цей фактор мав суттєвий вплив на фенотиповий прояв ознаки.

На розширеній площі спостерігалася аналогічна тенденція. Найкраще проявили себе гібриди, створені на основі ЧС ліній 1, 3 і 5.

Дисперсійний аналіз варіанту ПФЗП показав, що і гібриди, і компоненти вносили суттєвий вклад як джерела дисперсії у фенотип гібридів. По гібридам $F_{\text{факт}} = 14,37 > F_{\text{теор}} = 2,01$, по ЧС лініям $F_{\text{факт}} = 24,98 > F_{\text{теор}} = 2,69$, по О типам $F_{\text{факт}} = 7,09 > F_{\text{теор}} = 2,92$, по взаємодії компонентів $F_{\text{факт}} = 12,66 > F_{\text{теор}} = 2,09$. Тобто відмінності між цими джерелами варіювання були високо достовірними. Це дозволило встановити частку кожного із досліджуваних факторів на генотипову мінливість ознаки «збір цукру» у гібридів.

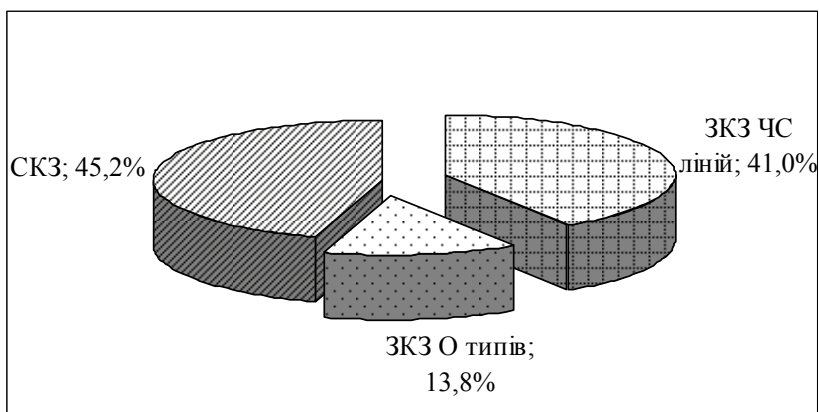


Рис. 3. Частки генотипової варіації компонентів ПСГ та їх взаємодії, ЗФЗП

Таблиця 2. Ефекти ЗКЗ і СКЗ за збором цукру ЧС ліній і О типів, ЗФЗП

ЧС лінії	Ефекти ЗКЗ ЧС ліній	Ефекти СКЗ				
		От 1	От 2	От 3	От 4	От 5
ЧС 1	1,23*	#	-0,01	0,57*	-0,67	0,12
ЧС 2	-1,24*	0,96*	#	-1,06*	0,97*	-0,87*
ЧС 3	0,27*	-0,21	1,43*	#	-0,97*	-0,25
ЧС 4	-0,08	-0,16	-1,75*	0,58*	#	1,34*
ЧС 5	-0,18	-0,57	0,81*	0,10	-0,34	#

Примітка: * – достовірно високі ефекти комбінаційної здатності на 5 % рівні значущості.

Як виявилось, у варіанті ПФЗП внесок О типів був найменшим і становив 7,8 % від усієї генотипової варіації, а ЧС ліній – майже у 5 разів вищий, ніж для О типів (36,6 %). Проте частка неадитивної взаємодії генів навіть сумарно перевищувала адитивні ефекти і становила 55,6 % (рис. 5).

Аналіз ефектів ЗКЗ ЧС ліній показав, що комбінаційно-цінними за ознакою «збір цукру» виявилось три лінії – це ЧС 1 (+0,60*), ЧС 3 (0,23*) та ЧС 5 (+0,37*) (табл. 3).

Високий позитивний ефект СКЗ відмічено у парах ЧС 2/От 1 (+1,19*), ЧС 4/От 3 (+0,85*)

та ЧС 5/От 2 (+0,93*). Компоненти цих гібридів добре взаємодіють між собою, ефекти їх взаємодії вносять істотний вклад у фенотиповий прояв збору цукру, що коливався у межах 9,7...10,9 т/га.

Підвищений фон розширена площа

Гібридні комбінації на цьому варіанті показали істотну відмінність між собою як у цілому ($F_{\text{факт}} = 11,68 > F_{\text{теор}} = 2,01$), так і по компонентам: $F_{\text{факт}} = 3,44 > F_{\text{теор}} = 2,69$ (для ЧС ліній), $F_{\text{факт}} = 4,76 > F_{\text{теор}} = 2,92$ (для О типів) та $F_{\text{факт}} = 16,15 > F_{\text{теор}} = 2,09$ (для взаємодії батьківських форм).

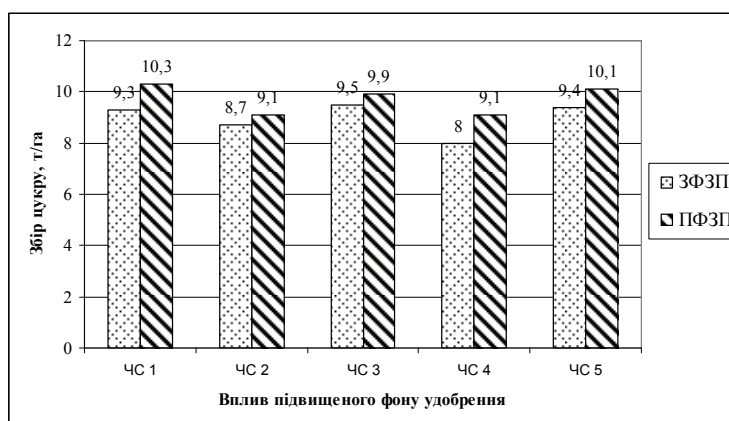


Рис. 4. Вплив підвищеного фону удобрення на збір цукру у ПСГ (звичайна площа живлення)

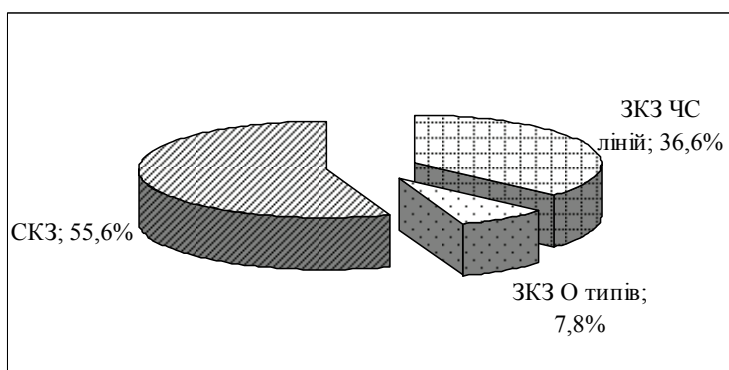


Рис. 5. Частки генотипової варіації компонентів ПСГ та їх взаємодії за збором цукру, ПФЗП

Таблиця 3. Ефекти ЗКЗ і СКЗ за збором цукру ЧС ліній і О типів, ПФЗП

ЧС лінії	Ефекти ЗКЗ ЧС ліній	Ефекти СКЗ				
		От 1	От 2	От 3	От 4	От 5
ЧС 1	0,60*	#	-0,87*	0,17	0,25	0,45*
ЧС 2	-0,63*	1,19*	#	-0,57*	0,37*	-0,99*
ЧС 3	0,23*	0,33*	0,07	#	-0,78*	0,38*
ЧС 4	-0,57*	-0,10	-0,60*	-0,85*	#	-0,15
ЧС 5	0,37*	-0,57*	0,93*	-0,69*	0,31	#

Примітка: * – достовірно високі ефекти комбінаційної здатності на 5 % рівні значущості.

Розширена площа живлення вплинула на структуру мінливості таким чином, що вплив ЗКЗ-ефектів понизився, а СКЗ-ефектів – підвищився.

Як виявилось, у варіанті ПФРП внесок адитивних генів компонентів гібридизації був набагато меншим (ЗКЗ ЧС = 6,2%; ЗКЗ От = 6,4%) порівняно із неадитивними (87,4%) (рис. 6).

Фактор «розширена площа живлення» вплинув також і на диференціацію ліній по їх ЗКЗ і СКЗ (табл. 4). Так, у варіанті ПФРП комбінаційно-цінною виявилася лише лінія ЧС 4 (+0,36*). Високою і достовірною СКЗ характеризувалися компоненти шести гібридів: ЧС 1/От 4 (+0,78*), ЧС 1/От 5 (+0,71*), ЧС 2/От 3 (+0,91*), ЧС 3/От 2 (+0,88*), ЧС 4/От 2 (+1,12*) та ЧС 5/От 4 (+0,86*).

Компоненти з достовірними низькими (від'ємними) ефектами СКЗ селекційного значення не мають, тому немає сенсу їх аналізувати. А вище зазначені гібридні комбінації, у яких взаємодія компонентів – ЧС ліній і О типів була істотно високою, характеризувалася збором цукру, що перевищує 10,0 т/га. Значення цього показника були високими і незначно коливалися залежно від генотипу від 10,07 до 10,63 т/га.

Висновки

На основі вищевикладених експериментальних даних можна стверджувати наступне:

- підвищений фон живлення і розширена площа є модифікуючими факторами середовища, які спричиняють експресію комбінаційної здатності за ознакою збір цукру;
- за розширеної площі живлення більш повно розкриваються генотипові особливості простих стерильних гібридів;
- підвищений фон живлення позитивно впливає на збір цукру ПСГ. В детермінації цієї ознаки на даному фоні переважаючу роль відіграють ефекти неадитивної взаємодії генів компонентів;
- кращими за ЗКЗ ЧС лініями на звичайному фоні живлення виявилися ЧС 1, ЧС 3 і ЧС 5;
- на обох площах живлення сталість неадитивних ефектів генів проявили комбінації ЧС 3/От 2 (розширена площа) і ЧС 2/От 1 (звичайна площа);
- у кращих гібридних комбінацій у всіх варіантах збір цукру перевищує 10,0 т/га, що є наслідком впливу як генотипу, так і середовищних чинників на прояв фенотипу.

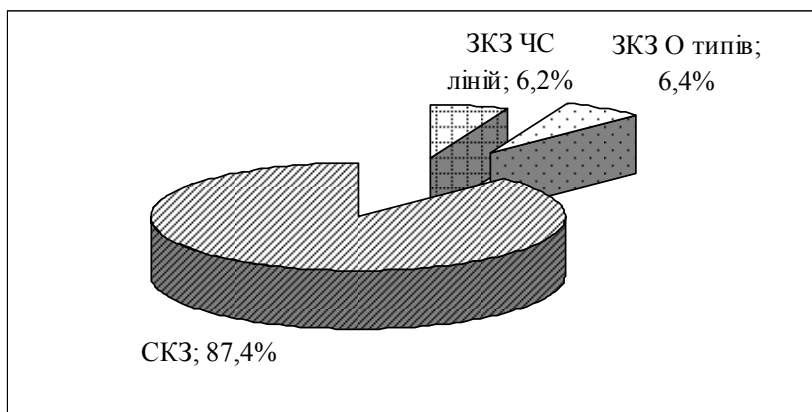


Рис. 6. Частки генотипової варіації компонентів ПСГ та їх взаємодії, ПФРП

Таблиця 4. Ефекти ЗКЗ і СКЗ за збором цукру ЧС ліній і О типів, ПФРП

ЧС лінії	Ефекти ЗКЗ ЧС ліній	Ефекти СКЗ				
		От 1	От 2	От 3	От 4	От 5
ЧС 1	0,05	#	0,37	-1,87*	0,78*	0,71*
ЧС 2	-0,20	0,02	#	0,91*	-0,46*	-0,47*
ЧС 3	-0,03	0,39	0,88*	#	-0,83*	-0,44*
ЧС 4	0,36*	-0,57*	1,12*	0,11	#	-0,66*
ЧС 5	-0,20	-0,21	-1,05*	0,40*	0,86*	#

Примітка: * – достовірно високі ефекти комбінаційної здатності на 5 % рівні значущості.

Література

1. Кильчевский А.В. Экологическая селекция растений / А.В. Кильчевский, Л.В. Хотылева – Минск: Технология. – 1997. – 372 с.
2. Borojtvic S. Ideotypes for high produktivity, perfomance stability and adaptation // Proc. 2 – nd Inter. Winter Wheat Conf. Zagreb, 1975. – P. 45–59.
3. Мазлумов А.Л. Селекция сахарной свеклы. – М.: Колос. – 1970 – 207 с.
4. Грицык Н.С. Методы создания и оценки линий опылителей по комбинационной способности на Верхнячской ОСС // Достижения и перспективы в селекции сахарной свеклы. – Киев: ВНИС. – 1987. – С. 92–92.
5. Методика исследований по сахарной свекле. – К.: ВНИС, 1986. – 292 с.
6. Савченко В.К. Метод оценки комбинационной способности генетически разнокачественных наборов растительных форм // Методики генетико-селекционного и генетического экспериментов. – Минск: Наука и техника, 1973. – С. 48.
7. Грицык Н.С. Многофакторные испытания // Сахарная свекла. – 1987, № 7. – С. 36–37.
8. Вольф В.Г., Литун П.П. Методические рекомендации по применению математических методов для анализа экспериментальных данных по изучению комбинационной способности. – Харьков, 1980. – 74 с.
9. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта. – М.: Колос, 1979. – 375 с.

KORNEEVA M.O., NENKA M.M.

*Institute of Bioenergy Crops and Sugar Beet of Natl. Acad. Sci. of Ukraine,
Ukraine, 03141, Kyiv, Klinichna str. 25, e-mail: mira31@ukr.net, nenka88@i.ua*

REACTION OF SIMPLE STERILE SUGAR BEET HYBRIDS TO REGULATED ENVIRONMENTAL FACTORS FOR SUGAR YIELD

Aims. According to the literature sources, the process of selection is marked with increase in breeding materials response to regulated factors and reduction to unregulated environmental factors. The objective of research was to investigate the combining ability expression in simple sterile hybrid components, as maternal components, under different combinations of strain test factors. **Methods.** Top-cross hybrids obtained by crossing five CMS lines and five sterility fixers were tested against the normal and enriched with mineral fertilizers backgrounds in variants with normal and extended growing space. **Results.** Established were the modifying factors influencing sugar yield; specific reaction of each genotype to regulated environmental factors for combining ability effects; shares of genotypic variation and change in value of its constituents in sugar yield trait. **Conclusions.** Genotype characteristics of breeding lines reveal themselves completely in extended growing space. The best hybrid combinations with high level of the trait manifestation at the phenotype level have been selected.

Key words: general combinational ability, specific combinational ability, environmental factors.

УДК 576.3:634.942:502.72 (477.60)

КОРШИКОВ И.И., МИЛЬЧЕВСКАЯ Я.Г., ТКАЧЕВА Ю.А., ЛАПТЕВА Е.В.

*Донецкий ботанический сад НАН Украины,
Украина, 83059, Донецк-59, пр. Ильича, 110, e-mail: dbsgenetics@gmail.com*

ЯДЕРНО-ЯДРЫШКОВАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ СЕМЕННОГО ПОТОМСТВА СОСНЫ МЕЛОВОЙ УРОЖАЕВ РАЗНЫХ ЛЕТ В ЗАПОВЕДНИКЕ «МЕЛОВАЯ ФЛОРА»

В литературе имеется достаточно много свидетельств, что изменчивость цитогенетических параметров клеток растений связана с влиянием природно-климатических условий мест произрастания [1, 2]. В ответ на различные внешние неблагоприятные воздействия в растительных клетках может изменяться количественно-размерная структура

ядрышек и их функциональная активность [3, 4]. Природная вариабельность условий произрастания отражается на функционально адаптивных реакциях материнских растений и может передаваться их семенному потомству через изменения цитогенетических показателей в клетках его меристематических тканей. Так, выявлено изменение цитогенетических

характеристик семенного потомства некоторых видов древесных растений при действии поллютантов техногенно загрязненной среды [5, 6] или в контрастных условиях природных местообитаний [7]. В ряде публикаций доказываются необходимость использования ядрышковых характеристик клеток живых организмов для оценки их состояния, а также для биотестирования среды обитания [8–11]. Хотя еще мало сведений насколько стабильны ядрышковые характеристики в клетках растений и их семенного потомства урожаев разных лет. От этой стабильности зависит правомерность применения ядерно-ядрышковых показателей как в индикации условий произрастания, так и в других сферах.

Цель работы – анализ активности ядрышковых организаторов у семенного потомства разных лет одной и той же группы растений из природной популяции сосны меловой.

Материал и методы

В ходе исследований было изучено семенное потомство молодых растений сосны меловой (*Pinus sylvestris* L. var. *cretacea* Kalenicz. ex Kom.) восстанавливающейся популяции в отделении Украинского степного заповедника «Меловая флора». Семена собраны с 25 деревьев возрастом до 40 лет в 2012 и 2013 годах в одном из небольших популяционных локусов.

Анализ проводили на временных препаратах меристематических тканей корешков проростков семян. Семена проращивали в чашках Петри на влажной фильтровальной бумаге в термостате при температуре 23–25 °С.

Корешки длиной 1,0–1,5 см фиксировали в уксусном этаноле (1:3). Для окрашивания ядрышек применяли 50 % раствор азотнокислого серебра [12]. Давленные препараты готовили по стандартной методике. Просмотр микропрепаратов осуществляли с помощью микроскопа *Primo Star* (Carl Zeiss) при увеличении 40x10. Для фотографирования препаратов применяли цифровую камеру *Canon PowerShot A620*. Промеры осуществляли на цифровых снимках с помощью программного обеспечения *Axio Vision Rel. 4.7*.

Результаты и обсуждение

В ядрах 1000 исследованных клеток проростков сосны меловой из семян урожаев двух последовательных лет 25 деревьев выявлено: в 2012 году от 2 до 10 ядрышек, а в 2013 году – 1–12 ядрышек (рис.). В 2012 году среди проростков доминировали те, в клетках которых имелось 3–8 ядрышек. Доля таких клеток в корешках проростков составляла 90,3 %. Для урожая 2013 года была характерна несколько смещенная картина: среди проростков преобладали те, которые имели в своих клетках 2–7 ядрышек. Таких клеток было 85,4 %. Максимально представленными в проростках семян обоих лет были клетки с 4–6 ядрышками: 2012 год – 58,4 %, 2013 год – 51,7 %. В подобных исследованиях с потомством клонов плюсовых деревьев сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) показано, что количество ядрышек в интерфазных клетках проростков варьировало от 1 до 12, а преобладали (34,4–50,4 %) клетки с 5–6 ядрышками [13].

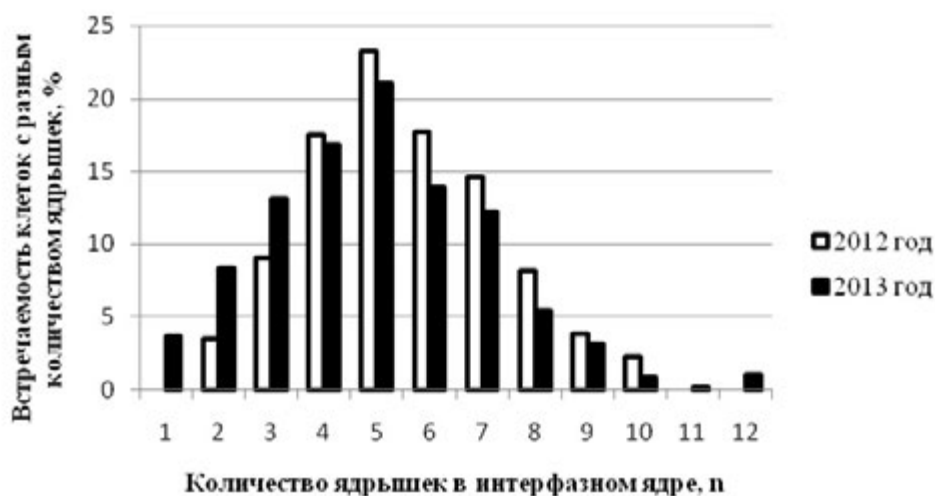


Рис. Встречаемость интерфазных клеток в меристематических тканях корешков проростков сосны меловой из семян урожаев разных лет заповедника «Меловая флора»

Для тканей корешков проростков сосны меловой характерна высокая вариабельность клеток с гомо- и гетероморфными ядрышками. В одном корешке можно встретить клетки, как с мелкими, так и с крупными ядрышками, а также те и другие в одной клетке (табл. 1).

Площадь одного ядрышка в клетках заметно варьирует от 1,1 до 39 мкм². Естественно это отражается на суммарной площади ядрышек одной клетки. Так, например, в исследуемых шести случайных клетках проростков семян урожая 2012 года общая площадь ядрышек изменялась в пределах 29,4–66,1 мкм², тогда как в клетках проростков из семян урожая 2013 года соответственно 14,1–48,1 мкм². Обращает внимание несколько меньшие размеры как крупных, так и мелких ядрышек в клетках проростков урожая последнего года.

Определение в каждой из 100 случайных клеток суммарной площади ядрышек и ядра показывает, что они были существенно больше в проростках семян урожая 2012 года (табл. 2). Так площадь ядра в этих проростках была в 1,5 раза, а ядрышек в 1,9 раза больше, чем в клетках проростков семян урожая 2013 года. В последнем случае заметно возрастают значения коэффициента вариации. Ядерно-ядрышковое соотношение было заметно меньшим для клеток

проростков семян урожая 2012 года, различаясь между двумя годами исследований в 1,34 раза. Считается, что более крупные ядра и ядрышки, а также меньшее значение ядерно-ядрышкового соотношения свойственны клеткам проростков, характеризующихся более высоким уровнем жизнеспособности. Ядерно-ядрышковое соотношение является хорошим показателем активности белоксинтезирующей системы [14, 15]. Любое изменение этого показателя свидетельствует об изменении уровня биосинтеза белка. Уменьшенное ядерно-ядрышкового соотношения, отмеченное у семенного потомства урожая 2012 года, может указывать на увеличение активности ядрышковых организаторов, что сопровождается усилением биосинтетических процессов в клетках.

Результаты наших исследований с сосной меловой подтверждают ранее установленную нестабильность количества и размеров ядрышек в клетках проростков семян урожаев разных лет клонов плюсовых деревьев *P. sylvestris* [13]. Такую нестабильность у потомства сосны меловой можно объяснить адаптивным ответом материнских растений на совокупность неблагоприятных природно-климатических условий в период завязывания и до формирования семян.

Таблица 1. Внутриклеточная вариабельность размеров ядрышек в меристематических тканях корешков проростков сосны меловой из семян урожаев разных лет в заповеднике «Меловая флора»

Клетка, №	Всего ядрышек в ядре, шт.	Крупные и средние ядрышки в клетке:		Мелкие ядрышки в клетке:		Общая площадь ядрышек в клетке, мкм ²
		количество, шт.	вариабельность площади, мкм ²	количество, шт.	вариабельность площади, мкм ²	
2012 год						
1	3	2	11,5 – 13,8	1	4,0	29,4
2	3	2	10,5 – 15,9	1	4,4	31,2
3	4	3	7,4 – 13,0	1	3,7	33,6
4	5	2	12,5 – 12,6	3	2,8 – 5,5	38,2
5	4	2	12,3 – 16,9	2	5,0 – 5,8	39,9
6	4	2	14,9 – 39,0	2	4,3 – 8,0	66,1
2013 год						
1	3	1	11,6	2	1,1 – 1,3	14,1
2	4	1	10,0	3	1,0 – 2,5	15,7
3	3	2	7,5 – 9,3	1	1,0	17,9
4	6	1	12,8	5	1,2 – 4,5	26,8
5	5	2	9,1 – 12,6	3	1,5 – 2,9	27,7
6	9	3	8,2 – 12,7	6	1,1 – 4,5	48,1

Таблица 2. Средняя площадь ядра, ядрышек, ядерно-ядрышковое соотношение для клеток корешков проростков сосны меловой из семян урожаев разных лет в популяции заповедника «Меловая флора»

Выборка семян (100 клеток)	Средняя площадь ядра, мкм ²		Средняя суммарная площадь ядрышек в ядре, мкм ²		Ядерно-ядрышковое соотношение	
	M ± m	CV, %	M ± m	CV, %	M ± m	CV, %
Урожай, 2012 г.	180,2 ± 1,9	33,8	37,1 ± 0,3	29,1	5,0 ± 0,1	29,8
Урожай, 2013 г.	120,7 ± 1,9	50,7	19,7 ± 0,3	43,7	6,7 ± 0,1	32,5

Вероятно, изменения в ядерно-ядрышковом статусе семян закладываются еще на стадии микроспорогенеза и продолжаются до завершающей стадии эмбрионального развития семян. В неблагоприятных экологических условиях возникают различного рода нарушения в ходе нормального процесса развития микроспор в микроспороцитах *P. sylvestris*. Длительность мейоза, как и количество аномалий в процессе мейотического деления, в микроспороцитах зависит от напряженности экологических факторов [16]. Результаты исследований в области палинологии свидетельствуют об естественном полиморфизме пыльцы у *P. sylvestris* и повышении уровня аномалий ее развития от фоновых зон до техногенно загрязненных территорий [17]. Количество ядрышек в клетках живых организмов может возрастать при действии стрессовых факторов [8], а с другой стороны, может быть результатом интенсификации метаболических процессов в клетке, стимулирующих деятельность ядрышковых организаторов [9, 18]. Механизмы, которые приводят к количественно-размерной вариабельности ядрышек в клетках растений пока еще не ясны [19]. В случае исследуемой нами сосны

меловой, как, вероятно, и других видов, количественно-размерная вариабельность ядрышек может быть связана с долей ауткросинга в популяции. Соотношение семян, полученных от само- или перекрестного опыления в популяциях древесных растений нестабильно и зависит от складывающихся погодных условий на период опыления растения. Не исключено, что избыточная инбредность урожая семян будет отражаться на активности ядрышковых организаторов, что вероятно и проявилось у сосны меловой в урожае 2013 года.

Выводы

В результате исследований активности ядрышковых организаторов у проростков сосны меловой из семян урожая двух последовательных лет показана нестабильность количественно-размерных характеристик ядрышек и ядерно-ядрышкового соотношения. В клетках семенного потомства растений одной возрастной группы из локальности природной популяции заповедника «Меловая флора» в разные годы отличия в площади ядра составили 1,5 раза, а в средней площади ядрышек на одну клетку 1,9 раза.

Литература

1. Горячкина О.В., Сизых О.А. Цитогенетические реакции хвойных растений в антропогенно нарушенных районах г. Красноярска и его окрестностей // Хвойные бореальной зоны. – 2012. – 30, № 1–2. – С. 46–51.
2. Koropachinskii I.Yu., Potemkin O.N., Rudikovskii A.V., Kuznetsova E.V. Polymorphism and structure of populations of Siberian spruce (*Picea obovata* Ledeb.) at the northern limits of the species distribution // Contemporary Problems of Ecology. – 2012. – 5, N 2. – P. 127–135.
3. Mayer Ch., Grummt I. Cellular stress and nucleolar function // Cell Cycle. – 2005. – 4, N 8. – P. 1036–1038.
4. Cheutin T., Misteli T., Dundr M. Dynamics of nucleolar components. In: The nucleolus. New York: Kluwer Academic // Plenum Publishers. – 2004. – P. 29–40.
5. Буторина А.К., Калаев В.Н., Вострикова Т.В., Мягкова О.Е. Цитогенетическая характеристика семенного потомства некоторых видов древесных растений в условиях антропогенного загрязнения г. Воронежа // Цитология. – 2000. – 42, № 2. – С. 196–200.
6. Коршиков И.И., Лаптева О.В. Цитогенетичні аномалії в клітинах проростків *Pinus pallasiana* D. Don. (*Pinaceae*) із залізрудного відвалу Криворіжжя // Укр. ботан. журн. – 2013. – 70, № 2. – С. 683–688.
7. Седельникова Т.С., Пименов А.В. Кариологическое изучение болотной и суходольной популяций *Larix sibirica* (*Pinaceae*) из Западной Сибири // Ботан. журн. – 2005. – 90, № 4. – С. 582–593.

8. Архипчук В.В. Использование ядрышковых характеристик в биотестировании // Цитология и генетика. – 1995. – № 3. – С. 6–12.
9. Severine B., Westman B.J., Saskia H. The Nucleolus under stress // *Molecular Cell*. – 2010. – 40. – P. 216–227.
10. Hein N., Sanji E., Quin J. The nucleolus and ribosomal genes in aging and senescence // *Invited book chapter – Senescence Intech Open access Publisher*. – 2012. – P. 171–208.
11. Буторина А.К., Ермолаева О.В., Черкашина О.Н. Перспективы использования цитогенетического анализа в лесоводстве на примере оценки состояния островных боров Воронежской области // *Успехи современной биологии*. – 2008. – 128, № 4. – С. 400–408.
12. Муратова Е.Н. Методики окрашивания ядрышек для кариологического анализа хвойных // *Ботан. журн.* – 1995. – 80, № 2. – С. 82–86.
13. Войтюк В.П., Андреева В.В. Ядерцева активність у меристемі проростків плюсових дерев сосни звичайної // *Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів*. – 2009. – 7, № 2. – С. 177–183.
14. Дуброва Н.А. Изучение дифференциальной активности ядрышковых организаторов хромосом у дикорастущих растений сем. *Ranunculaceae* // *Цитология и генетика*. – 1986. – № 4. – С. 302–303.
15. Чугункова Т.В. Цитогенетические особенности свеклы при инбридинге и гетерозисе // *Физиология и биохимия культ. растений*. – 2006. – 38, № 2. – С. 153–159.
16. Рождественский Ю.Ф. Особенности микроспорогенеза сосны обыкновенной на Урале и его зависимость от экологических факторов // *Экология*. – 1974. – № 1. – С. 49–53.
17. Тупицин С.С., Рабогина Н.Е., Тупицына Л.С. Уровень тератогенеза как показатель состояния биообъекта в разных экологических условиях // *Известия Самарского научного центра РАН*. – 2012. – 14, № 1 (3). – С. 822–828.
18. Andersen J.S., Lam Y.W., Leung A.K., Ong S.E. Nucleolar proteome dynamics // *Nature*. – 2005. – 433. – P. 77–83.
19. Жарская О.О., Зацепина О.В. Динамика и механизмы реорганизации ядрышка в митозе // *Цитология*. – 2007. – 49, № 5. – С. 355–369.

KORSHIKOV I.I., MILCHEVSKA YA.H., TKACHOVA YU.A., LAPTEVA H.V.

*Donetsk Botanical Garden, National Academy of Sciences of Ukraine,
Ukraine, 83059, Donetsk, Pr. Illicha, 110, e-mail: dbsgenetics@gmail.com*

THE NUCLEUS-NUCLEOLUS VARIATION IN SEED PROGENY OF *PINUS SYLVESTRIS* L. VAR. *CRETACEA* KALENICZ. EX KOM. AMONG SEED YIELD OF DIFFERENT YEARS FROM “MELOVAYA FLORA” NATURAL RESERVE

Aims. Analysis of nuclear organizer activity in seed progeny of one and the same plant group in different years within a natural population of *Pinus sylvestris* L. var. *cretacea* Kalenicz. ex Kom. **Methods.** Nucleoli staining with AgNO₃ in interphase cells of seedlings. **Results.** Differences in cell areas were 1.5 times, in mean nuclear area per cell were 1.9 times in seed progeny of same age plants from the locality of “Melovaya flora” reserve natural population. **Conclusion.** Certain instability of quantitative and qualitative characteristics of nucleoli and nucleus-nucleolus ratio is observed in seed yield of *P. sylvestris* var. *cretacea*, sampled in two successive years.

Key words: nucleolus, seedlings.

УДК 631.84:551.524:633.491 (477.72)

ЛАВРИНЕНКО Ю.О., ВОЖЕГОВА Р.А., БАЛАШОВА Г.С., КОТОВА О.І.

*Інститут зрошуваного землеробства НААН України,
Україна, 73483, м. Херсон, сел. Наддніпрянське, e-mail: lavrin52@mail.ru*

ВПЛИВ СВІТЛОВОГО РЕЖИМУ ТА РІВЕРМУ НА ІНДУКЦІЮ УТВОРЕННЯ МІКРОБУЛЬБ КАРТОПЛІ В КУЛЬТУРІ МЕРИСТЕМ *IN VITRO*

Однією з найскладніших проблем, зазвичай наявних для більшості технічних культур вегетативного розмноження, є зниження рівня продуктивності, викликане вірусною інфекцією, і в разі картоплі це найбільш

актуально [1]. Тому забезпечення поставок вільної від вірусу насінневої картоплі відіграє велику роль у отриманні високих врожаїв технічної культури картоплі.

Для одержання високоякісного

оздоровленого посадкового матеріалу картоплі використовується метод культури верхівкових меристем з послідуєчим мікроклональним розмноженням на живильному середовищі в умовах *in vitro* і вирощуванням мікробульб [2].

Одним із актуальних завдань фізіології рослин є пошук нових фізіологічно активних сполук або їх композицій (природних або синтетичних), які б прискорювали ріст і розвиток рослин, підвищували фотосинтез, продуктивність і якість врожаю картоплі, а також посилювали б в рослинах їх природні генетично детерміновані властивості, такі як стійкість рослин до вірусних і грибних захворювань [3, 4]. У зв'язку з цим, з кожним роком зростають потреби у рiстрегуляторах для вирішення таких важливих для фізіології та біотехнології рослин завдань як оздоровлення і мікроклональне розмноження рослин за допомогою техніки культури ізольованих тканин та органів *in vitro* [5].

Очевидно, що до застосування в практиці кожного із нових регуляторів росту необхідна оцінка його фізіологічної активності за інтегральними показниками росту, розвитку рослин і врожайності культур, також взаємодії їх з іншими факторами при вирощуванні методом культури *in vitro*, такими як інтенсивність освітлення та фотоперіод [6].

Матеріали і методи

Для визначення оптимального режиму бульбоутворення в культурі меристем *in vitro* сорту картоплі Світанок київський у 2010–2012 рр. в умовах мікроклональної лабораторії був проведений дослід відповідно загально-прийнятих методик [1, 7]. На вивчення були поставлені три фактори: фактор А – фотоперіод (10 та 16 годин), фактор В – інтенсивність освітлення (1500 та 3000 люкс), фактор С – концентрація регулятора росту Ріверм (без Ріверму; 0,5 та 5,0 мг/л).

Результати та обговорення

Спостереження за ростом і розвитком рослин показали, що на 20-й день приріст висоти рослин та кількість міжвузлів при обох фотоперіодах (10 та 16 годин) відрізнялись незначно (табл. 1).

Так, приріст висоти рослин складав 6,95 та 7,05 см, а кількість міжвузлів – 6,8 та 7,0 шт, відповідно. Кількість рослин, що утворили мікробульби, складала 12,2 % при 10 годинах освітлення та 11,7 % при 16 годинах.

Інтенсивність освітлення на 20-й день

культивування впливала на розвиток рослин. При освітленні 3000 люкс приріст висоти рослин був на 0,8 см, а кількість міжвузлів на 0,9 шт більші, ніж при 1500 люкс. За цей період утворилось при 3000 люкс на 1,2 % більше мікробульб ніж при інтенсивності освітлення 1500 люкс.

Якщо аналізувати вплив концентрації Ріверму на розвиток рослин у цей період, то потрібно зазначити, що додавання Ріверму до поживного середовища пригнічує ріст рослин у висоту. Так, висота рослин без Ріверму на 0,5 см та 1,5 см більша, ніж при концентрації 0,5 та 5,0 мг/л, відповідно; кількість міжвузлів більше на 0,5 та 1,3 шт, відповідно. Але на інтенсивність бульбоутворення вплив Ріверму прямо протилежний: мікробульб утворилось на 12,5 та 3,8 % більше при концентрації Ріверму 5,0 та 0,5 мг/л відповідно, ніж у варіанті без додавання Ріверму.

При 10 годинному фотоперіоді інтенсивність освітлення майже не впливала на ріст і розвиток рослин: середній приріст складає 6,7 та 7,2 см; кількість міжвузлів – 6,4 та 7,1 шт; відсотки бульбоутворення – 12,0 та 12,3 % при 1500 та 3000 люкс, відповідно.

При фотоперіоді 16 годин приріст рослин у висоту був на 0,9 см, кількість міжвузлів на 0,9 шт більше при освітленні 3000 люкс, ніж при 1500 люкс; кількість рослин, що утворили мікробульби – більша на 2,0 %.

На 40-й день досліджень фотоперіод та інтенсивність освітлення на приріст висоти рослин та кількість міжвузлів не впливали: приріст був 0,25 та 0,23 см (10 та 16 годин), по 0,24 см при 1500 і 3000 люкс; кількість рослин, що утворили мікробульби при обох фотоперіодах майже однакова – 52,8 та 53,5 % при 10-ти та 16-ти годинах, відповідно.

При інтенсивності освітлення 1500 люкс було утворено на 10,3 % мікробульб більше, ніж при 3000 люкс. Тенденція пригнічення росту рослин у висоту при додаванні Ріверму спостерігається і на 40-й день культивування: по 0,2 см при концентрації 0,5 та 5,0 мг/л стимулятору та 0,3 см – без нього; кількість міжвузлів, відповідно, 7,0; 6,4 та 7,7 шт. Інтенсивність бульбоутворення зростає з підвищенням концентрації Ріверму: на 3,0 % при концентрації 0,5 мг/л та на 7,2 % при концентрації 5,0 мг/л, ніж без додавання стимулятору.

Таблиця 1. Вплив регулятору росту, освітлення та фотоперіоду на інтенсивність бульбоутворення картоплі сорту Світанок кийвський у культурі *in vitro*, середнє за 2010–2012 рр.

Фотоперіод, год	Інтенсивність освітлення, люкс	Концентрація Ріверму в поживному середовищі, мг/л	На день культивування													
			20-й						40-й						60-й	80-й
			приріст висоти рослин, см	кількість міжвузлів, шт	рослин, що утворили, %		приріст висоти рослин, см	кількість міжвузлів, шт	рослин, що утворили, %		приріст висоти рослин, см	кількість міжвузлів, шт	рослин, що утворили, %			
					столони	мікробульби			столони	мікробульби			столони	мікробульби		
10	1500	без Ріверму	7,5	6,9	92,0	9,0	0,40	7,5	47,0	53,0	80,0	80,0	80,0			
		0,5	6,1	6,0	87,0	13,0	0,13	6,2	25,0	73,0	85,0	85,0	85,0			
		5,0	6,5	6,2	86,0	14,0	0,23	6,6	44,0	56,0	79,0	79,0	79,0			
		без Ріверму	8,7	8,5	96,0	4,0	0,30	8,6	64,0	36,0	97,0	97,0	97,0			
		0,5	6,8	6,6	88,0	9,0	0,23	6,7	56,0	38,0	90,0	90,0	90,0			
		5,0	6,1	6,3	76,0	24,0	0,23	6,5	39,0	61,0	87,0	87,0	88,0			
16	1500	без Ріверму	6,5	6,5	93,0	7,0	0,27	6,6	40,0	60,0	95,0	95,0	95,0			
		0,5	7,7	7,4	91,0	9,0	0,20	7,3	47,0	53,0	91,0	91,0	91,0			
		5,0	5,5	5,6	83,0	16,0	0,20	5,8	44,0	55,0	92,0	92,0	93,0			
		без Ріверму	8,1	7,9	94,0	6,0	0,23	8,0	34,0	50,0	80,0	80,0	81,0			
		0,5	8,0	7,9	90,0	10,0	0,27	7,8	52,0	47,0	96,0	96,0	96,0			
		5,0	6,5	6,5	78,0	22,0	0,20	6,7	45,0	56,0	95,0	95,0	95,0			
16	3000	без Ріверму	8,1	7,9	94,0	6,0	0,23	8,0	34,0	50,0	80,0	80,0	81,0			
		0,5	8,0	7,9	90,0	10,0	0,27	7,8	52,0	47,0	96,0	96,0	96,0			
		5,0	6,5	6,5	78,0	22,0	0,20	6,7	45,0	56,0	95,0	95,0	95,0			
		без Ріверму	8,1	7,9	94,0	6,0	0,23	8,0	34,0	50,0	80,0	80,0	81,0			
		0,5	8,0	7,9	90,0	10,0	0,27	7,8	52,0	47,0	96,0	96,0	96,0			
		5,0	6,5	6,5	78,0	22,0	0,20	6,7	45,0	56,0	95,0	95,0	95,0			

На 60-тий та 80-тий дні досліджень інтенсивність бульбоутворення майже не змінилась і залежала від фотоперіоду та інтенсивності освітлення. Так, при 10-ти годинах вона становила 86,3 та 86,5 %, відповідно, що на 5,2 та на 5,3 % менше, ніж при 16-ти годинному фотоперіоді. При інтенсивності освітлення 3000 люкс на 60-тий та 80-тий дні спостережень утворено мікробульб на 3,8 та 4,0 % більше, ніж при 1500 люкс. При 10-ти годинному фотоперіоді та інтенсивності освітлення 3000 люкс мікробульб утворилось на 10,0 та 10,4 % більше, ніж при 1500 люкс. При фотоперіоді 16 годин, навпаки, мікробульб утворено менше на 2,4 та 2,3 % при 3000 люкс, ніж при 1500 люкс. Продуктивність картоплі сорту Світанок київський в культурі *in vitro* залежно від концентрації Ріверму, інтенсивності освітлення та фотоперіоду наведена в таблиці 2.

Фотоперіод та інтенсивність освітлення значно впливали на продуктивність. Так, маса середньої мікробульби та маса мікробульб на одну рослину при 16 годинах на 75,1 та 74,0 мг більші, ніж при 10 годинному фотоперіоді, відповідно. Вихід мікробульб масою 300 мг і більше у 2,8 рази вищий при 16 годинах, ніж при 10 годинах. Кількість рослин, що утворили

мікробульби становить 92 та 86 %, відповідно. При інтенсивності освітлення 3000 люкс маса середньої мікробульби становить 217,9 мг, що на 82,7 мг більше, ніж при 1500 люкс. Маса мікробульб на одну рослину на 80,7 мг більша при 3000 люкс, ніж при 1500 люкс і складає 199,1 мг. При 3000 люкс вихід мікробульб масою 300 мг і більше в 2,8 рази вищий, ніж при 1500 люкс і становить 25,1 %. Кількість рослин, що утворили мікробульби складає 91 та 87 %, відповідно.

При взаємодії цих двох факторів маса середньої мікробульби при 10 годинах та 3000 люкс більша на 47,8 мг, ніж при 1500 люкс і складає 162,9 мг; маса мікробульб на одну рослину – на 56,8 мг; вихід мікробульб масою 300 мг і більше – в 3,0 рази. Кількість рослин, що утворили мікробульби – 92 та 81 шт. – відповідно.

При фотоперіоді 16 годин при 3000 люкс маса середньої мікробульби більша на 117,8 мг і складає 273,0 мг; маса мікробульб на одну рослину – на 104,7 мг і складає 248,1 мг; вихід мікробульб масою 300 мг і більше – вищий у 2,7 рази, відповідно. Кількість рослин, що утворили мікробульби 91 та 93 шт., відповідно.

Таблиця 2. Продуктивність картоплі в культурі *in vitro* залежно від концентрації Ріверму, інтенсивності освітлення та фотоперіоду, 2010–2012 рр

Фотоперіод, год.	Інтенсивність освітлення, люкс	Концентрація Ріверму в поживному середовищі, мг/л	Маса середньої мікробульби, мг	Маса мікробульб на одну рослину, мг	Вихід мікробульб масою 300 мг і більше, %	Кількість рослин, що утворили мікробульби, %
10	1500	без Ріверму	111,9	89,1	2,4	80
		0,5	110,6	93,7	2,8	83
		5,0	122,9	97,2	8,3	79
	3000	без Ріверму	184,8	180,0	16,8	97
		0,5	153,8	139,5	12,8	90
		5,0	150,0	130,8	10,4	88
16	1500	без Ріверму	144,7	135,4	11,6	95
		0,5	172,4	157,2	17,1	91
		5,0	148,4	137,6	12,4	93
	3000	без Ріверму	237,8	190,4	30,1	81
		0,5	282,7	272,3	42,7	96
		5,0	298,5	281,5	38,0	95

НІР ₀₅	2010 р.	28,1	23,6
	2011 р.	18,3	13,4
	2012 р.	13,0	11,6

При інтенсивності освітлення 1500 люкс і фотоперіоді 16 годин маса середньої мікробульби більша при концентрації Ріверму 0,5 мг/л на 55,9 % і при концентрації 5,0 мг/л – на 20,8 %, ніж при 10-ти годинному освітленні; маса мікробульб на одну рослину більша на 67,8 % при концентрації Ріверму 0,5 мг/л і на 41,6 % при концентрації 5,0 мг/л, відповідно. Мікробульби найбільшої маси отримано при фотоперіоді 16 годин і освітленні 3000 люкс: при концентрації Ріверму 0,5 мг/л – 282,7 мг, при концентрації 5,0 мг/л – 298,5 мг, що відповідно на 128,9 та 148,5 мг більше, ніж при фотоперіоді 10 годин. Маса мікробульб на одну рослину також вища: при концентрації Ріверму 0,5 мг/л становить 272,3 мг, при концентрації 5,0 мг/л – 281,5 мг, що на 132,8 та 150,7 мг більше, ніж при 10 годинному фотоперіоді. Залежність маси середньої мікробульби та маси мікробульб на одну рослину від всіх трьох факторів відображена на рисунку.

При інтенсивності освітлення 1500 люкс і

фотоперіоді 16 годин вихід мікробульб масою 300 мг і вище був на 14,3 % більшим при концентрації Ріверму 0,5 мг/л, ніж при фотоперіоді 10 годин. При концентрації Ріверму 5,0 мг/л вихід таких мікробульб був на 4,1 % більшим. Кількість рослин, що утворили мікробульби більша при фотоперіоді 16 годин, освітленні 3000 та 1500 люкс на 6 та 8 % при концентрації Ріверму 0,5 мг/л і на 7 та 14 % – при концентрації 5,0 мг/л Ріверму, ніж при фотоперіоді 10 годин.

Висновки

Для забезпечення високої інтенсивності бульбоутворення сорту картоплі Світанок київський в культурі *in vitro* слід використовувати фотоперіод 16 годин та інтенсивність освітлення 3000 люкс з концентрацією Ріверму в поживному середовищі 5,0 мг/л: маса середньої мікробульби при цьому складає 298,5 мг, маса мікробульб на одну рослину – 281,5 мг.

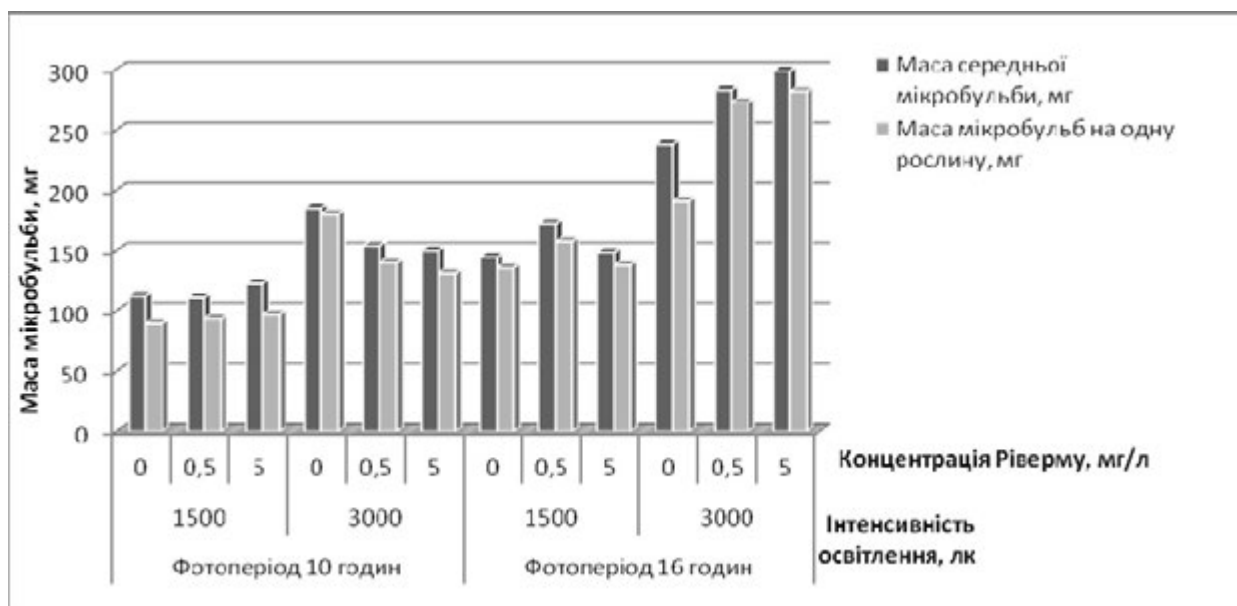


Рис. Продуктивність рослин картоплі сорту Світанок київський в культурі *in vitro* залежно від концентрації Ріверму, інтенсивності освітлення та фотоперіоду

Література

1. Трофимец Л.Н., Бойко В.Б., Зейрук Т.В. и др. Биотехнологические методы получения и оценки оздоровленного картофеля. – Москва: ВО «Агропромиздат», 1988. – 37 с.
2. Бугаева І.П., Сніговий В.С. Культура картоплі на півдні України. – Херсон: Айлант, 2002. – 176 с.
3. Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. – Киев: Наук. Думка, 1980. – 488 с.
4. Гамбург К.З. Биохимия ауксина и его действие на клетки растения. – Новосибирск, 1976. – 272 с.
5. Кокшарова М.К. Способы оздоровления и ускоренного размножения семенного картофеля: Дис. к.с.-х. н.: 06.01.05. – Екатеринбург, 2004. – 150 с.: 61-04/819.
6. Мелик-Саркисов О.С., Фадеева И.Н. Использование эффекта клубнеобразования в биотехнологии картофелеводства // Весник сельскохозяйственной науки. – 1989, № 9. – С. 86–91.

7. Куценко В.С., Осипчук А.А., Подгасецкий А.А. та ін Методичні рекомендації щодо проведення досліджень з картоплею. – Немішаєве, 2002. – 183 с.

LAVRYNENKO U.O., VOZHEGOVA R.A., BALASHOVA G.S., KOTOVA H.I.

Institute of Irrigating Agriculture NAAS,

Ukraine, 73483, Kherson, Naddneprianskoe, e-mail: lavrin52@mail.ru

INFLUENCE OF LIGHT REGIME AND RIVERM ON THE INDUCTION OF POTATO MICROTUBERS PRODUCTION IN MERISTEM *IN VITRO* CULTURE

Aims. In order to implement new regulators of growth it is necessary to assess their physiological activity according to the integral indicators of growth, plant development and crop yield, and also their interaction with other factors in growing through *in vitro* culture, such as light intensity and photoperiod. **Methods.** In order to determine an optimal regime of tuber production in meristem *in vitro* culture of the potato variety Svitnok Kyivsky under the conditions of a microclonal laboratory an experiment was done according to the generally adopted techniques. There were three factors to study: Factor A – photoperiod (10 and 16 hours), Factor B – light intensity (1500 and 3000 lux), Factor C – the concentration of the growth regulator Riverm (without Riverm; 0.5 and 5.0 mg/l). The observations of the plant growth and development proved that on the 20th day the height gain of the plants and the number of internodes in both photoperiods differed inconsiderably. **Results.** The productivity of the potato variety Svitnok Kyivsky obtained through *in vitro* culture depends on the concentration of Riverm, light intensity and photoperiod. **Conclusions.** In order to provide high intensity of tuber production of the potato variety through *in vitro* culture it is necessary to use the photoperiod of 16 hours and light intensity of 3000 lux with the concentration of Riverm in nutrient medium of 5.0 mg/l: the weight of an average microtuber being 296.5 mg, the weight of microtubers per plant being 281.5 mg.

Key words: tuber production, plant height, number of internodes, growth regulator, light intensity, nutrient medium, weight of microtubers.

УДК 63(091):633.63:631.53:631.527.8

МАЛЕЦКАЯ Е.И.

Институт цитологии и генетики ФАНО,

Россия, 630090, г. Новосибирск, пр. Лавреньева, 10, e-mail: e_mal@bionet.nsc.ru

РЕПРОДУКТИВНАЯ БИОЛОГИЯ И МЕТОДЫ СЕЛЕКЦИИ САХАРНОЙ СВЕКЛЫ В XX ВЕКЕ

Сахарная свекла относительно молодая сельскохозяйственная культура. Датой её рождения считается 1789 год, когда немецкий физик-химик Франц Ахард опубликовал результаты своих опытов с дикими и столовыми формами свекловицы, предложив метод промышленного извлечения сахара. Прежде чем широко распространиться новая культура должна была пройти необходимую адаптацию к различным условиям возделывания. Она достаточно быстро вошла в культуру вначале в Германии и Франции, а затем ее стали возделывать и в Российской Империи. Хотя первая выработка сахара из свеклы в России относится к началу XIX в., ее селекция началась примерно с 1870-х гг., когда на территории Польши, входившей в состав России, к селекционно-семеноводческим работам присту-

пили сначала Александр Янаш, а затем Юлиан Добжанский [1]. Первые селекционно-семеноводческие работы со свеклой включали проведение массовых отборов и акклиматизацию чужого исходного материала. За последующие годы произошло существенное улучшение сахарной свеклы благодаря методу индивидуального отбора корнеплодов по сахаристости, предложенного в 1856 г. французским селекционером Л. Вильмореном [2]. Метод массового отбора в сочетании с индивидуальным вскоре были дополнены поляриметрическим отбором, используя который стали получать педигри – родоначальники новых сортов.

Материалы и методы

В настоящем сообщении в историческом контексте рассмотрены проблемы

репродуктивной биологии свеклы и их связь с методами селекции. В первый период работы со свеклой внимание исследователей и селекционеров концентрировалось на признаках продуктивности (урожайность и содержание сахара в корнях) и отсутствовали исследования по репродуктивной биологии этой культуры, т.е. исследования по развитию семян и плодов у свеклы. Трудности изучения процессов воспроизводства семян у свеклы состояли не столько в специфичности менделевского анализа наследования тех или иных признаков, сколько в проведении наблюдений за массовыми процессами, каковыми являются цветение, опыление, процессы оплодотворения и эмбриогенеза семян, карпогенез плодов, что в совокупности и составляет предмет репродуктивной биологии свеклы.

Значительный вклад в развитие исследований по репродуктивной биологии свеклы внесли украинские ученые, в частности, по проблеме одностокости плодов. Стремление свекловодов избавиться от затрат ручного труда, неизбежного при фабричном выращивании многостокых сортов, стимулировало поиск таких растений, у которых на цветоносных побегах закладываются не соцветия-клубочки, а одиночные цветки. Доноры одностокости впервые были найдены на Украине в 1930-х гг. [3], а в середине 1950 гг. в СССР появились первые два одностокых сорта – «Ялтушковская односемянная» и «Белоцерковская односемянная» [4].

Кроме изменений в типах цветков и соплодий, были найдены растения, у которых формируются летальные пыльцевые зерна (цитоплазматическая мужская стерильность – признак ЦМС). Впервые ЦМС у свеклы в 1940-х гг. обнаружил американский генетик Оуэн [5]. Это открытие позволило существенно изменить методы селекции и контролировать скрещивание селекционных образцов в полевых условиях. Два открытия в области репродуктивной биологии и генетики свеклы в 1930–1940 гг. (одностокость посевных единиц и цитоплазматическая мужская стерильность) положили начало современной гибридной селекции. Несмотря на большие успехи в изучении этих признаков, достигнутых за последние десятилетия, дальнейшие исследования по экспрессии одностокости плодов и признака ЦМС у сахарной свеклы сохраняют актуальность.

Результаты и обсуждение

Большее понимание проблемы реализации

признака одностокости плодов произошло после детального изучения биологии цветения, строения и эмбриогенеза цветков и плодов у свеклы. Формирование соцветий у свеклы исследовала Е.И. Харечко-Савицкая [6]. Показано, что у раздельноцветковых (РЦ) растений из меристе-матического бугорка на цветоносах сначала образуется небольшой вырост – будущий околоцветник, затем – пыльники, тычиночные нити и ткани гинецея, состоящие из трех плодолистиков, образующие впоследствии завязь и рыльце, на дне которой формируется семяпочка. У сростноцветковых (СЦ) растений первый цветок в соцветии закладывается аналогично вышеописанному, а последующие цветки в соцветии-клубочке закладываются из ткани первого цветоложа. «Из меристемы первого цветоложа могут возникнуть 2–4 или большее число новых цветолож, прикрепленных к общей цветоножке» [7].

Работы по репродукции семян у сахарной свеклы, казалось бы, однозначно свидетельствуют, что сахарная свекла является строгим перекрестноопыляющимся растением [6], у которой самооплодотворение предотвращается системой генов самонесовместимости [8, 9]. Однако многие исследования по воспроизводству семян у свеклы показывали иной способ воспроизводства семян – многие растения свеклы склонны к агамоспермному способу воспроизводства [10, 11]. Впервые об этом сообщил Н.В. Фаворский в 1928 г., обнаружив и описав сформированные зародыши в закрытых цветках свеклы [12]. Это означало, что система воспроизводства семян у сахарной свеклы включает несколько вариантов – перекрестное опыление и оплодотворение, самооплодотворение и агамоспермию. Дальнейшие исследования подтвердили возможность партеногенетического способа воспроизводства семян у свеклы [13–15].

До середины XX в. все селекционные работы по сахарной свекле проводили на многостокых формах, и потому не было необходимости в работах по изучению многостокости в отдельных плодах свеклы. Значимость этого признака для селекции оказалась весьма актуальной после появления в производстве одностокых сортов и гибридов свеклы. Принято считать, что завязь в цветках свёклы всегда одногнездная с одной семяпочкой [16]. Но, как показали наши многолетние наблюдения, множественность семяпочек в завязях цветков свеклы довольно

распространенное явление (рис. 1, 2) [17, 18].

Как видно из представленной схемы, многоростковыми могут быть не только соплодия-клубочки, полученные от СЦ растений, но и отдельные плоды от РЦ растений, если у них под крышечкой плода содержится не один, а два или большее число семян. Кроме того, если в одном семени содержится не один, а несколько зародышей, то имеем дело с многозарошестью (рис. 1, 2). Показано, что в одиночных плодах может формироваться от двух до пяти и более семян [17–19] (рис. 2).

Наша работа с многосемяпочковостью завязей цветков у свеклы в начале 1980-х гг. была связана с надеждой получить гаплоидные проростки от многосемянных плодов, которые многие авторы ошибочно рассматривали как «близнецов» [17, 20, 21]. Теперь очевидно, что гаплоидия и множественность семяпочек разные ипостаси – в рамках репродуктивной биологии их надо относить к разным понятиям: гаплоидия – это одиночные наборы хромосом в ядрах клеток (клеточный уровень), а множественность семяпочек в завязях цветков – понятие из эмбриологии (тканевой уровень).

Низкая частота встречаемости гаплоидов ($10^{-5} - 10^{-6}$) в семенных партиях, воспроизводимых двуродительским способом [21, 22], побудила исследователей искать более эффективные методы получения гаплоидов у свеклы. Нами в 1990-е гг. был разработан беспыльцевой (однородительский) метод воспроизводства семян у сахарной свеклы

(партено-генетический или апозиготический) [13]. Многолетними исследованиями показано, что при саморепродукции у пыльцестерильных растений (агамоспермия) формируется достаточно большое число семян как гаплоидных, так и дигаплоидных семян [15, 23]. Выход гаплоидных сеянцев в семенных партиях составляет 5–8 % (иногда и больше) от числа проросших семян. Это значение выше на несколько порядков, нежели выход гаплоидов, получаемый при двуродительской форме воспроизводства семян свеклы, и даже несколько выше, чем выход гаплоидов в культуре *in vitro*. Затраты же труда при апозиготическом способе воспроизводства семян на порядок ниже, чем при любых других способах получения гаплоидов. Очевидно, что дигаплоидные семена при апозиготии возникают из клеток, прошедших мейотическое деление [13]. Гаметы с нередуцированным числом хромосом возникают спонтанно у многих видов растений, и нередукция числа хромосом связана с эпигеномной изменчивостью ядер в клеточных популяциях [24].

Процесс образования гаплоидов связан с типом клеточных делений в эмбриональных тканях семяпочек. Показано, что кроме обычного митотического деления клеток в семяпочках на 3–5-й день после начала цветения происходит другой быстрый (амитотический) способ их размножения.

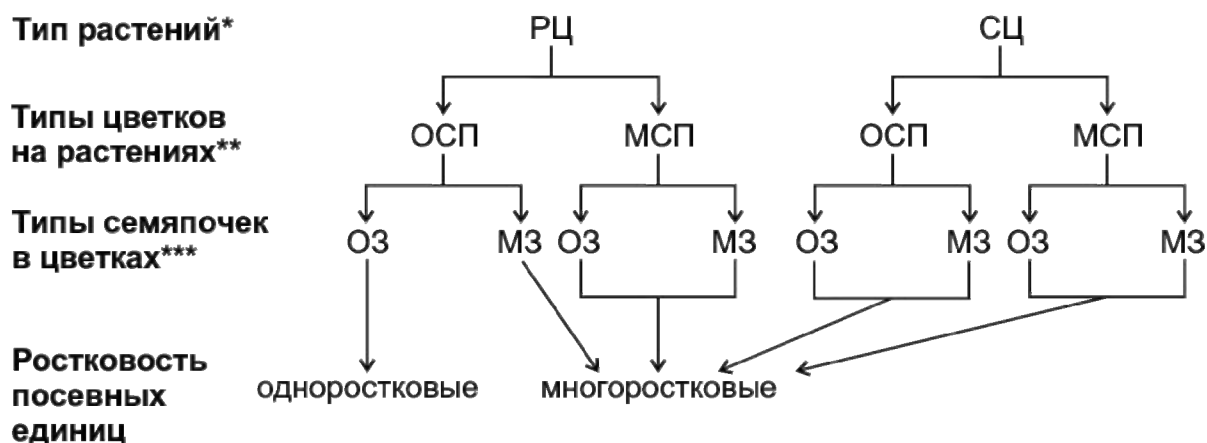


Рис. 1. Схематическое изображение одно- многоростковых посевных единиц у свеклы. РЦ – раздельноцветковые, СЦ – сростноцветковые, ОСП – односемяпочковые, МСП – многосемяпочковые, ОЗ – однозародышевые, МЗ – многозародышевые



Рис. 2. Один плод с тремя семяпочками, каждая из которых имеет хорошо сформированный проросток

«Деление начинается почкованием ядрышек, которые затем полностью отделяются и отходят к периферии ядра. Вокруг новообразовавшихся ядрышек обособляются участки ядра, что ведет к возникновению новых маленьких ядер внутри старого <...> в цитоплазме около него закладывается клеточная перегородка. Процесс немитотического деления носит массовый характер и различные его фазы видны почти во всех ядрах ткани нуцеллуса» [16]. Это наблюдение говорит о том, что пути получения гаплоидных семян не ограничиваются их традиционными схемами: опыление цветков свеклы пылью дикорастущих видов; нанесение инактивированной пыли после ее обработки радиацией; обработка растений эпимутагеном и т.д. [22].

Важным фактором репродукции у свеклы служит миксоплоидность клеточных популяций, когда наряду с доминирующей фракцией клеток

встречаются клетки, у которых число хромосом в ядрах меньше или больше их основного числа [25, 26]. В таблице показаны доли клеток с разным числом хромосом в ядрах в клеточной популяции гаплоидного растения (выборка составила 383 клетки). Отмечено, что встречаются клетки с числом хромосом менее 9 (2,4 %); клетки с гаплоидным числом хромосом ($x = 9$) – 39,4 %; клетки с диплоидным числом хромосом ($2x=18$) – 16,7 %; клетки с триплоидным числом хромосом ($3x = 27$) – 5,7 % и клетки с числом хромосом 36 и более – 1,04 %. Кроме того, встречаются клетки, у которых число хромосом в ядрах не кратно 9 (анэуплоидные) [27]. У растений, полученных одноклеточным способом, уровень миксоплоидности клеточных популяций, как правило, повышен [23, 26, 27], и попадание полиплоидных клеток в зародышевые пути дает таким растениям возможность формировать дигаплоидные зародыши.

Выводы

В заключении можно сказать, что, по нашему мнению, основные проблемы в области селекционного улучшения сахарной свёклы будут связаны не столько с поиском правил менделевского контроля в наследовании репродуктивных или хозяйственных признаков, сколько в понимании и исследовании базовых механизмов эмбрио-и семеногенеза. Исследования этих репродуктивных признаков должны опираться как на генетическую, так и эпигенетическую парадигмы наследования.

Работа выполнена при поддержке Интеграционного гранта № 3 президиума СО РАН и НАН Белоруссии.

Таблица. Распределение клеток по числу хромосом в ядрах, %

Число хромосом в клетках (шт.)						Всего клеток
менее 9	9	10-17	18	27	36 и более	
2,4 %	39,4 %	34,7 %	16,7 %	5,7 %	1,04 %	383

Литература

1. Шредер А. Селекция сахарной свёклы в Польше. Исторический очерк // Энциклопедия рода. Биология, генетика и селекция свёклы. – Новосибирск: изд-во Сова, 2010ю – С. 45–51.
2. Зосимович В.П. Виды дикой и происхождение культурной свеклы // Биология и селекция сахарной свеклы. – М.: Колос, 1968. – С. 7–65.
3. Бордонос М.Г. Характер расщепления и некоторые особенности свекловичных высадков с одноцветковыми семенами // Селекция и семеноводство. – 1938. – №6. – С. 24–27.
4. Роик Н.В. Создание одноклеточных сортов и гибридов сахарной свёклы в Советском Союзе // Энциклопедия рода *Beta*. Биология, генетика и селекция свёклы. – Новосибирск: изд-во Сова, 2010. – С. 248–264.
5. Owen F.V. Cytoplasmically inherited male sterility in sugar beet // Agric. Res. 1945. – 71, N 10. – P. 423–440.
6. Харечко-Савицкая Е.И. Цитология и эмбриология сахарной свеклы // Свекловодство. – К.: Госсельхозиздат, 1940. – 1. – С. 453–550.

7. Savitsky N.I. Embryology of mono- and multigerm fruits in the genus *Beta* L. // J. Amer. Soc. Sugar Beet Technol. – 1950. – 6. – P. 160–164.
8. Owen F.V. Inheritance of cross- and self-sterility and self-fertility in *Beta vulgaris* L. // J. Agric. Res. – 1942. – 64. – P. 679–698.
9. Малецкий С.И. Семенное размножение сахарной свеклы // Энциклопедия рода. Биология, генетика и селекция свёклы. – Новосибирск: изд-во Сова, 2010. – С. 52–62.
10. Ширяева Э.И., Ярмолюк Г.И., Кулик А.Г., Червякова В.В. Апомиксис у самоопыленных линий сахарной свеклы и использование его в селекции // Цитология и генетика. – 1989. – 11. – С. 32–48.
11. Сеилова Л.Б. Апомиксис у сахарной свеклы и его использование в практической селекции: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. Алматы, 1996. – 44 с.
12. Фаворский Н.В. Материалы по биологии и эмбриологии сахарной свеклы // Тр. Научного института селекции. – К., 1928. – Вып. 2. – С. 1–14.
13. Малецкий С.И., Малецкая Е.И. Самофертильность и агамоспермия у сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) // Генетика. – 1996. – 32, № 12. – С. 1643–1650.
14. Сеилова Л.Б. Эмбриология агамоспермии у линейных форм сахарной свёклы // Энциклопедия рода *Beta*. Биология, генетика и селекция свёклы. – Новосибирск: изд-во Сова, 2010. – С. 158–163.
15. Цильке Р.А., Позняк С.И., Малецкая Е.И., Юданова С.С., Малецкий С.И. Завязываемость плодов у гибридов сахарной свеклы при апозиготической репродукции в контрастных условиях выращивания // Вестник НГАУ. – 2010. – 5, № 3. – С. 19–25.
16. Зайковская Н.Э. Биология цветения, цитология и эмбриология сахарной свеклы // Биология и селекция сахарной свеклы. – М.: Колос, 1968. – С. 137–206.
17. Малецкая Е.И. Наследование признаков многосемянности и многозародышевости у сахарной свеклы // Генетика сахарной свеклы. – Новосибирск: Наука. Сиб. Отд-ние, 1984. – С. 79–93.
18. Малецкая Е.И. Многосемяпочковость цветков и многоростковость посевных единиц у сахарной свёклы // Энциклопедия рода *Beta*: биология, генетика и селекция свёклы. – Новосибирск: издательство «Сова», 2010. – С. 290–301.
19. Жужжалова Т.П. Полиэмбриония у сахарной свеклы // Матер. VII Всесоюз. Симпоз. По эмбриологии растений. – Киев: Наук. Думка, 1978. – С. 26–27.
20. Fischer H.E. Untersuchungen an Zwillingen von *Beta vulgaris* L. // Zuchter. – 1956, Bd.26. – Heft 4/5. – S. 136–152.
21. Добрецова Т.Б., Лутков А.Н., Манжос А.М. Спонтанные полиплоидные и гаплоидные формы сахарной свеклы у близнецовых растений // Докл. АН СССР. – 1965. – 160, № 2. – С. 454–457.
22. Bøsemark N.O. Haploids and homozygous diploids, triploids and tetraploids in sugar beet // Hereditas. – 1971. – 69. – P. 193–204.
23. Юданова С.С., Малецкая Е.И. Связь эпигеномной изменчивости с семенной продуктивностью при апозиготическом способе размножения сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) // Достижения и проблемы генетики, селекции та биотехнологии. – Киев: Логос, 2007. – 2. – С. 221–225.
24. Frenkel R. 1975. Über das Auftreten von unreduzierten Gameten bei Angiospermen // Arch.Zucht.Forsch. – 1975. – 5. – P. 201–208.
25. Кунах В.А., Адонин В.И., Ожередов, Блюм Я.Б. Миксоплоидия у диких и культивируемых видов крестоцветных, способных к гибридизации с рапсом *Brassica Napus*. // Цитология и генетика. – 2008. – 42. – С. 81–86.
26. Юданова С.С. Миксоплоидия клеточных популяций сахарной свеклы и ее связь с репродуктивными признаками: Дис. ... канд. биол. наук. С.-Пб., Всероссийский НИИ растениеводства, 2004. – 126 с.
27. Малецкая Е.И., Юданова С.С. Цитологический анализ миксоплоидии клеточных популяций в апозиготических потомствах гаплоидных растений сахарной свеклы // Сб. науч. тр.: Факторы экспериментальной эволюции организмов. – Киев: Логос, 2013. – 13. – С. 210–214.

MALETSKAYA E.I.

*Institute of Cytology and Genetics Siberian Branch of Russian Academy of Science,
Russia, 630090, Novosibirsk, av. Lavrenteva, 10, e-mail: e_mal@bionet.nsc.ru*

REPRODUCTION BIOLOGY OF SUGAR BEET AND METHODS OF ITS SELECTION TWENTIETH CENTURY

Aims. Describe the status of work in the field of reproductive biology and breeding of sugar beet with the beginning of work in the field of breeding in Russia. **Results.** A brief historical review of major achievements in the field of reproductive biology of sugar beet in connection with problems of selection. **Conclusions.** Briefly outlined the prospects for work in the field of reproductive biology and breeding. **Key words:** agamospermy, haploids, reproductive biology, mixoploidy.

ИЗУЧЕНИЕ АКТИВНОСТИ СИНТЕЗА ГЕНЕТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА В КЛЕТКЕ ГЕТЕРОЗИСНЫХ ГИБРИДОВ ТОМАТА И ХЛОПЧАТНИКА

В настоящее время выполнено большое количество исследований с целью выяснения у гибридных форм систем фотосинтеза [1], дыхания [2], активности отдельных ферментов [3], белкового полиморфизма [4], активности биосинтетических процессов [5], функциональной активности хлоропластов [6] и митохондрий [7]. Большое внимание уделяется оценке состояния наследственного аппарата в связи гетерозисом [8, 9].

Анализ существующих данных по гетерозису дает основание считать, что эффект гетерозиса в своей основе, по-видимому, включает активацию гена или комплекса генов и относится к категории явлений, прямо или косвенно связанных с механизмами генетической регуляции развития признаков в онтогенезе. В настоящей работе представлялось важным изучить содержание и фракционный состав ДНК у гетерозисных гибридов и их родительских форм томата и хлопчатника. Интегральная оценка генетического аппарата клетки с учетом нехромосомных генетических элементов (нуклеиновые кислоты митохондрий и хлоропластов) позволит наиболее полно определить основные факторы, взаимодействие которых обеспечивает гетерозисный эффект.

Материалы и методы

В качестве объекта исследований были выбраны хозяйственно-ценные культуры: томат (*Lycopersicon esculentum* L.) и хлопчатник (*Gossypium* L.). Для определения фракционного состава ДНК и содержания нуклеиновых кислот в хлоропластах и митохондриях использовали методы, описанные в работе В.Г. Конарева и С.Л. Тютерева [10]. Митохондрии и хлоропласты выделяли методом дифференциального центрифугирования.

Результаты и обсуждение

Из приведенных в таблице 1 данных видно, что тотальная ДНК у всех вариантов томата представлена главным образом стабильной формой, содержание которой колеблется в пределах 53–65 %. На долю лабильной ДНК приходится 27–36 %. Остальная ДНК определялась в виде остаточной ДНК.

Наиболее высоким содержанием

суммарной ДНК в расчете на сырую массу навески характеризовались сорта Киевский 139, Fanal и Valiant. У всех гибридных комбинаций не отмечено отличий в содержании общей ДНК (в мг % на сырую массу) по сравнению с их родительскими формами. Сравнение гибридов между собой также не выявило заметных изменений по этому показателю.

Что касается лабильной ДНК, то можно лишь отметить ее более высокое содержание у гибрида Белый налив x Resista по сравнению с родительскими сортами. У всех остальных гибридов не выявлено превышение этой фракции над родительскими формами. Среди гибридов наиболее низким содержанием лабильной ДНК характеризовался вариант Valiant x Ленинградский скороспелый. Далее ее содержание возрастало в ряду: Cavalier x Fanal, Белый налив x Resista, Киевский 139 x Ленинградский скороспелый.

Расчет отношения содержания лабильной фракции к стабильной показал, что его величины у гибридов изменяются в такой же последовательности, как и содержание лабильной ДНК. Следует, однако, отметить, что гибриды Киевский 139 x Ленинградский скороспелый и Белый налив x Resista заметно превышали по этому показателю своих родителей. Остальные два гибрида занимали промежуточное положение.

В таблице 2 представлены данные по изучению содержания и фракционного состава ДНК на клетку листа у гетерозисных гибридов хлопчатника и их исходных форм.

У гибридов отмечается активация синтеза ДНК в клетке листа. Так, увеличение содержания ДНК на клетку у гибрида М-4 x АК-4-42 составило в сравнении с родителями 37,4 %. Гибрид М-4 x С-460 по содержанию ДНК на клетку на 4,9 и 6,1 пг превышал родительские сорта. Увеличение содержания ДНК на клетку, в основном, наблюдается за счет всех фракций, при этом отмечается значительное увеличение лабильной ДНК. Увеличение количества лабильной фракции у гибрида М-4 x АК-4-42 составило 48 %, гибрида М-4 x С-460–40 %, в сравнении с

родительскими формами. Гибрид хлопчатника М-4 х АК-4-42 по содержанию стабильной ДНК, хотя и занимает среднее положение в сравнении с исходными формами, однако, по сравнению со средним показателем обоих родителей, у него отмечается увеличение количества ДНК на 15,1 %.

Интересным, на наш взгляд, является тот факт, что у гетерозисных гибридов отмечается уменьшение количества клеток на единицу площади, что свидетельствует об увеличении

размера клеток гибрида. Так, у гибрида хлопчатника М-4 х АК-4-42 количество клеток на единицу площади листа составило 19 против 24 и 21 $\times 10^6$ у исходных форм. У гибрида М-4 х С-460 этот показатель равен 21 против 24 и 31 $\times 10^6$ у родителей. При этом масса клеток у гетерозисных гибридов также увеличивается: масса одной клетки гибрида М-4 х АК-4-42 составляет $14,1 \times 10^{-9}$ г, у родительских форм – 10,7 и $12,8 \times 10^{-9}$ г, соответственно.

Таблица 1. Фракционный состав ДНК листьев гибридов томата и их родительских сортов

Сорт, гибрид	Фракции ДНК, мг % на сырую массу				Лаб/стаб ДНК
	лабильная	стабильная	остаточная	всего	
Киевский 139 (% фракций от общей ДНК)	11,04 ± 0,50 (31)	16,87 ± 0,20 (58)	3,60 ± 0,10 (11)	31,5	0,65
Ленинградский скороспелый (% фракций от общей ДНК)	8,00 ± 0,40 (30)	15,51 ± 0,20 (58)	3,30 ± 0,10 (12)	26,81	0,51
Киевский 139 х Ленинградский скороспелый (% фракций от общей ДНК)	10,59 ± 0,10 (36)	15,34 ± 0,40 (53)	3,50 ± 0,10 (12)	29,43	0,69
Valiant (% фракций от общей ДНК)	8,12 ± 0,03 (27)	19,15 ± 0,20 (63)	3,27 ± 0,040 (10)	30,54	0,42
Ленинградский скороспелый (% фракций от общей ДНК)	8,00 ± 0,40 (30)	15,51 ± 0,20 (58)	3,30 ± 0,10 (12)	26,81	0,51
Valiant х Ленинградский скороспелый (% фракций от общей ДНК)	8,03 ± 0,40 (30)	16,31 ± 0,40 (61)	2,42 ± 0,03 (9)	26,76	0,49
Белый налив (% фракций от общей ДНК)	8,65 ± 0,10 (30)	16,07 ± 0,20 (55)	4,46 ± 0,30 (15)	29,18	0,54
Resista (% фракций от общей ДНК)	8,12 ± 0,10 (28)	16,40 ± 0,0,30 (57)	4,12 ± 0,10 (15)	28,64	0,49
Белый налив х Resista (% фракций от общей ДНК)	10,06 ± 0,30 (35)	15,00 ± 0,20 (53)	3,35 ± 0,10 (12)	28,41	0,67
Cavalier (% фракций от общей ДНК)	9,71 ± 0,60 (36)	16,29 ± 0,30 (60)	1,27 ± 0,01 (4)	27,27	0,60
Fanal (% фракций от общей ДНК)	8,67 ± 0,05 (28)	20,15 ± 0,0,50 (65)	2,39 ± 0,10 (7)	31,21	0,43
Cavalier х Fanal (% фракций от общей ДНК)	9,20 ± 0,30 (33)	16,62 ± 0,20 (59)	2,15 ± 0,03 (8)	27,97	0,55

Таблица 2. Содержание фракций ДНК в листьях гибридов хлопчатника и их родительских форм

Родительские формы, гибриды	Фракции ДНК в одной клетке, г. 10^{-12}				Масса клетки, $\times 10^{-9}$	Число клеток, $\times 10^6$
	лабильная	стабильная	остаточная	всего		
М-4	$2,0 \pm 0,03$	$3,4 \pm 0,03$	$0,8 \pm 0,01$	6,2	10,7	24
АК-4-42	$3,8 \pm 0,04$	$7,2 \pm 0,06$	$2,3 \pm 0,03$	13,3	12,8	21
М-4 х АК-4-42	$4,3 \pm 0,10$	$6,1 \pm 0,05$	$3,0 \pm 0,05$	13,4	14,1	19
М-4	$2,0 \pm 0,03$	$3,4 \pm 0,03$	$0,8 \pm 0,01$	6,2	10,7	24
С-460	$1,5 \pm 0,02$	$2,9 \pm 0,04$	$0,6 \pm 0,02$	5,0	7,5	31
М-4 х С-460	$4,2 \pm 0,08$	$5,7 \pm 0,05$	$1,2 \pm 0,04$	11,1	10,9	21

Содержание РНК в митохондриях у всех гибридных форм томата, за исключением Valiant х Ленинградский скороспелый, было несколько выше, чем у родителей. Лучшим гибридом по этому показателю оказался Белый налив х Resista. Самый высокий уровень ДНК был у сортов Белый налив и Valiant (табл. 3).

Характерно, что все гибриды превышали своих родителей по содержанию ДНК: Valiant х Ленинградский скороспелый и Cavalier х Fanal примерно на 30–35 %, а Киевский 139 х Ленинградский скороспелый и Белый налив х Resista – около 10 %. Это позволяет предположить, что у этих форм существенный вклад в общий энергетический потенциал клетки вносит митохондриальная система энергообразования.

Изучение генетического материала хлоропластов показало, что самым высоким содержанием РНК характеризуются сорта Resista и Белый налив, у которых оно было в 1,5–2 раза выше, чем у всех остальных сортов. Нужно отметить, что, несмотря на то, что у гибрида Белый налив х Resista самый высокий уровень РНК, по сравнению с другими гибридами, однако, лишь у этого гибрида он не превышает исходной величины родителей. У всех остальных гибридов происходит увеличение содержания РНК по сравнению с родительскими сортами, причем процент этого увеличения самый высокий у гибрида Киевский 139 х Ленинградский скороспелый (54,4 %).

Определение содержания ДНК в хлоропластах показало, что у всех гибридных форм, за исключением гибрида Cavalier х Fanal, оно занимает промежуточное положение между уровнем, характерным для родительских сортов или тяготеет к уровню лучшего по этому показателю родителя. Содержание хлоро-

пластной ДНК было самым высоким у гибрида Киевский 139 х Ленинградский скороспелый, однако, оно не превышало лучший по этому показателю родительский сорт Ленинградский скороспелый, у которого отмечено наивысшее содержание хлоропластной ДНК среди всех исследованных сортов и гибридов. По содержанию хлоропластной ДНК следует также отдать предпочтение сортам Киевский 139 и Resista, у которых оно было велико и в 1,5–2 раза превосходило уровень этого компонента у других сортов. Лишь при скрещивании сортов Cavalier и Fanal у гибрида отмечается существенное увеличение содержания хлоропластной ДНК по сравнению с родительскими сортами.

Изучение генетического материала митохондрий у хлопчатника показало, что по содержанию и РНК, и ДНК гибриды уступают одной или обоим родительским формам, что свидетельствует о том, что энергообеспечение за счет митохондриальной системы у гибридов хлопчатника более низкое по сравнению с исходными формами.

У гибридных комбинаций хлопчатника наблюдается увеличение хлоропластной РНК. Так, у гибрида М-4 х АК-4042 количество РНК в хлоропластах составило 1446,2 мг %, у родительских форм – 753,5 и 924,6 мг %, соответственно. По содержанию ДНК гибриды либо превышали родительские формы (М-4 х С-460 и М-4 х 152-Ф), либо приближались к лучшему из родителей по этому показателю (М-4 х АК-4-42). Таким образом, у гибридов хлопчатника отмечается в сравнении с родителями активация хлоропластной генетической системы, т.е. в общую энергообеспеченность клетки преимущественно вносит хлоропластная генетическая система.

Таблица 3. Содержание РНК и ДНК в митохондриях и хлоропластах у гибридов томата, хлопчатника и их родительских форм (на сухое вещество цитоплазматических органелл, мг %)

Сорт, образец, гибрид	Митохондрии			Хлоропласты		
	РНК	ДНК	РНК/ ДНК	РНК	ДНК	РНК/ ДНК
Томат <i>Lycopersicon esculentum</i> L.						
Киевский 139	2728,5 ± 16,8	128,9 ± 0,2	21,2	1174,7 ± 5,3	233,6 ± 1,1	5,0
Ленинградский скороспелый	2603,7 ± 23,7	129,2 ± 0,3	20,2	1025,6 ± 6,3	237,6 ± 1,2	3,7
Киевский 139 х Ленинградский скороспелый	3186,7 ± 81,7	142,7 ± 2,6	22,3	1814,2 ± 2,2	271,5 ± 3,6	6,7
Valiant						
Valiant	3181,0 ± 7,0	171,3 ± 1,0	18,6	1288,9 ± 9,3	135,2 ± 0,6	9,5
Ленинградский скороспелый	2603,7 ± 23,7	129,2 ± 0,3	20,2	1025,6 ± 6,3	273,6 ± 1,2	3,7
Valiant х Ленинградский скороспелый	3132,1 ± 113,3	232,2 ± 3,0	13,5	1481,1 ± 6,8	154,8 ± 1,4	9,6
Белый налив						
Белый налив	3019,9 ± 12,2	188,7 ± 1,0	16,0	2382,9 ± 8,0	121,4 ± 1,6	19,6
Resista	3016,5 ± 13,3	154,6 ± 1,2	19,5	3215,5 ± 8,9	256,4 ± 1,5	12,5
Белый налив х Resista	3337,5 ± 23,8	206,4 ± 2,7	16,2	2388,4 ± 9,1	187,5 ± 1,9	12,7
Cavalier						
Cavalier	1918,0 ± 12,0	92,4 ± 0,2	20,8	1558,5 ± 14,9	111,1 ± 2,5	14,0
Fanal	1887,5 ± 7,8	126,2 ± 1,5	15,0	1572,0 ± 8,7	129,9 ± 1,2	12,1
Cavalier х Fanal	3210,1 ± 55,4	166,1 ± 3,1	19,3	2052,8 ± 17,3	214,5 ± 0,8	9,6
Хлопок <i>Gossypium</i> L.						
М-4	1238,7 ± 5,8	60,9 ± 1,6	20,3	753,5 ± 3,2	72,6 ± 0,8	10,4
АК-4-42	838,2 ± 4,9	55,9 ± 1,9	15,0	924,6 ± 4,7	100,1 ± 2,2	9,3
М-4 х АК-4-42	880,9 ± 6,2	58,4 ± 1,2	15,0	1446,2 ± 6,7	99,5 ± 1,2	14,5
М-4						
М-4	1238,7 ± 5,8	60,9 ± 1,6	20,3	753,5 ± 3,2	72,6 ± 0,8	10,4
С-460	1021,2 ± 6,2	53,7 ± 1,5	19,0	659,4 ± 2,5	63,6 ± 1,2	10,4
М-4 х С-460	1016,0 ± 6,8	44,9 ± 1,1	22,6	847,3 ± 3,9	110,4 ± 1,1	7,7
М-4						
М-4	1238,7 ± 5,8	60,9 ± 1,6	20,3	753,5 ± 3,2	72,6 ± 0,8	10,4
152-F	1021,2 ± 6,9	54,0 ± 0,5	18,9	759,0 ± 2,8	111,5 ± 1,4	6,8
М-4 х 152-F	1159,2 ± 8,4	60,9 ± 0,9	19,0	1255,8 ± 9,0	162,8 ± 1,2	7,7

Выводы

У гетерозисных гибридов томата по сравнению с их родительскими формами не отмечено существенных отличий в содержании суммарной ДНК в расчете на сырую массу листа. У гибридных комбинаций хлопчатника отмечается активация синтеза ДНК в клетке листа. Увеличение количества ДНК на клетку, в основном, наблюдается за счет всех фракций, при этом отмечается значительное увеличение лабильной ДНК. Число клеток в расчете на единицу площади поверхности листа уменьшается, что свидетельствует об увеличении размера клеток.

Изучение цитоплазматических генети-

ческих систем у гетерозисных гибридов у томата показало, что у исследуемых гибридов этой культуры отмечается активация синтеза нуклеиновых кислот в митохондриях. Это может указывать на высокую функциональную активность митохондриального генома клетки, что, в свою очередь, способно стать предпосылкой для высокой скорости энергетических и пластических процессов в этих органеллах у гибридных комбинаций. Напротив, у гетерозисных гибридов хлопчатника по сравнению с родителями выше количество генетического материала в хлоропластах, что, вероятно, повышает активность пластических и энергообразующих процессов в них.

Литература

1. Concenzo G., Aspiáz I., Galon L., Ferreira E.A., Freitas M.A.M., Fialho C.M.T., Schwanke A.M.L., Ferreira F.A., Silva A.A. Photosynthetic characteristics of hybrid and conventional rice plants as a function of plant competition // *Planta daninha*. – 2011. – 29, N 4. – P. 793–802.
2. Вайшла О.Б. Факторный анализ показателей фотосинтеза, дыхания и продуктивности у гетерозисных гибридов и родительских линий *Pisum sativum L.* Исследовано в России [Электронный ресурс]. – 2004. – 15. – С. 144–163. – Режим доступа: <http://zhurnal.ape.relarn.ru/articles/2004/015>.
3. Singh B.K., Sharma S.R., Singh B. Heterosis for superoxide dismutase, peroxidase and catalase enzymes in the head of single cross-hybrids of cabbage (*Brassica oleracea var. capitata*) // *J. of Genetics (Indian Academy of Sciences)*. – 2010. – 89, N 2. – P. 217–221.
4. Comarova G., Palić A., Rotari A. Protein polymorphism and heterosis of maize // *Stiinta Agricola*. – 2005. – 2. – P. 3–7.
5. Titok V., Yurenkova S., Khotyleva L. The role of energy metabolism in heterosis formation in plants // *Proceedings of The Fourth International Iran & Russia Conference «Agriculture and Natural Resources»*. – 2008. – P. 418–424.
6. Fujimoto R., Taylor J.M., Shirasawa S., Peacock W.J., Dennis E.S. Heterosis of Arabidopsis hybrids between C24 and Col is associated with increased photosynthesis capacity // *PNAS USA*. – 2012. – 109, N 18. – P. 7109–7114.
7. Dahal D., Mooney B.P., Newton K.J. Specific changes in total and mitochondrial proteomes are associated with higher levels of heterosis in maize hybrids // *Plant. J.* – 2012. – 72, N 1. – P. 70–78.
8. Алиев Р.Т. Особенности генетического аппарата клетки и прогнозирование гетерозиса у гибридов растений: автореф. дис. на соискание наук. степени докт. биол. наук. – Харьков, 1989. – 48 с.
9. Bao J.Y., Lee S., Chen C., Zhang X.Q., Zhang Y., Liu S.Q., Clark T., Wang J., Cao M.L., Yang H.M., Wang S.M., Yu J. Serial analysis of gene expression study of a hybrid rice strain (LYP9) and its parental cultivars // *Plant Physiol.* – 2005. – 138. – P. 1216–1231.
10. Конарев В.Г., Тютюрев С.Л. Методы биохимии и цитохимии нуклеиновых кислот растений // *Научные труды ВИР*. – Л., 1970. – С. 5–202.

MAMMADOVA A.D., ALIYEV R.T.

*Institute of Genetic Resources of Natl. Acad. Sci. of Azerbaijan,
Azerbaijan, AZ 1106, Baku, Azadlig Ave., 155, e-mail: afet.m@mail.ru*

INTENSITY OF SYNTHESIS OF THE NUCLEIC ACIDS IN CELL HETEROTIC HYBRIDS TOMATO AND COTTON

Aims. The study of changes in the content of nucleic acids in the cell of heterotic plants in comparison with parental forms. **Methods.** Mitochondria and chloroplasts were isolated by the differential centrifugation. Nucleic acids content in were determined by the method described in the works of V.G. Konareva and S.L. Tyutereva (1970). **Results.** DNA content per one cell in leaf's tissue in all hybrid combinations of cotton was higher than in parental varieties. The number of cells per unit of square of leaf surface was lesser, while the size of one cell was larger. In heterotic hybrids both mitochondrions and chloroplasts may contribute to increasing of cell energy-supply. **Conclusions.** One can suppose that in case of increased load on nuclear, mitochondrial and chloroplast genetic system of plant cell, the hybrid, which has raised energy-supply for biosynthesis of plastic matter, develops the high heterosis effect.

Key words: heterosis, RNA, DNA, cell, mitochondria, chloroplasts.

НАСЛЕДУЕМОСТЬ И ИЗМЕНЧИВОСТЬ УРОВНЯ СОДЕРЖАНИЯ И ВЫХОДА МОЛОЧНОГО ЖИРА КАК СЕЛЕКЦИОННЫХ ПРИЗНАКОВ В СТАДАХ ЧЕРНО-ПЕСТРОГО СКОТА

Известно, что один из основных показателей качества молока – жир – изменяется под влиянием различных факторов, и прежде всего генетических [1, 2].

Так изучение продуктивности женских ♀ предков маточного поголовья коров показало, что средний удой матерей за лучшую лактацию составил 6762 кг молока с содержанием жира 4,30 %, а матерей матерей – 6778 кг и 4,16 % [3].

Подбор животных по степени их превосходства по содержанию жира в молоке матерей является эффективным от лучших коров получают лучших дочерей, а от худших матерей соответственно худших дочерей [4, 5].

Коэффициенты наследуемости показателей содержания жира по матери колеблются в разных стадах, но все же имеют достаточно высокие корреляционные значения – от 0,32 до 0,64, что определяется высоким уровнем интенсивности и целенаправленности селекционной работы по показателю «жирномолочность» [5].

В то же время многофакторный дисперсионный анализ показывает, что на передачу потомству такого признака, как жирность молока, оказывают влияние наследственные свойства отца [1]. Отдельные быки-производители существенно влияют на улучшение, или ухудшение генетического потенциала скота. И одним из методов совершенствования и повышения продуктивности молочных стад является своевременная оценка и использование в случной сети проверенных быков-улучшателей. Из 85 оцененных быков улучшателями по содержанию жира в молоке оказалось 17,1 %, что также свидетельствует о недостаточной полноте изученности этого вопроса.

Материалы и методы

Анализ данных показателей выполнен на животных, которые содержались в хозяйствах преимущественно Харьковской области. Технологии содержания в данных хозяйствах широкого спектра: от традиционно привязного с доением в доильные ведра, до беспривязного на

глубокой подстилке с доением в молочном блоке.

В качестве анализируемых факторов использовались матери и быки-производители, а в качестве зависимых факторов – показатели содержания жира в молоке коров и выхода молочного жира.

Расчеты проводили с помощью однофакторного дисперсионного анализа. Для этого использовали процедуру общей линейной модели (General Linear Model – GLM General Factorial) из компьютерного пакета статистических программ SPSS 12.0. По содержанию жира в молоке и выходу молочного жира определяли стандартные статистические показатели: количество (n), среднее арифметическое (M), ошибку среднего арифметического (m), среднеквадратическое отклонение (σ), а также верхнюю и нижнюю границы 95%-ного доверительного интервала. Определяли степени влияния фактора «отец», на содержание жира в молоке коров и на выход молочного жира. Кроме того, определяли уровень достоверности разницы между средними показателями содержания жира по градам согласно с методикой Н.А. Плохинского [6].

Результаты и обсуждение

При изучении зависимостей между содержанием жира матерей и дочерей установлено, что максимальная связь имеет место при рассмотрении среднего содержания жира за все имеющиеся лактации в молоке матерей и дочерей (рис. 1). При этом коэффициент корреляции был достоверным ($P > 0,999$) и составил $r = 0,28$. Наиболее приемлемо данную зависимость описывала линейная функция $y = 2,81 + 0,29 \cdot x$.

Данная формула описывала 7,7 % изменчивости содержания жира дочерей при стандартной ошибке предсказания $SE = 0,28$ %.

Установлено, что при повышении содержания жира в молоке у матери на 1 % можно ожидать увеличения содержания жира в молоке дочери на 0,29%.

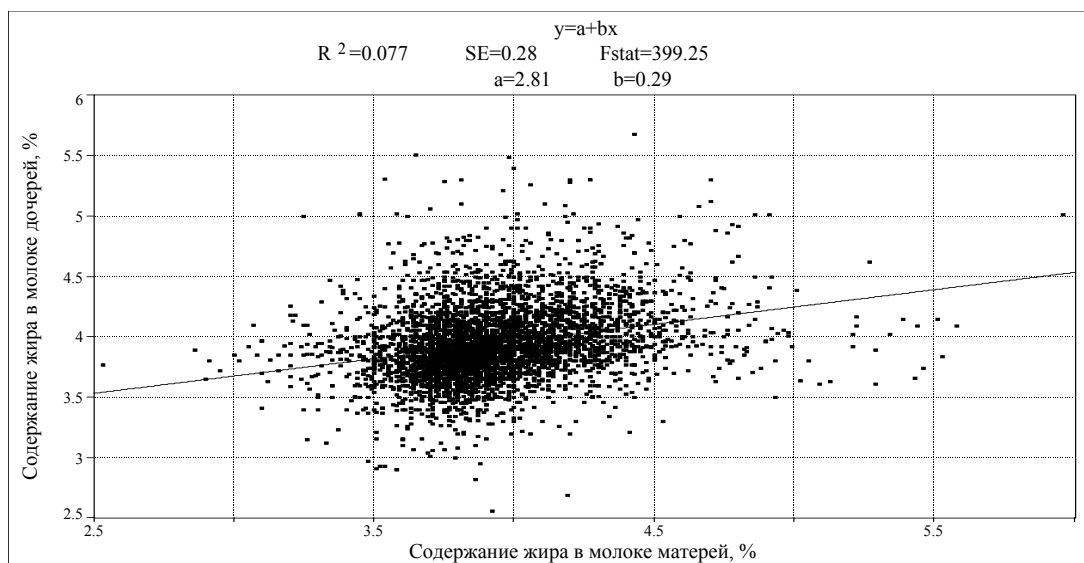


Рис.1. Зависимость содержания жира в молоке дочерей от содержания жира в молоке матерей, %

В случае учета среднего по всем лактациям содержания жира коэффициент наследуемости этого показателя составляет 0,56.

Степень влияния фактора «Отец» на содержание жира в молоке составила 0,127, а на выход молочного жира 0,196 при высокой статистической достоверности ($P > 0,999$).

По данным наших исследований степень влияния данного фактора на содержание жира в молоке составила 0,131, а на выход молочного жира 0,207 при $P > 0,999$. По всем показателям изменчивости потомство разных быков существенно различается.

Самыми перспективными являются быки Тохтаан_Исо_88, Анис_3491, Алекс_12824, Вуд_1703660, Сеул_1715628129, Ред_1713015/2563, Никель_387680/90, Север_1701, Антей_7237, Атлант_8375. Дочери этих производителей характеризуются высокими показателями как выхода, так и содержания жира.

Исходя из проведенного анализа целесообразно при составлении подбора и заказных спариваний использовать быков дочери которых сочетают как высокое содержание жира в молоке, так и высокий выход молочного жира.

Результаты наших исследований показали и подтвердили, что проблема наращивания поголовья крупного рогатого скота и воспроизводства стада остается по-прежнему очень сложной и состоит из многих

составляющих также сложных и взаимосвязанных проблем.

С этой целью мы использовали многолетние материалы учета данных и очень большие статистические выборки, после обработки которых даже небольшая разница между сравниваемыми группами или учитываемые показателями становится с высокой степенью достоверной. Мы сосредоточили внимание на отдельных составляющих, влияющих на индивидуальное развитие телочки с момента ее зачатия и до окончания первой лактации с экскурсом в пожизненный продуктивный период коровы, с акцентом на установление корреляционных связей и возможное прогнозирование ожидаемых результатов будущей молочной продуктивности.

Основные исследования выполняли методом группировки животных по каждому изучаемому признаку с последующей биометрической обработкой цифрового материала. Эффективность выращивания ремонтных телок определяли методом вычисления количества дополнительно произведенного молока от каждой группы первотелок, выделенных согласно живой массы при рождении.

Также для всесторонней оценки полученных результатов исследований применяли специфические индексы и коэффициенты.

При этом под понятием «породность» мы подразумевали генерацию поколений, «кровности» – наличие унаследованных типовых для породы признаков, коэффициент молочности = удой: живую массу \times 100; устойчивость лактации = удой: (высший суточный удой \times количество дне лактации); коэффициент полноты реализации молочности = удой первотелки: научная версия потенциального удоя этой породы (4500 кг); удой первотелки: версия потенциала удоя первотелок по ВНТП/05 (4200 кг).

Коэффициент полноты реализации массивности = живая масса первотелки: живую массу по стандарту породы.

Общая закономерность сводится к тому, что с увеличением живой массы коровы повышается молочная продуктивность с существованием для каждой породы оптимальной живой массы, при которой достигается наиболее высокий удой, например, черно-пестрой – 600–700 кг. Известно, что, как правило, все коровы-рекордистки – крупные животные, а от мелкой коровы практически невозможно получить высокий удой.

В этой связи оптимальными параметрами формирования молочной коровы с удоем 5000 кг можно считать: среднесуточный прирост от рождения до первого отела – 680 г, живая масса в возрасте 6 месяцев – 170 кг, в 12 месяцев – 290 кг, при осеменении – 380–400 кг, первотелки – 500–530 кг. В среднем увеличение живой массы коров на каждые 10 кг (до оптимального!) приводит к повышению удоя за лактацию на 100–120 кг и более. По черно-пестрой породе до 80% и более коров наивысшие удои от них получают в 3–4-ю лактации. В то же время известно, что высокая продуктивность в значительной степени зависит от условий выращивания телок, где каждый возрастной период имеет свои специфические особенности, связанные с потребностями растущего организма и способами их реализации.

Проведенные нами исследования также касаются вопросов определения связи показателей развития телок с генетическим потенциалом стада и возможностью его реализации в процессе селекции и технологии. Продуктивные качества коров-рекордисток заводского стада украинской черно-пестрой молочной породы комплекса «Кутузовка» за последнюю законченную лактацию составляют: удой за 305 дней лактации – 7686 кг, % жира – 3,34, молочного жира – 254,6 кг, % белка – 3,05,

– молочного белка – 235,7 кг, средняя живая масса по этой выборке ($n = 50$) = 687,2 кг, коэффициент молочности – 1132. Удой от этих рекордисток на 2621 кг превышает средний удой (5065 кг) по стаду и на 3961 кг, чем удой первотелок по опытным группам наших исследований, однако в молоке рекордисток содержится меньше жира (-0,41 % абсолютных) и белка, но живая масса на 5,2 % больше и коэффициент молочности на 45,9 %, чем средний показатель по стаду (по первотелкам наших опытов коэффициент молочности – 823).

На продуктивное долголетие коров основное влияние в общей дисперсии факторов оказывает возраст проявления наивысшего удоя ($n_2 = 64$ –69 %) и быки-производители ($n_2 = 31$ –38%), то же самое касается пожизненного удоя коров, $n_2 = 66$ –70 % и 33–39 %. В наших исследованиях также впервые из всех степенных регрессий установлено, что наилучшим образом зависимость жирности (%) молока (q) от продолжительности эмбрионального периода развития телочки (Z) описывается математической моделью уравнения второй степени по Z : $q = 0,00032269 Z^2 - 0,170188 Z + 26,1273$, что отображается рис. 2, 3 (приложение). Это регрессия обеспечивает значение коэффициента детерминации $R^2 = 0,611$, со стандартной ошибкой регрессии $SR = 0,01$, при фактическом значении F -критерия Фишера 3,93 и при недостоверности полученного уравнения ($p > 0,05$).

Уравнение регрессии:

$$y = -1,19z^2 + 9,32x^2 + 716,63z - 434,75x - 98919,01$$

Коэффициент детерминации: $R^2 = 0,998$.

Стандартная ошибка регрессии: $S_R = 9,86$.

Значимость регрессии по Фишеру: $P > 0,99$.

$$F_{fact} := 219.1628812$$

$$F_{theor95} := 19.25$$

$$F_{theor99} := 99.25$$

$$F_{theor999} := 999.25$$

Уравнение регрессии:

$$z = 0,18y^2 + 0,079x^2 - 6,49y - 41,67x + 5610,59$$

Коэффициент детерминации: $R^2 = 0,994$

Стандартная ошибка регрессии: $S_R = 0,80$.

Значимость регрессии по Фишеру: $P > 0,95$.

$$F_{fact} := 78.66807966$$

$$F_{theor95} := 19.25$$

$$F_{theor99} := 99.25$$

$$F_{theor999} := 999.25$$

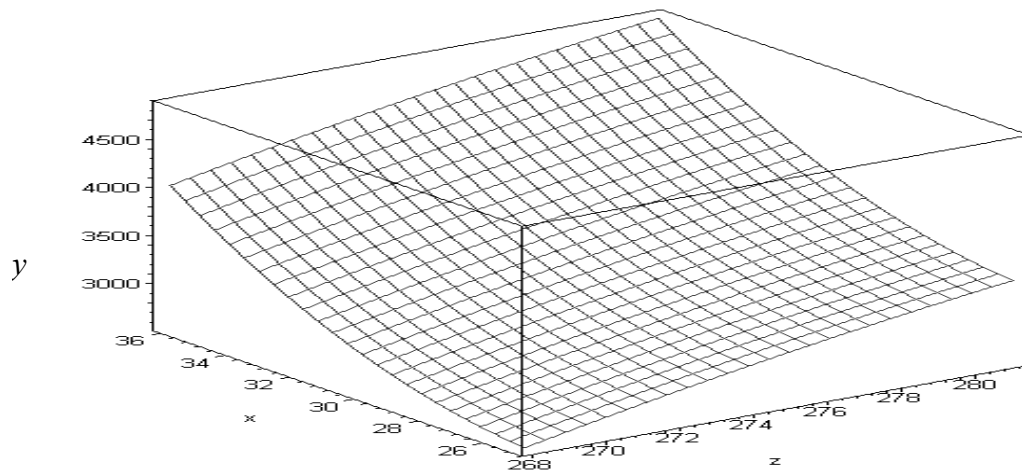


Рис.2. Зависимость удоя молока по первой лактации y от живой массы при рождении x и от продолжительности эмбрионального периода z

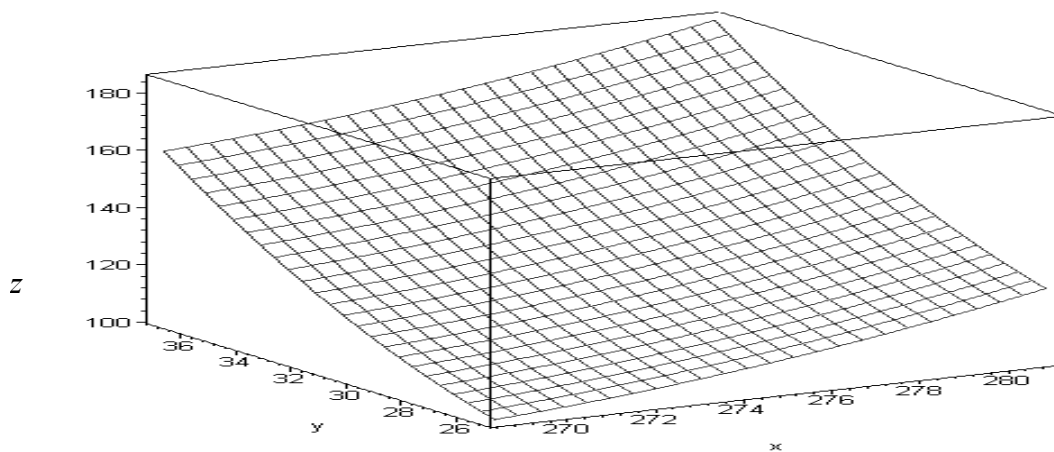


Рис. 3. Зависимость молочного жира z от продолжительности эмбрионального периода x и от значения живой массы при рождении y

Выводы

При повышении содержания жира в молоке матери на 1 % можно ожидать роста этого показателя у дочерей на 0,29 %. Корреляционная связь между выходом молочного жира матерей и дочерей достигает $r = 0,28$ ($P > 0,999$). Коэффициенты наследуемости содержания жира в молоке и выхода молочного жира равны соответственно 0,56 и 0,72.

Наиболее значимым из исследованных генетическим фактором является отец. Посредством данного фактора возможно описать 12,7 % изменчивости содержания жира в молоке и 19,6 % изменчивости выхода молочного жира. Существенны также совместные влияния фактора «отец» с другими:

«отец * год отела» ($\eta^2 = 0,087$ на содержание жира и $\eta^2 = 0,11$ на выход молочного жира), «отец * стадо» ($\eta^2 = 0,065$ и $\eta^2 = 0,142$ соответственно).

В условиях многолетнего стабильного круглогодового однотипного кормления коров у них рождаются телочки с живой массой 29–43 кг ($M = 30,3$ кг) и их дальнейший рост осуществляется по закономерностям прямолинейной зависимости показателя живой массы при рождении (по уравнению регрессии $X = a + bt$) и со скоростью роста плода, показателями живой массы в 3; 6; 12 и 18 месяцев, в возрасте первого плодотворного осеменения и при отеле, а также с показателем уровня молочной продуктивности первотелки

($R^2 = 0,933$; $SR = 5,41$; $p < 0,001$) при отсутствии синхронной связи с показателем процента жира в молоке ($p < 0,05$) и вне зависимости от сезона года.

Наиболее высоким потенциалом молочной продуктивности обладают телочки, скорость роста которых в эмбриональный период онтогенеза превышала 120 г, они характеризовались лучшими показателями роста и развития в постнатальный период, большей

живой массой при рождении (на 3–10,7 кг) и при первом плодотворном осеменении (на 16–35 кг), а также при отеле (на 28–63 кг), они на 1,3–2,9 месяца раньше оплодотворились, коровы-первотелки характеризовались более высокой молочной продуктивностью (4318 ± 24 кг) и дополнительным получением 14,6–32,1 кг молочного жира. Реализация 405–923 кг молока дала возможность дополнительно получить 340–790 грн. на одну корову.

Литература

1. Ємець З.В., Маменко О.М. Генетическі аспекти селекції скота по жирномолочності і виходу молочного жиру. Збірник наукових праць НАНУ України /Фактори експериментальної еволюції організмів. – К.: Логос, 2010. – 8. – С. 330–334.
2. Ємець З.В. Показники вмісту жиру в молоці корів та виходу молочного жиру нових українських молочних порід. Збірник наукових праць ХДЗВА / Підвищення продуктивності сільськогосподарських тварин. – Харків. – 2010. – 20 (2). – С. 235–238.
3. Подпалая Т.В. Результаты использования голштинского скота // Вопросы развития Крыма. – 2000. – С. 8.
4. Васильева Е.Н., Бойков Ю.В. Пути повышения эффективности подбора в молочном скотоводстве // Современные методы селекции молочного скота: Сб. науч. тр. / ВНИИРиГ животных. – Ленинград, 1981. – № 31. – С. 49–58.
5. Чекменева Н.Ю. Влияние некоторых факторов на эффективность отбора по матерям. // Бюллетень ВНИИРиГ животных. – Ленинград, 1985. – Вып. 83. – С. 20–22.
6. Плохинский Н.А. Биометрия. – М.: Лен. горы, 1969. – 2-е изд. – 6 с.

MAMENKO A.M., YEMETS Z.V., ANTONENKO S. F.

Kharkov state zooveterinary Academy, The Ministry Of Agrarian Of Ukraine, Ukraine, 62341, Kharkov, Small Danilovka, e-mail: zoya_emez@mail.ru

HEREDITY AND VARIABILITY TO THE CONTENT AND OUTPUT OF MILK FAT AS SIGNS OF BREEDING HERDS OF BLACK-AND-WHITE CATTLE

Aims. According to some researchers, one of the main quality of the show-of-milk – fat – changed under the influence of various factors, the main of which are genetic. **Methods.** Laboratory of physico-chemical tests of an experimental material with use of the method of atomic-absorption spectrophotometry AAS-30 (Carl Zeiss, Jena), held – biometric processing of the received results. **Results.** It is established that increasing the fat content of the milk of the mother at the 1 % growth can be expected to fat content in milk daughter 0.29 %. The degree of influence of the factor «Father» on the fat content in milk amounted to 0.127, and the output of milk fat 0,196 at high statistical reliably-STI ($P > 0.999$). **Conclusions.** When increasing the fat content in the milk of the mother of 1% can be expected growth of this indicator for the daughters of 0.29 %. Correlation between exposure-house milk fat mothers and daughters reaches $r = 0.28$ ($P > 0.999$). Coefficients " you heritability of fat content in milk and milk output fat are respectively 0,56 and 0.72. The most significant of the genetic factor is the father. By this factor may describe 12.7 % of the variance of with-holding of fat in milk and 19.6 % of the variance of output of milk fat. There твенны joint influence of the factor «father» to the other: «the father year calving» ($\eta^2 = USD 0.087$ on the fat content and $\eta^2 = 0.11$ per output of milk fat), «the father hundred-up» ($\eta^2 = 0.065$, and $\eta^2 = 0.142$ respectively).

Key words: milk of cows, genetically, the reliability of the impact, mother, father.

УДК 633.111: 577.21

МОРГУН Б.В.^{1, 2}, ЧУГУНКОВА Т.В.¹, ЛЯЛЬКО І.І.¹, ВЕЛИКОЖОН Л.Г.¹, СТЕПАНЕНКО А.І.²

¹ Інститут фізіології рослин і генетики НАН України,

Україна, 03022, м. Київ, вул. Васильківська, 31/17, e-mail: bmorgun@gmail.com

² Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України,

Україна, 03680, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 148

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНА ІДЕНТИФІКАЦІЯ ТА ЦИТОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ СОРТІВ ОЗИМОЇ М'ЯКОЇ ПШЕНИЦІ З ПШЕНИЧНО-ЖИТНЬОЮ ТРАНСЛОКАЦІЄЮ

В Україні озима пшениця є провідною зерновою культурою, тому підвищення її стійкості до біотичних та абіотичних чинників, збільшення продуктивності рослин становить одну із важливих проблем. Як відомо, пшениця має один із найбільш складних геномів, розшифровка якого триває і досі [1]. Геном гексаплоїдної м'якої пшениці представлений одразу трьома схожими, але не ідентичними комплексами генів і фактично є комбінацією трьох незалежних геномів (A, B, D), кожен із яких походить від одного з диких предків сучасної пшениці. Слід зазначити, що різноманіття власного комплексу генів м'якої пшениці є недостатнім для вирішення означених проблем, тому її залучають до віддаленої гібридизації. Серед сортів, ліній та іншого селекційного матеріалу м'якої пшениці, що містить гени, одержані в результаті інтрогресивної гібридизації, особливе місце займають форми з пшенично-житніми транслокаціями. Жито ($2n = 2x = 14 RR$) є одним із донорів генів стійкості до різних патогенів (*Lr 26*, *Vr 9*, *Vr 10*, *Sr 27*, *Sr 31*, *Pm 8*, *Pm 17*, *Gb 2*, *Gb 6*). Рослини пшениці з житньою транслокацією можуть бути більш посухостійкими, з підвищеною адаптаційною здатністю, у них збільшується врожайність, вміст білка в зерні [2, 3]. У пшениці [4] описано понад 68 різноманітних транслокацій, які несуть гени стійкості до хвороб та шкідників. Серед них особливе господарське значення мають лише п'ять, у тому числі й пшенично-житня транслокація. Поширення одержали сорти м'якої пшениці, що містять пшенично-житню транслокацію 1BL.1RS, у меншій мірі – транслокацію 1AL.1RS. Для ефективного дослідження генофонду пшениці, а також споріднених видів і родів рослин при інтрогресивній гібридизації достатньо широко використовують молекулярне ДНК-маркування геномів [5, 6]. Для характеристики рослинного матеріалу з пшенично-житніми транслокаціями впроваджують також класичні методи

цитогенетичного аналізу. Дослідження поведінки хромосом в мейозі дозволяє визначати наявність чужорідного матеріалу в геномах інтрогресивних сортів пшениці, а також рівень їх цитологічної стабільності. Вважається, що для стабільних сортів нормою у профазі першого мейотичного поділу є наявність 21 бівалента, тетради – без порушень. Стабільність генома інтрогресивних форм обумовлена компенсаторною здатністю хромосом, що залучені до рекомбінаційних процесів [7]. Метою нашої роботи була розробка методів молекулярно-генетичного маркування геномів та дослідження мейозу у сортів пшениці для визначення пшенично-житньої транслокації.

Матеріали і методи

Досліджували сорти озимої м'якої пшениці Альбатрос одеський, Зимоярка, Фаворитка, Крижинка, Золотоколоса та Смуглянка. Виділення ДНК із рослинного матеріалу проводили СТАБ-методом та використовуючи набір реагентів «ДНК-сорб-С» («AmpliSens», Росія) згідно стандартного протоколу. Наявність пшенично-житньої транслокації визначали за допомогою мультиплексної полімеразної ланцюгової реакції, використовуючи маркери до локусів *Xrems 1303* та *Sec 1* [8]. Для визначення хромосомної локалізації пшенично-житньої транслокації (1AL.1RS або 1BL.1RS) у сортів пшениці використовували специфічні пари праймерів до мікросателітного локуса SCM 9 жита та праймери до референтного гену пшениці *TaTm20*. Продукти ампліфікації розділяли електрофоретично у 2,0 % агарозному гелі з візуалізацією в ультрафіолетовому світлі за допомогою етидій броміду як фарбувального реагента. Для дослідження мейозу у сортах пшениці відбирали колоси, що знаходились у трубці, фіксували у оцтовому алкоголі (1 : 3), фарбували у 2 % оцетокарміні та готували тимчасові давлені препарати за загальноприйнятою методикою. У кожному варіанті досліджували по 10–15 колосів, 12–20

пиляків в одному колосі. Наявність чужорідного генетичного матеріалу встановлювали за асоціаціями хромосом в М1мейоза та на стадії Т2. Для кожного сорту вивчали в середньому по 15–25 чітких метафазних пластинок. Дослідження тетрад мікроспор проводили на 150–200 клітинах одного колоса.

Результати та обговорення

Для ідентифікації пшенично-житніх транслокацій за допомогою молекулярно-генетичного маркування геномів було проаналізовано 5 сортів озимої м'якої пшениці селекції ІФРГ НАН України. Сорт Альбатрос одеський (без транслокації) використовували в якості контролю. Першим етапом роботи було молекулярно-генетичне дослідження сортів пшениці на наявність транслокованого короткого плеча хромосоми жита 1RS. Для цього проводили мультиплексну полімеразну ланцюгову реакцію з використанням праймерів

до референтного гену пшениці *TaTm20* (934 п.н.) та локусів *Xrems 1303* (290 п.н.) і *Sec 1* (400 п.н.), які є маркерами до короткого плеча першої хромосоми жита (рис. 1, 2).

Наявність амплікону довжиною 290 п.н. вказує на присутність житньої транслокації у геномі пшениці, а амплікон довжиною 400 п.н. визначає локус *Sec 1*, що відповідає за синтез житніх білків – ω-секалінів (рис. 2).

Аналіз електрофореграм свідчить про відсутність пшенично-житньої транслокації у сортів Альбатрос одеський та Зимоярка і її наявність у інших чотирьох досліджених сортів. За допомогою молекулярно-генетичного маркування локусу *SCM9* жита визначали хромосомну локалізацію транслокованого плеча 1RS. На рис. 3 показано розділення сортів пшениці за наявністю у них 1AL.1RS (226 п.н.) або 1BL.1RS (206 п.н.) транслокації.

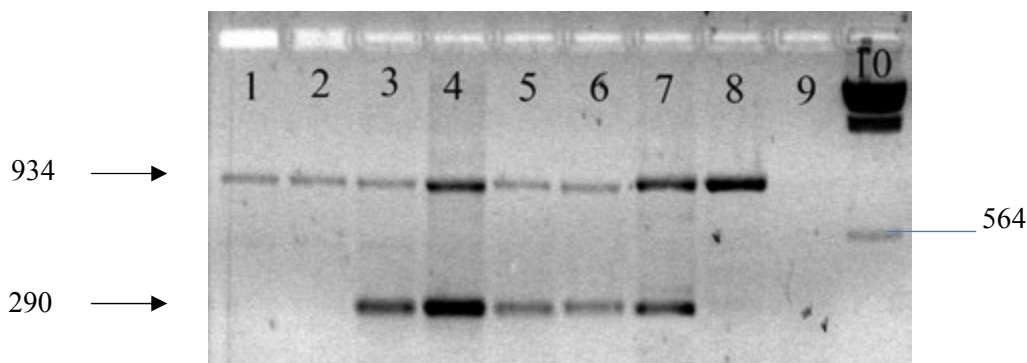


Рис. 1. Електрофореграма продуктів ампліфікації загальної ДНК сортів м'якої пшениці із праймерами до гену *TaTm20* та локусу *Xrems 1303*: 1 – Альбатрос одеський; 2 – Зимоярка; 3 – Фаворитка; 4 – Крижинка; 5 – Золотоколоса; 6 – Смуглянка; 7 – контроль з транслокацією; 8 – контроль без транслокації; 9 – контроль – ТЕ-буфер; 10 – маркер ДНК л/*Hind III*

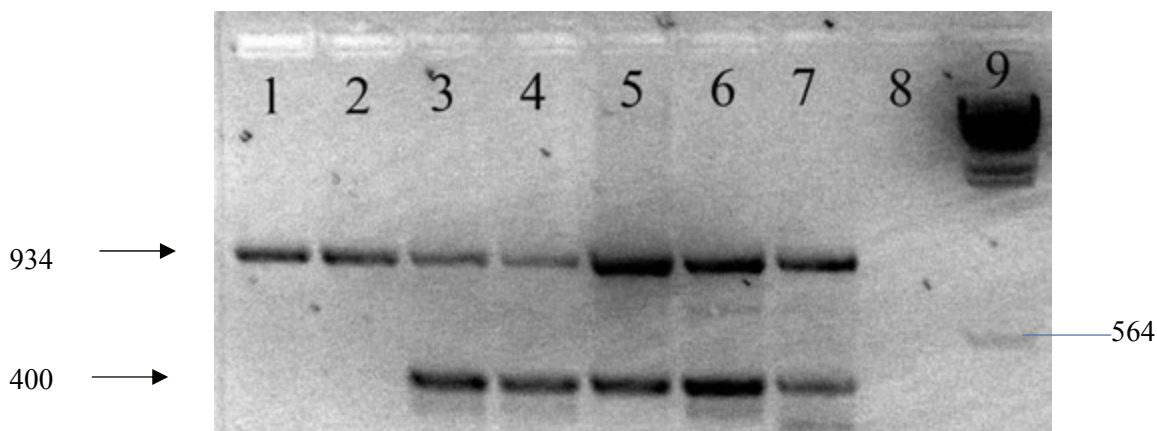


Рис. 2. Електрофореграма продуктів ампліфікації загальної ДНК сортів м'якої пшениці із праймерами до гену *TaTm20* та локусу *Sec 1*: 1 – Альбатрос одеський; 2 – Зимоярка; 3 – Фаворитка; 4 – Крижинка; 5 – Золотоколоса; 6 – Смуглянка; 7 – контроль з транслокацією; 8 – контроль – ТЕ-буфер; 9 – маркер ДНК л/*Hind III*

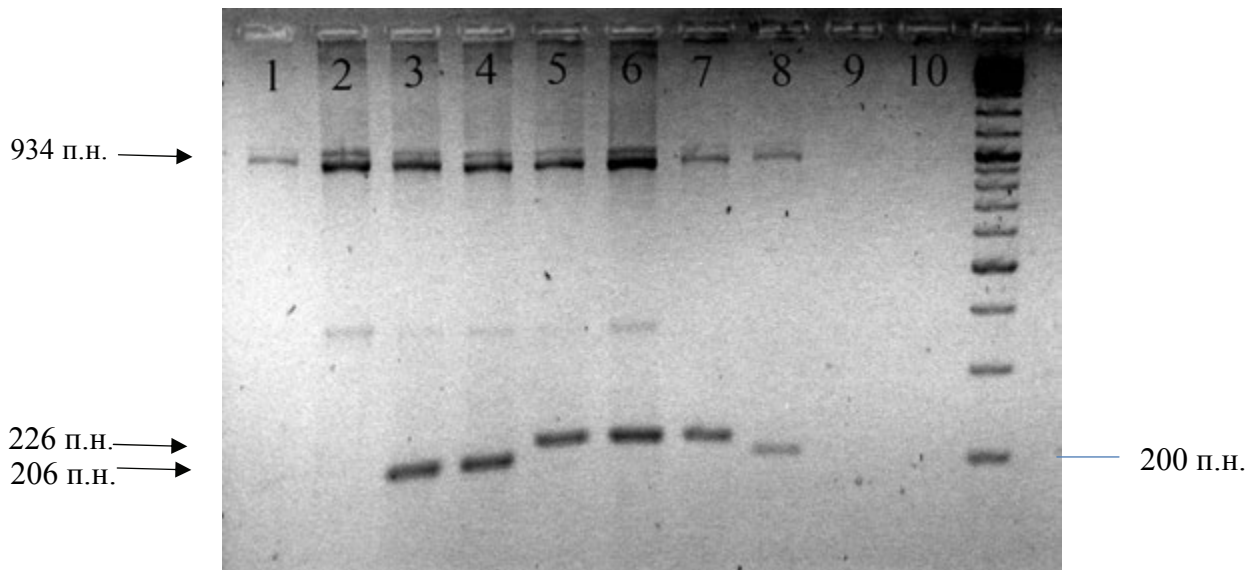


Рис. 3. Електрофореграма продуктів ампліфікації загальної ДНК пшениці на визначення хромосомної локалізації 1AL- та 1BL-транслокацій: 1– Альбатрос одеський; 2 – Зимоярка; 3 – Крижинка; 4 – Фаворитка; 5 – Золотоколоса; 6 – Смуглянка; 7 – контроль з транслокацією 1AL.1RS; 8 – контроль з транслокацією 1BL. 1RS; 9 – контроль без транслокацій; 10 – контроль – TE-буфер; 11 – маркер ДНК LadderMix

За результатами аналізу електрофореграми (рис. 3) сорти Крижинка і Фаворитка, що містять амплікони у 206 п.н., є носіями пшенично-житньої транслокації у першій хромосомі пшениці геному В (1BL.1RS), а сорти Золотоколоса і Смуглянка, у яких виявлено амплікон 226 п.н. – транслокації у першій хромосомі пшениці геному А (1AL. 1RS).

Вивчення характеру кон'югації хромосом у метафазі I мейозу сортів Золотоколоса, Колумбія, Смуглянка, Фаворитка засвідчив присутність в їх геномах чужорідного генетичного матеріалу, який може бути представлений як транслокаціями, так і заміщеннями [9, 10]. У всіх зазначених сортів в мейозі на стадії M1 спостерігали відкриті і закриті бівалентні асоціації, наявність одного-трьох унівалентів. Крім того, на стадіях анафази першого та другого ділень мейозу спостерігали клітини з мостами, фрагментами, затримку у розходженні до полюсів унівалентних

хромосом. У сортів Золотоколоса, Фаворитка та Колумбія вищі асоціації хромосом, головним чином, були представлені закритими та відкритими бівалентами – 21^{II}_{3} , $20^{\text{II}}_{3}+1^{\text{II}}_{\text{B}}$, $19^{\text{II}}_{3}+2^{\text{II}}_{\text{B}}$ іноді $18^{\text{II}}_{3}+3^{\text{II}}_{\text{B}}$, зустрічалися клітини з унівалентами, частота яких була на рівні 0,5–1,7%. Це значно нижче норми, яка характерна для стабільних інтрогресивних сортів.

Висновки

Таким чином, застосування методу полімеразної ланцюгової реакції дозволило ідентифікувати пшенично-житню транслокацію у сортах пшениці, що свідчить про можливість використання ДНК-технологій у селекційно-генетичних програмах. Виходячи з даних, отриманих за використання цитологічного аналізу, можна зробити висновки про те, що сорти Золотоколоса, Фаворитка, Колумбія, відносяться до цитологічно стабільних інтрогресивних сортів, які несуть пшенично-житні транслокації.

Література

1. Brenchley R., Spannagl N., Pfeifer M. et al. Analysis of the bread wheat genome using whole – genome shotgun sequencing // Nature. – 2012. – 491. – P. 705–710.
2. Boros D., Lukaszewski A.J., Aniol A., Ochodzki P. Chromosome location of genes controlling the content of dietary fibre and arabinoxylans in rye // Euphytica. – 2002. – 128. – P. 1–8.
3. Singh N.K., Shepherd K.W., McIntosh R.A. Linkage mapping of genes for resistance to leaf, steam and stripe rust and secalins on the short arm of rye chromosome 1R // Theor. Appl. Genet. – 1990. – 80. – P. 609–616.
4. Friebe B., Raupp W.J., Gill B.S. Alien genes in wheat improvement. – Wheat in Global Environment // Proc. 6-th Intern. Wheat Conference, 5–9 June, Budapest, Hungary. – 2001. – P. 709–720.

5. Степаненко А.И., Моргун Б.В., Чугункова Т.В., Адаменко Н.И., Великожон Л.Г. Скринінг сортів озимої м'якої пшениці на наявність пшенично-житньої транслокації за ДНК-маркерами // Вісник укр. товариства генетиків і селекціонерів. – 2012. – 10, № 2. – С. 311–3186.
6. Моргун Б.В., Степаненко А.И., Чугункова Т.В. Молекулярно-генетический анализ сортообразцов озимой пшеницы, выращенных в различных экологических зонах Украины // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2013. – 15, № 3 (4). – С. 1390–1393.
7. Бадаева Е.Д., Прокофьева З.Д., Билинская Е.Н. и др. Цитогенетический анализ устойчивых к бурой ржавчине и мучнистой росе гибридов, полученных от скрещивания мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L., AABBDD) с пшеницами группы *Timopheevii* (A¹A¹GG) // Генетика. – 2000. – 36, № 12. – С.1663–1673.
8. Сиволап Ю.М., Чеботар С.В., Сударчук Л.В. Детекція 1R_S.1A_L, 1R_S.1B_L та модифікованої транслокації за 1R_S хромосомою у селекційних форм м'якої пшениці. Методичні рекомендації. – Одеса. – 2011. – 13 с.
9. Гордеева Е.И., Леонова И.Н., Калинина Н.П., Санина Е.А., Будашкина Е.Б. Сравнительный цитологический и молекулярный анализ интрогрессивных линий мягкой пшеницы, содержащих генетический материал *Triticum timopheevii* Zhuk. // Генетика. – 2009. – 45, № 12. – С. 1616–1626.
10. Мощный И.И., Чеботарь С.В., Сударчук Л.В., Галаев А.В., Сиволап Ю.М. Идентификация замещения (1B)1R и транслокации 1BL.1RS у интрогрессивных линий озимой пшеницы цитологическим и молекулярно-генетическим методами // Вавилов. ж. ген. и сел. – 2012. – 16, № 1. – С. 212–222.

MORGUN B.V.^{1, 2}, **CHUGUNKOVA T.V.**¹, **LYALCO I.I.**¹, **VELYKOZHON L.G.**¹, **STEPANENKO A.I.**²

¹ *Institute of Plant Physiology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine, Ukraine, 03022, Kyiv, Vasylykivska str., 31/17*

² *Institute of Cell Biology and Genetic Engineering National Academy of Sciences of Ukraine, Ukraine, 03680, Kyiv, Akademika Zabolotnogo str., 148*

THE MOLECULAR-GENETIC IDENTIFICATION AND CYTOLOGY PECULIARITIES OF VARIETIES OF WINTER WHEAT WITH WHEAT-RYE TRANSLOCATION

Aims. To reveal the presence of wheat-rye translocations in the genome of varieties of soft winter wheat by PCR-analysis using primers to locus Xrems 1303 and ω-secalin located in the short arm of chromosome 1R of rye and cytological methods. **Methods.** DNA analysis by polymerase chain reaction and electrophoretic determination of amplification products. The methods of meiosis analysis. **Results.** Varieties of soft winter wheat with wheat-rye translocation were discovered. **Conclusions.** Specific primers to locus located in chromosome arm 1RS of rye can be used to analyze the presence in wheat wheat-rye translocation. The presence of wheat-rye translocation are confirmed by cytological analysis.

Key words: *Triticum aestivum* L., DNA markers, PCR-analysis, multiplex-PCR, rye-wheat translocation, cytological methods.

УДК 633.854.54:631.527.823

ПОЛЯКОВ В.А.¹, **ЛЯХ В.А.**²

¹ *Институт масличных культур НААН,*

Украина, 70417, Запорожский район, Запорожская область, пос. Солнечный, ул. Институтская, 1, e-mail: eradan_90@mail.ru

² *Запорожский национальный университет,*

Украина, 69600, г. Запорожье, ул. Жуковского, 66

НАСЛЕДОВАНИЕ ПРИЗНАКОВ КОРОБОЧКИ МЕЖВИДОВЫМИ ГИБРИДАМИ F₁ ЛЬНА

Род *Linum* включает в себя не менее ста видов с разным количеством хромосом от $n = 6$ до $n = 30$ [1, 2]. Они различаются по морфологическим, физиологическим и биохимическим признакам. Масличный лен *Linum humile* Mill. входит в группу $n = 15$. В эту же группу входят и дикие виды *L. angustifolium*

Huds., *L. bienne* Mill., *L. hispanicum* Mill. и *L. crepitans* (Boenn.) Dumort. Согласно большинству исследований, именно эти виды являются ближайшими родственниками культурного льна [2–4]. Многие ученые полагают, что вследствие более примитивного типа организации хромосом вид *L. angustifolium*

является непосредственным предком и культурного льна, и остальных названных видов этой группы [5]. Согласно классификации Сизова И.А [3] и более поздних авторов возможным родоначальником культурного льна может быть и вид *L. bienne*. Он стоит близко к дикорастущим *L. angustifolium* и *L. hispanicum*, хотя последний вид описан хуже всех. Существует мнение, что к возникновению культурного льна в бассейне Средиземного моря привела гибридизация нескольких близких видов [2].

Впервые межвидовая гибридизация в роде *Linum* была проведена J.B. Kolreuter между культурным льном и дикарем *L. angustifolium*. Многие исследователи заявляли об успешной гибридизации *L. usitatissimum* с *L. africanum*, *L. angustifolium*, *L. corymbiferum*, *L. floccosum* и *L. pallescens* [4]. Все эти комбинации давали фертильные гибриды хотя бы в одном направлении благодаря одинаковой ploидности и похожему размеру хромосом. В цитогенетическом исследовании Gill (1966) [4] утверждал, что культурный лен отличается от трех близких видов *L. africanum*, *L. angustifolium*, и *L. decumbens* одной транслокацией. Также успешно проводилась гибридизация между *L. humile*, *L. crepitans*, *L. hirsutum* и *L. hispanicum*, в результате чего были получены фертильные растения [4]. С.Н. Кутузова отмечает успешное скрещивание вида *Linum hispanicum* с культурным льном [2].

Дикие виды льна являются носителями важных селекционно-ценных признаков, таких как устойчивость к заболеваниям и экстремальным факторам внешней среды, повышенное боковое ветвление и другие. Также интересным для селекции является раннее созревание дикарей. К недостаткам диких форм следует отнести низкую масличность, растрескивание коробочек и мелкие семена.

Целью нашей работы было изучение наследования межвидовыми гибридами F_1 льна морфологических особенностей коробочки, которые являются важными таксономическими и хозяйственными признаками в селекционных программах.

Материалы и методы

В качестве материала использовали образцы диких однолетних видов льна *Linum angustifolium*, *Linum bienne*, *Linum hispanicum* и *Linum crepitans*, а также *Linum humile* (сорт Золотистый и линия Л-6) из коллекции лаборатории селекции льна Института масличных культур НААН.

Анализировали такие признаки коробочки как диаметр, высота и степень растрескивания. Степень доминирования признака в первом поколении гибридов определяли по G.M. Veil и R.E. Atkins [6]:

$$h_p = \frac{F_1 - MP}{P - MP},$$

где F_1 – среднее арифметическое признака для гибридов первого поколения,

MP – среднее арифметическое признаков обеих родительских форм,

P – среднее арифметическое родительской формы с большим уровнем признака.

Определенные по формуле показатели интерпретировали следующим образом: $0 < h_p < |1|$ – промежуточное доминирование (полудоминирование), $h_p > |1|$ – сверхдоминирование признака, $h_p = |1|$ – полное доминирование [6].

Результаты и обсуждение

Выращивание, изучение и описание всех образцов проводилось в полевых условиях 2013 года в коллекционном питомнике. Установлено, что размеры коробочек изучаемых диких видов существенно отличались от культурного льна и по диаметру, и по высоте, и, особенно, по растрескиваемости (табл. 1). У всех изученных нами генотипов коробочки имели сходную округлую форму с заостренным носиком. Достаточно близки по размеру коробочки видов *L. angustifolium* и *L. bienne*. У вида *L. hispanicum* коробочки по высоте и диаметру меньше. Вид *L. crepitans* характеризуется коробочкой близкой по размерам сорту Золотистый, но существенно отличается от остальных диких видов и линии Л-6. В наши исследования мы включили два генотипа культурного льна (*L. humile*) – сорт Золотистый и линию Л-6, которые значительно различаются между собой по признакам коробочки. Так, линия Л-6 имеет одну из самых крупных коробочек и крупные семена среди всех линий масличного льна в коллекции ИМК НААНУ.

Обычно степень растрескивания коробочек у льна оценивают по девятибалльной шкале – от полностью закрытых до растрескивающихся. В рамках данного исследования растрескивание оценено в миллиметрах. При изучении степени растрескивания мы выявили, что наиболее сильно она проявляется у *L. crepitans*, что согласуется с подробным исследованием С.Н. Кутузовой (2009) [7]. И.А. Сизов, рассматривая культурный лен с точки зрения его

селекционной ценности, на основании растрескиваемости коробочек даже отнес вид *L. crepitans* в отдельную разновидность и счел его недостаточно ценным для селекционного использования [3]. Однако нас заинтересовала раннеспелость данного образца. Важно отметить, что образцы льна культурного имели не растрескивающиеся коробочки, а линия Л-6 характеризовалась также очень твердыми, трудно обмолачиваемыми коробочками. Согласно нашим наблюдениям, виды *L. angustifolium*, *L. bienne* и *L. hispanicum* существенно отличаются по данному признаку от остальных генотипов. При этом коробочки *L. hispanicum* визуальнo растрескиваются сильнее (вероятно, из-за меньшего размера коробочки), чем виды *L. angustifolium* и *L. bienne*, хотя согласно статистической обработке различия между ними находятся в пределах значений НСР.

Для изучения наследования признаков коробочки нами было проведено скрещивания указанных выше однолетних диких видов с линиями культурного льна. Установлено, что размеры коробочек гибридных растений в комбинациях с *L. angustifolium*, *L. bienne* и

L. hispanicum существенно больше, чем у диких родительских форм (табл. 1, 2). Также обнаружено, что в поколении F₁ в комбинациях с линией Л-6 размеры коробочек больше, чем у растений в гибридных комбинациях с сортом Золотистый. При этом, рассматривая все комбинации на одного из культурных родителей, выявлено, что отличия между ними в размерах коробочки практически отсутствуют. Так, в комбинациях с тремя вышеупомянутыми видами, где материнской формой выступает сорт Золотистый, высота коробочек составляет от 5,1 до 5,5 мм. А в случае, когда материнской формой служит линия Л-6, их высота варьирует от 6,0–6,1 мм. По изучаемым признакам от всех других достоверно отличается комбинация F₁ с участием *L. crepitans*.

Установлено, что при отсутствии растрескивания у культурных родительских форм в поколении F₁ всех межвидовых гибридов этот признак проявляется достаточно четко. Наибольшее растрескивание отмечено в комбинации скрещивания Золотистый x *L. crepitans* и составляет 2,3 мм.

Таблица 1. Морфологические признаки коробочек однолетних диких видов и образцов культурного льна

Вид	Признаки коробочки		
	диаметр, мм	высота, мм	степень растрескивания, мм
<i>Linum angustifolium</i>	4,5	4,1	1,4
<i>Linum bienne</i>	4,5	4,0	1,5
<i>Linum hispanicum</i>	4,2	3,6	1,8
<i>Linum crepitans</i>	7,1	7,1	5,1
Золотистый	6,6	6,8	0
Л-6	7,9	9,0	0
НСР ₀₅	0,29	0,37	0,47

Таблица 2. Признаки коробочки в поколении F₁ межвидовых гибридов льна

Генотип	Признаки коробочки		
	диаметр, мм	высота, мм	степень растрескивания, мм
F ₁ Золотистый x <i>Linum angustifolium</i>	5,4	5,1	1,5
F ₁ Л-6 x <i>Linum angustifolium</i>	6,3	6,1	1,7
F ₁ Золотистый x <i>Linum hispanicum</i>	5,6	5,5	1,6
F ₁ Л-6 x <i>Linum hispanicum</i>	6,3	6,0	2,1
F ₁ Золотистый x <i>Linum bienne</i>	6,0	5,5	1,6
F ₁ Л-6 x <i>Linum bienne</i>	6,2	6,0	1,8
F ₁ Золотистый x <i>Linum crepitans</i>	7,5	7,6	2,3
НСР ₀₅	0,20	0,18	0,21

При расчете степени доминирования исследуемых признаков в поколении F₁ мы пришли к выводу о промежуточном наследовании высоты и диаметра коробочек в комбинациях с тремя дикими видами *L. angustifolium*, *L. bienne* и *L. hispanicum* и о близкой к доминированию у этих гибридов большей степени растрескивания коробочки. Несколько по-другому наследуются данные признаки у гибрида с участием дикого вида *L. crepitans*. В этом случае отмечено сверхдоминирование большей высоты и диаметра коробочки, тогда как признак растрескивания коробочки наследуется промежуточно (табл. 3).

Выводы

Установлена различная степень доминирования признаков коробочки у межвидовых гибридов льна с участием диких видов *L. angustifolium*, *L. bienne* и *L. hispanicum* с одной стороны и с *L. crepitans* с другой. В первом случае имеет место промежуточное наследование высоты и диаметра коробочки и доминирование ее большей растрескиваемости, а во втором – по первым двум признакам наблюдается положительный гетерозис, тогда как растрескиваемость коробочки наследуется промежуточно.

Таблица 3. Степень доминирования признаков коробочки у межвидовых гибридов льна

Генотип	Признаки коробочки		
	диаметр, мм	высота, мм	степень растрескивания, мм
F ₁ Золотистый x <i>Linum angustifolium</i>	-0,29	-0,20	1,17
F ₁ Л-6 x <i>Linum angustifolium</i>	-0,17	0,07	1,55
F ₁ Золотистый x <i>Linum hispanicum</i>	0,16	0,16	0,74
F ₁ Л-6 x <i>Linum hispanicum</i>	-0,15	0,15	1,33
F ₁ Золотистый x <i>Linum bienne</i>	0,04	0,40	1,03
F ₁ Л-6 x <i>Linum bienne</i>	-0,21	0,03	1,41
F ₁ Золотистый x <i>Linum crepitans</i>	5,70	2,49	0,07

Литература

1. Лях В.А., Сорока А.И. Ботанические и цитогенетические особенности видов рода *Linum* L. и биотехнологические пути работы с ними. – Запорожье: ЗНУ, 2008. – 182 с.
2. Кутузова С.Н. Генетика льна // Генетика культурных растений. – Санкт-Петербург, 1998. – С. 6–52.
3. Сизов И.А. Об эволюции и генетике вида *Linum usitatissimum* L. // Тр. по прикл. бот., ген. и сел. – 1970. – 42. – С. 3–19.
4. Jhala A.J., Hall L.M., Hall J.C. Potential hybridization of flax with weedy and wild relatives: an avenue for movement of engineered genes? // Crop science. – 48, N 3. – 2008. – P. 825–840.
5. Жуковский П.М. Культурные растения и их сородичи. – Л.: Колос, 1971. – С. 451–456.
6. Veil G. M., Atkins R.E. Inheritance of quantitative characters in grain sorghum // Jowa J. Sci. – 1965. – 39, N 3. – P. 345–358.
7. Кутузова С.Н. Наследование степени растрескивания коробочек у подвидов культурного льна *Linum usitatissimum* L. // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. – СПб: ВИР, 2009. – 166. – С. 156–162.

POLIAKOV V.A.¹, LYAKH V.A.²

¹ Institute of Oilseed Crops NAAS,

Ukraine, 70417, Zaporizhzhya region, Zaporizhzhya oblast, Solnechnyi, Institutska str., 1, e-mail: eradan_90@mail.ru

² Zaporizhzhya National University,

Ukraine, 69600, Zaporizhzhya, Zhukovskogo str., 66

INHERITANCE OF BOLL TRAITS IN F₁ INTERSPECIFIC FLAX HYBRIDS

Aims. Oil flax *Linum humile* and annual wild species *L. angustifolium*, *L. bienne*, *L. hispanicum* and *L. crepitans* are included in n = 15 group. Wild flax species are of interest due to important valuable traits

such as resistance to diseases and extreme environmental factors, increased lateral branching and early ripeness. The aim of our work was to study the inheritance of taxonomically and economically important morphological traits of the bolls in F₁ interspecific flax hybrids. **Methods.** F₁ interspecific hybrids between cultivated flax and *L. angustifolium*, *L. bienne*, *L. hispanicum* and *L. crepitans* were used as the experimental material. The degrees of dominance for the traits of boll diameter, boll height and boll dehiscence were calculated. The intermediate inheritance, dominance and overdominance of the traits were taking into account. **Results.** It was established that all F₁ interspecific hybrids possessed dehiscent bolls in contrast to parental cultivated lines. In hybrids with *L. angustifolium*, *L. bienne* and *L. hispanicum* an intermediate inheritance of boll size and dominance of boll dehiscence were observed, whereas in hybrid with *L. crepitans* a positive heterosis of boll diameter and boll height as well as intermediate inheritance of boll dehiscence were found. **Conclusions.** A various degrees of dominance for boll traits in interspecific hybrids involving wild flax species *L. angustifolium*, *L. bienne* and *L. hispanicum* as compared with *L. crepitans* were revealed. **Key words:** *Linum humile* Mill., wild species, *Linum angustifolium* Huds., *Linum bienne* Mill., *Linum hispanicum* Mill., *Linum crepitans* (Boenn.) Dumort., interspecific hybrid, boll size, boll dehiscence, inheritance.

УДК 633.854.54:631.527.549

ПОЛЯКОВА И.А.

Запорожский национальный университет,

Украина, 69063, г. Запорожье, ул. Жуковского, 66, e-mail: Ira.Linum@mail.ru

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕЖВИДОВОЙ ГИБРИДИЗАЦИИ ПРИ СОЗДАНИИ ЦЕННОГО ИСХОДНОГО МАТЕРИАЛА ЛЬНА МАСЛИЧНОГО

Выращивание льна масличного в Украине имеет динамику постоянного роста благодаря высокой рентабельности производства. Эта масличная культура технологична, скороспела, засухоустойчива, обеспечивает урожай семян до 2,5 т/га. Разнообразие зон выращивания обуславливает создание сортов с более высокой пластичностью и устойчивостью, как к отдельным возбудителям, так и к комплексу заболеваний. На наш взгляд, именно межвидовая гибридизация в состоянии решить эту задачу [1, 2].

Как известно, дикие виды представляют интерес, прежде всего как доноры утраченных культурным льном генов устойчивости к неблагоприятным условиям окружающей среды, заболеваниям, и вредителям, а вовлечение их в работу является очень актуальным направлением селекции. Однако, межвидовая гибридизация – более трудоемкий метод создания исходного материала, чем внутривидовая. Род *Linum* гетерогенен по числу, размерам хромосом и по их строению, однако гибридизация различных видов между собой не всегда удается даже в пределах групп с равным числом хромосом [3]. Несмотря на это, скрещивание разных видов льна между собой привлекало многих исследователей [3–7]. Относительно легко удается гибридизация

Linum usitatissimum L. (n = 15) с *L. angustifolium* Huds. (n = 15) и первые такие гибриды получены еще в начале века [3].

Целью нашей работы было получить методом простой гибридизации разнообразные межвидовые гибриды льна в пределах группы n = 15 для расширения генетической изменчивости культуры и выделения перспективного исходного материала.

Материалы и методы

Объектом служил линейный коллекционный материал льна масличного и однолетних диких видов льна. Кастрация материнских растений осуществлялась в фазу окрашенного конуса бутона с опылением свежесобранной пылью в этот же день. Полученный селекционный материал изучали последовательно в питомниках F₁–F₅. Для анализа по комплексу морфометрических и биохимических признаков отбирали по 20 растений гомозиготных линий поколения F₆. Все измерения и наблюдения при изучении коллекционных образцов проводили в соответствии с общепринятыми методиками [1]. Определение масличности семян образцов льна проводили методом ядерно-магнитного резонанса на лабораторном ЯМР-анализаторе АМВ-1006. Жирнокислотный состав триглицеридов семян определялся методом

газожидкостной хроматографии на приборе «Селмихром – 1».

Результаты и обсуждение

В работу с целью интрогрессии генетического материала на межгеномном уровне были включены четыре образца льна масличного *Linum humile* Mill. ($n = 15$): сорт Золотистый, линии М-24, М-22, Л-1; дикие однолетние виды льна с одинаковым количеством хромосом *Linum angustifolium* ($n = 15$) и *Linum bienne* Mill. ($n = 15$). В качестве материнской формы выступал лен культурный *L. humile*. Подобный тип скрещиваний относятся к скрещиваниям близкородственных видов с одинаковым числом и высокой гомологичностью хромосом с получением фертильного потомства. Сложность получения межвидовых гибридов в пределах данной группы состоит, прежде всего, в несовпадении сроков цветения диких видов и культурного льна, невысоким процентом завязываемости семян, а также сильным растрескиванием коробочек у дикарей и доминировании этого нежелательного признака. По этим же причинам крайне сложно проводить реципрокные скрещивания с использованием данных компонентов.

Как нами было выявлено ранее [8], при скрещивании культурного льна с дикими видами, по фенотипу доминируют признаки дикого родителя: темно зеленая окраска стебля; сильное боковое ветвление; цветок, коробочка и семена – мелкие. У гибридных растений F_1 нами отмечена повышенная, по сравнению с обоими родителями, мощность роста.

Многообразие аллелей диких видов при введении их в гибридизацию с культурным льном предполагает возможность интрогрессии и повышение гетерозиготности, возникает большое разнообразие со всевозможными сочетаниями, как видовых свойств, так и новых состояний признаков. В наших исследованиях в гибридном питомнике F_2 расщепляющиеся потомства отличались большим разнообразием, а изменчивость была значительно выше, чем при межсортовой гибридизации. Нами проанализированы поколения F_2 24-х гибридных комбинаций, с общим числом 5904 растений, среди которых выделены 480 элитных растений. Дальнейшее изучение и оценка гибридных популяций F_3 - F_5 осуществлялась путем проведения описания и учетов в питомниках и проведения жесткого отбора элитных растений.

Основным критерием отбора было наличие в гибридных растениях признаков культурного и дикого родителей, а также нерастрескиваемость коробочек при созревании. Результатом этой работы стало 16 линий.

В результате изучения данного исходного материала по таким хозяйственно-полезным признакам, как высота, количество боковых стеблей и коробочек, масса 1000 шт. семян, масличность и жирнокислотный состав масла, нами выделены пять наиболее перспективных линий характеристики которых приведены в таблицах 1 и 2.

Как видно из таблицы, по многим полезным признакам новые гибридные линии имеют лучшие показатели, чем стандартный сорт Південна ніч. В частности, по количеству боковых стеблей выделяются линии В-11 и А-5.

Льняное масло уникально по своему составу. В жирнокислотный состав семян льна входят 5 кислот: насыщенные – стеариновая, пальмитиновая и ненасыщенные – олеиновая, линолевая, линоленовая. Содержание ненасыщенных кислот и определяет использование масла. Как видно из данных таблицы 2, изучаемые линии имели жирнокислотный состав масла с явным преобладанием линоленовой кислоты.

По содержанию масла как более перспективный материал выделяются образцы А-5 и А-11 с масличностью 46,4 % и 47,6 %, соответственно.

Формирование вторичного банка – хранилища ценных генов – не только один из методов сохранения природного биоразнообразия, но и источник новых признаков для получения исходного материала. Нами проведена работа по регистрации ценного селекционного материала, полученного методом межвидовой гибридизации, в Центре генетических ресурсов Украины. В результате получены два свидетельства:

- Свидетельство № 1075 на образец генофонда льна низкого (кудряша) линия А-11. Зарегистрирован под номером Национального каталога UF0402154. Данный образец характеризуется сочетанием количества стеблей 1,9, масличности 47,6 %, содержанием линоленовой кислоты 62 %, отсутствием растрескивания коробочек, вегетационного периода 88 дней, урожайности 1,68 т/га, при устойчивости к фузариозу на уровне 7Б и засухоустойчивости на уровне 7Б.

Таблица 1. Морфометрические параметры перспективных линий льна, полученных методом межвидовой гибридизации, и их родительских форм

Генотип	Высота, см	Количество, шт.		Масса 1000 шт. семян, г
		боковых стеблей	коробочек	
<i>L. angustifolium</i>	31,2 ± 3,77	4,7 ± 1,69	64,48 ± 12,3	1,5 ± 0,25
Золотистый	65,0 ± 2,23	2,0 ± 0,56	18,28 ± 7,15	7,4 ± 0,31
А – 1 Золотистый х <i>L. angustifolium</i>	46,4 ± 2,88	1,7 ± 0,47	66,8 ± 8,34	3,3 ± 0,19
А – 5 Золотистый х <i>L. angustifolium</i>	52,8 ± 4,61	2,1 ± 1,72	33,6 ± 10,55	4,3 ± 0,40
М-24	57,0 ± 3,11	2,0 ± 1,63	35,04 ± 8,65	7,2 ± 0,13
А – 11 М-24 х <i>L. angustifolium</i>	41,7 ± 2,97	1,9 ± 1,41	26,36 ± 9,76	6,9 ± 0,38
<i>L. bienne</i>	27,6 ± 2,09	4,4 ± 2,33	66,12 ± 15,44	1,5 ± 0,29
М-22	46,6 ± 4,15	3,48 ± 2,45	27,80 ± 7,86	8,2 ± 0,41
В-7 М-22 х <i>L. bienne</i>	44,9 ± 3,79	1,24 ± 0,68	16,84 ± 8,55	7,3 ± 0,36
Л-1	42,0 ± 4,34	2,9 ± 1,95	28,68 ± 11,84	10,0 ± 0,20
В-11 Л-1 х <i>L. bienne</i>	34,8 ± 3,68	3,1 ± 1,16	40,56 ± 8,72	4,5 ± 0,28
Південна ніч (сорт-стандарт)	57,5 ± 2,55	1,6 ± 1,23	50,6 ± 10,14	7,9 ± 0,51

Таблица 2. Масличность и жирнокислотный состав семян перспективных линий льна, полученных методом межвидовой гибридизации, и их родительских форм

Генотип	Маслич- ность, %	Жирные кислоты, %				
		пальми- тиновая	стеари- новая	олеи- новая	лино- левая	линоле- новая
<i>L. angustifolium</i>	28,0±1,84	9,0±0,76	7,0±1,07	22,9±2,55	10,7±2,14	50,4±3,34
Золотистый	49,1±1,31	3,3±0,43	1,4±0,50	17,2±1,62	6,0±1,05	72,1±1,07
А – 1 Золотистый х <i>L. angustifolium</i>	41,1±2,06	1,3±0,53	4,0±0,94	21,9±1,59	15,7±0,86	57,1± 1,88
А – 5 Золотистый х <i>L. angustifolium</i>	46,4±1,81	5,2±0,97	3,2±0,28	21,6±2,31	10,2±1,58	59,8±2,13
М-24	45,3±2,24	4,4±0,65	2,0±0,59	17,1±2,06	4,9±0,79	71,6±1,52
А – 11 М-24 х <i>L. angustifolium</i>	47,6±1,34	4,8±1,06	5,6±1,15	20,5±1,99	7,1±1,02	62,0±2,57
<i>L. bienne</i>	24,0±2,43	4,9±0,92	7,0±1,47	18,7±2,47	9,3±2,55	60,1±3,42
М-22	44,4±2,50	2,1±0,68	3,6±1,02	48,1±1,57	12,8±2,49	33,4±2,05
В-7 М-22 х <i>L. bienne</i>	40,2±3,11	4,8±1,31	3,3±0,98	18,7±2,03	11,9±2,83	61,3±2,66
Л-1	33,9±3,93	4,3±1,52	5,0±0,56	18,8±2,64	10,3±2,78	61,6±3,10
В-11 Л-1 х <i>L. bienne</i>	43,2±2,64	4,4±0,43	5,0±0,77	19,5±1,59	9,8±2,14	61,0±2,98
Південна ніч (сорт-стандарт)	43,7±2,27	5,5±1,04	3,5±0,99	20,8±1,12	16,3±2,25	53,9±2,31

- Свидетельство № 1076 на образец генофонда льна низкого (кудряша) линия В-1. Зарегистрирован под номером Национального каталога UF0402153. Эта линия характеризуется урожайностью 1,64 т/га, количеством стеблей 3,1, масличностью 43,2 % (линоленовой кислоты 61,0 %), отсутствием растрескивания коробочек, при засухоустойчивости 7 баллов, вегетационном периоде 83 дня.

На наш взгляд, эти линии приобретают особый интерес в новых селекционных программах при создании новых сортов с повышенной устойчивостью в связи с интенсивным расширением посевных площадей под льном масличным в северных, центральных и

западных регионах Украины.

Выводы

1. В качестве перспективного материала по сочетанию комплекса хозяйственно ценных признаков, выделились образцы А-11(UF0402154) и В-11 (UF0402153).

2. Полученные межвидовые гибриды являются вторичным генофондом генов диких родичей *Linum humile*. Создание таких линий открывает новые возможности для дальнейшего расширения селекционной работы в направлении создания исходного материала с повышенной устойчивостью к биотическим и абиотическим факторам среды.

Литература

1. Лях В.О., Полякова И.О. Селекція льону олійного (Методичні рекомендації). – Запоріжжя: ЗНУ, 2008. – 40 с.
2. Лях В.А., Сорока А.И. Ботанические и цитогенетические особенности видов рода *Linum* и биотехнологические пути работы с ними. – Запорожье: ЗНУ, 2008. – 182 с.
3. Кутузова С.Н. Генетика льна // Генетика культурных растений. – СПб: ВИР, 1998. – С. 6–52.
4. Кутузова С.Н., Гаврилюк И.П., Егги Э.Э. Перспективы использования белковых маркеров в уточнении систематики и эволюции рода *LINUM L* // Труды по прикладной ботанике, генетики и селекции. ВИР. – 1999. – 156. – С. 23–39.
5. Лях В.А., Полякова И.А. Скрещиваемость между некоторыми гетеростильными видами льна // Вісник ЗДУ. – 2004. – № 2. – С. 180–183
6. Махно Ю.А., Полякова И.А. Сравнительное изучение спектров запасных белков семян диких видов льна // Научно-технічний бюлетень ІОК УААН. – Запоріжжя, 2007. – Вип. 12. – С. 45–49.
7. Могилевская Л.А., Сорока А.И., Лях В.А. Скрещиваемость между некоторыми многолетними дикими видами льна // Научно-технічний бюлетень ІОК УААН. – Запоріжжя, 2002. – Вип. 7. – С. 20–25.
8. Сагайдак Е.А., Полякова И.А. Особенности межвидовой гибридизации у льна // Научно-технічний бюлетень ІОК УААН. – Запоріжжя, 2008. – Вип. 13. – С. 88–92.

POLIAKOVA I.A.

Zaporizhzhya National University,

Ukraine, 69600, Zaporizhzhya, Zhukovskogo str., 66, e-mail: Ira.Linum@mail.ru

USING INTERSPECIFIC HYBRIDIZATION IN ESTABLISHING VALUABLE OIL FLAX SOURCE MATERIAL

Aims. Growing flax in Ukraine has a constant growth dynamics. Diversity of growing areas stipulates the creation of varieties with higher plasticity and resistance. In this regard, involving wild species as donors of resistance genes in the breeding process becomes very interesting. Aim of this work was to obtain by simple hybridization interspecific hybrids of flax within the group $n = 15$ to broaden the genetic variability of the plant and highlight promising original material. **Methods.** With the purpose of introducing genetic material we included four samples of oil flax *Linum humile* and wild annual species of flax with the same number of chromosomes *Linum angustifolium* and *Linum bienne*. Oil flax was used as the maternal form. **Results.** Elite plants selected in the F_2 generation have passed a rigorous selection for the lack of boll dehiscence and for combining morphological features of cultural and wild parents down a number of generations. Promising source material was singled out and studied in detail on such traits as height, number of lateral stems and bolls, weight of thousand seeds, oil content and fatty acid composition of the oil. **Conclusions.** Promising breeding material was obtained with a combination of complex economically valuable traits – lines A-11 and B-11, which were successfully registered in the National catalogue. Interspecific hybrids that had been obtained became secondary gene pool of wild relatives of *Linum humile*.

Key words: *Linum humile* Mill., wild species, *Linum angustifolium* Huds., *Linum bienne* Mill., interspecific hybrid, valuable trait, breeding.

УДК 599.735.51:591.433:575.2

САМЧУК В.А.¹, СТЕКЛЕНЬОВ Є.П.²

¹ Луганський національний університет імені Тараса Шевченка,
Україна, 91011, м. Луганськ, вул. Оборонна, 2, e-mail: anatomic@mail.dsip.net

² Біосферний заповідник «Асканія-Нова»,
Україна, 75230, Херсонська обл., смт. Асканія-Нова

МІНЛИВІСТЬ БУДОВИ ШЛУНКА Й КИШЕЧНИКА У ГІБРИДІВ БАНТЕНГА І БІЗОНА З ДОМАШНЬОЮ КОРОВОЮ

Відомо, що основні типи живлення сформувалися задовго до виникнення тварин сучасного типу, а тварини із спеціалізованим травленням суттєво відрізняються своїми можливостями засвоєння їжі. Багато видів тварин отримують більшість поживних речовин від бактерій симбіонтів. Ферментація трави в передшлунку дозволяє жуйним успішно засвоювати рослинну їжу, в тому числі й грубі, непридатні для інших видів корми. У жуйних важлива частина процесів засвоєння грубих кормів пов'язана із складним шлунком, який у багатьох видів складається з рубця, сітки, книжки й сичуга. У рослиноїдних видів добре розвинуті сліпа й ободова кишка, в яких продовжується мікробіальна переробка рослинних компонентів, неперетравлених в шлунку й тонкій кишці. У свійських жуйних під впливом domestикації зросла роль травлення у сичузі й тонкому кишечнику [1]. У результаті гібридизації диких бантенгів і бізонів з домашньою коровою в Асканії-Нова було отримано понад 400 особин гібридів першого й четвертого поколінь й досліджено їх розвиток, біологічні та господарські корисні ознаки. У бантенгових гібридів першого покоління проявляється гетерозис як в пре- так і в постнатальний період. При схрещуванні гібридних самок з самцями домашньої корови гетерозис зберігається, а при схрещуванні з самцями бантенга – зникає. Якісні показники м'ясної та молочної продуктивності гібридів першого покоління значно переважали показники тварин червоної степової породи. Розведення гібридів «у собі» заважає неплідність гібридних самців. Схожа картина спостерігається й при гібридизації бізонів з домашньою коровою. Внутрішньовидові, міжвидові й більш віддалені схрещування дозволяють отримати високопродуктивні й одночасно невибагливі до умов утримання гібридні форми, породи й породні групи сільськогосподарських тварин [2]. Крім того, гібридизація – це один із факторів мінливості рослинних і тваринних організмів й має певне

значення як метод наукового дослідження процесів еволюції, видоутворення, спадковості.

Складний шлунок жуйних має спільні макро- і мікроморфологічні ознаки, що не виключає й міжвидових та індивідуальних відмінностей. Дикі жуйні краще засвоюють низькоякісний рослинний корм й зберігають масу тіла та життєздатність у несприятливих умовах або у зв'язку із сезонними змінами [3].

Порівняльний аналіз кількісних і якісних показників будови передшлунків бантенгів, бізонів, домашньої корови та їх гібридів виявив видові відмінності та вплив поєднання геномів різних видів биків на варіювання макро- і мікроморфологічних показників їх передшлунків [4]. Результати досліджень епітелію сичуга бантенга й червоної степової породи та їх гібридів виявили тенденцію до більшої схожості залозистого епітелію сичуга бантенгових гібридів F_1 і F_2 з s бантенга з епітелієм сичуга бантенга, а F_2 з s червоної степової – з домашньою коровою [5]. Забезпеченість маси тіла масою сичуга найменша у дорослих бантенгових і бізонячих гібридів F_1 , отриманих у схрещуваннях із сірою українською породою, а при схрещуванні з червоною степовою – показники виявилися більшими. У новонароджених гібридів забезпеченість маси тіла масою сичуга була найбільшою, а його відносна маса у складі шлунка в декілька разів перевищувала відповідні показники у дорослих гібридів [6]. Шлунково-кишковий тракт жуйних формується під значним впливом якості і складу кормів під час переходу з молока на рослинну їжу, проте визначальну роль відіграють генетичні механізми онтогенезу. При проведенні порівняльної характеристики між дикими тваринами, їхніми домашніми родичами та гібридами можна з'ясувати унікальні властивості, які мають дикі тварини, втрати й надбання внаслідок domestикації їх домашніх родичів та гібридів.

Метою цієї роботи є дослідження мінливості та морфологічних

особливостей шлунка і кишечника гібридів, отриманих у схрещуваннях бантенгів і бізонів з домашньою коровою.

Матеріали і методи

У досліджах були використані шлунки та кишечника бантенгів, бізонів, домашньої корови червоної степової, сірої української порід та їх гібридів. Тварини знаходились в умовах напіввільного утримання в Асканії-Нова. Гібриди вирощувались на ручному вигодовуванні незбираним материнським молоком. З місячного віку тварин підкормлювали сіном і концентратами. Абсолютну масу шлунка, кишечника та їх відділів визначали шляхом зважування, попередньо звільнивши їх від хімусу й жиру. За абсолютними даними визначали індекси відносного розвитку органу: забезпеченість маси тіла у проміле (‰) від загальної маси тіла; маси відділів шлунка й кишечника у відсотках (%) від їх загальної маси; відношення маси передшлунків до маси сичуга, співвідношення тонкої і товстої кишки. Для

гістологічних досліджень зразки шлунка, тонкої й товстої кишки фіксували у формаліні, заливали у целоїдин, забарвлювали гематоксином і еозином. Для статистичного аналізу використовували непараметричні методи.

Результати та обговорення

Забезпеченість (‰) маси тіла масою шлунка серед дорослих тварин виявилась найбільшою у червоної степової породи та гібридів s бантенга × j червоної степової, ²/₈ бантенга × ⁵/₈ червоної степової × ¹/₈ сірої української (табл. 1). У новонароджених гібридів цей показник значно менший, а сичуг, кишечник та тонка кишка мали найбільші показники відносного розвитку (%). У гібридів S бантенга × S червоної степової встановлена пряма кореляція маси тіла і маси шлунково-кишкового тракту (p = 0,85, P < 0,005) й зворотня – між масою тіла й відносною масою шлунково-кишкового тракту (p = 0,9, P = 0,001).

Таблиця 1. Морфометричні показники шлунка і кишечника: забезпеченість маси тіла масою органа у проміле (‰) від загальної маси тіла; маси органа у відсотках (%) від загальної маси шлунково-кишкового тракту; відношення маси передшлунків до маси сичуга, відношення маси тонкої кишки до маси товстої кишки

Вид, порода, гібрид n	Шлунок		Кишечник		Співвідношення передшлунків і сичуга	Співвідношення тонкої і товстої кишки
	‰	%	‰	%		
Бантенг, n = 6	31,2	66,5	16,0	33,5	8,2:1	1,2:1
Бізон, n = 3	27,9	70,0	13,7	30,0	10,5:1	1,3:1
Червона степова порода, n = 6	39,6	68,6	18,3	31,4	7,4:1	1,5:1
S бантенга × S червоної степової, n = 9	30,0	66,1	15,5	33,9	8,0 : 1	1,9:1
S бантенга × S сірої української, n = 3	31,7	68,0	14,9	32,0	9,7 : 1	1,4:1
S бізона × S сірої української, n = 4	32,0	73,0	11,9	27,0	13,5 : 1	1,3:1
s червоної степової × j бантенга, n = 9	32,9	65,7	17,0	34,3	8,6 : 1	1,5:1
s бантенга × j червоної степової, n = 3	30,7	62,7	18,3	37,3	9,3 : 1	1,4:1
³ / ₈ бантенга × ⁵ / ₈ червоної степової, n = 1	25,6	59,2	17,7	40,8	8,7 : 1	1,6:1
⁵ / ₈ червоної степової × ³ / ₈ бантенга, n = 1	34,6	67,4	16,7	32,6	7,4 : 1	1,3:1
⁷ / ₈ бантенга × ¹ / ₈ червоної степової, n = 1	27,0	64,4	14,9	35,6	9,8 : 1	1,3:1
⁷ / ₈ червоної степової × ¹ / ₈ бантенга, n = 1	25,3	61,1	16,0	38,9	5,4 : 1	1,5:1

$1/8$ бантенга \times $7/8$ червоної степової (мертвонароджений), $n = 1$	10,9	22,3	38,0	77,7	0,7 : 1	6,2:1
S бантенга \times j сірої української \times j червоної степової, $n = 1$	29,3	74,2	17,5	25,8	9,2 : 1	1,4:1
$3/8$ бантенга \times $3/8$ червоної степової \times $2/8$ сірої української, $n = 2$	29,7	63,0	17,4	37,0	10,6 : 1	1,7:1
$3/8$ червоної степової \times $3/8$ бантенга \times $2/8$ сірої української, $n = 2$	36,4	67,3	17,7	32,7	8,4 : 1	1,8:1
$2/8$ бантенга \times $5/8$ червоної степової \times $1/8$ сірої української, $n = 1$	27,8	58,6	19,7	41,4	8,6 : 1	1,7:1
S бізона \times j бантенга \times j сірої української, $n = 1$	27,6	68,5	12,7	31,5	10,3 : 1	1,8:1
S бізона \times j бантенга \times j сірої української (новонароджений), $n = 1$	9,8	27,1	26,3	72,9	1,0 : 1	2,5:1
$1/2$ бізона \times $3/16$ бантенга \times $5/16$ червоної степової, $n = 1$	31,1	70,8	12,9	29,2	11,4 : 1	2,5:1

Показник співвідношення маси передшлунків і сичуга був більшим у бізонів та гібридів S бізона \times S сірої української, $3/8$ бантенга \times $3/8$ червоної степової \times $2/8$ сірої української та $1/2$ бізона \times $3/16$ бантенга \times $5/16$ червоної степової порівняно з іншими дослідженими гібридами. Співвідношення передшлунків і сичуга вказують на значну роль сичуга в травленні в перинатальний період та перерозподіл процесів травлення у тварин в подальшому, особливо під впливом переходу на рослинну їжу. Гістологічна будова стінок відділів шлунка й кишечника була типовою для жуйних, але мала значну мінливість у диких і домашніх тварин та гібридів різних поколінь й варіантів схрещувань за показниками відносної товщини оболонок і шарів, кількості залоз. Формування шлунково-кишкового тракту

бантенгових і бізонячих гібридів з домашньою короною залежить від генетичних механізмів регуляції онтогенезу та значного впливу якості і складу кормів під час переходу з молока на рослинну їжу

Висновки

Шлунок і кишечник гібридів дикого бантенга, бізона і домашньої корови мали значну мінливість маси як в абсолютних, так і відносних показниках. Співвідношення відділів шлунка, тонкої і товстої кишки, оболонок і шарів їх стінок мали певні відмінності в онтогенезі тварин і в залежності від варіанту схрещування. Мінливість будови органів травлення у гібридних тварин, сприяє їх успіху в адаптації травлення до різноякісних кормів та успішному пристосуванню тварин до сезонних змін або нових умов існування.

Література

1. Давлетова Л.В. Эволюция органов пищеварения жвачных животных // С.-х. биология. – 1976. – 31. – С. 44–49.
2. Стекленив Е.П. Отдаленная гибридизация животных. – Киев, 2001. – 232 с.
3. Hofman R.R. Comparative anatomical studies imply adaptive variations of ruminant digestive physiology // Canad. J. Anim. Sc. – 1984. – 64, suppl. – P. 203–205.
4. Самчук В.А. Стекленив Е.П. Мінливість будови передшлунків биків в умовах гібридизації та акліматизації // Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології: Зб. наук. пр. – К.: Логос, 2007. – С. 300–304.
5. Самчук В.А., Стекленив Е.П. Особливості епітелію сичуга при гібридизації домашньої корови з бантенгом // Фактори експериментальної еволюції організмів. – К.: Логос, 2011. – С. 309–312.

6. Самчук В.А., Стекленюв Є.П. Мінливість морфометричних показників сичуга у гібридів у підродині Bovinae // Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології. – К.: Логос, 2012. – С. 258–262.

SAMCHUK V.A.¹, STEKLENYOV Ye.P.²

¹ *Luhansk Taras Shevchenko National University, Ukraine, 91011, Luhansk, Oboronna str., 2, e-mail: anatomic@mail.dsip.net*

² *Biosphere Reserves "Askania-Nova", Ukraine, 75230, settl. Askania-Nova, Khersonsky region*

MUTABILITY OF STOMACH AND BOWEL STRUCTURE IN HYBRIDS OF BANTENG, BISON AND DOMESTIC COW

Aims. The aim of the investigation is to study the mutability and characteristics of structure and histostructure of stomach and bowel of the hybrids, obtained as a result of crossing bantengs and bisons with domestic cows. **Methods.** Stomachs and bowels of bantengs, bisons, and domestic cows of Red Steppe Breed, Grey Ukrainian Breed and their hybrids, which are kept in Askania-Nova in conditions of half-loose housing, were used in the investigation. According to the absolute data of stomach, bowel and their segments' weight, the indices of relative organ formation were defined. For histological investigation the samples of stomach, large and small bowel segments were fixed in formalin, embedded in celloidin, stained by hematoxylin and eosin. Nonparametric techniques were used for making statistic analysis.

Results. Stomach and bowels of hybrids of wild bantengs, bisons, and domestic cows had significant mutability in weight, both in absolute and relative measures. The correlation of the segments of stomach, large and small bowel, intestinal lining and layers of intestinal wall had definite difference in animals' ontogenesis and in dependence on the types of crossing. **Conclusions.** Mutability of the organs of digestive system in hybrid animals contributes to succeeding in adaptation of digestion to heterogeneous feeding-stuffs, and in adapting to seasonal changes or new habitat.

Key words: hybrids, banteng, bisons, domestic cow, stomach, bowel, organs' mutability.

УДК 633:631.527

СИДОРЧУК В.І.¹, ВАСИЛЬКІВСЬКИЙ С.П.², ГЛАДКІХ Є.Ю.³

¹ *Білоцерківська дослідно-селекційна станція, Україна, 09176, Київська обл., Білоцерківський р-н, п.в. Мала Вільшанка, e-mail: v.sidorchuk39@gmail.com*

² *Білоцерківський національний аграрний університет, Україна, 09117, м. Біла Церква, Київська обл., Соборна пл., 8/1*

³ *Національний науковий центр «Інститут ґрунтознавства та агрохімії імені О.Н. Соколовського», Україна, 61024, м. Харків, вул. Чайковська, 4, e-mail: ye.hlادkikh@ukr.net*

РОЛЬ ПРИРОДНОГО ДОБОРУ В СУЧАСНІЙ СЕЛЕКЦІЇ

Рушійним фактором еволюції в живій природі є нерозривно пов'язані між собою спадковість, мінливість і добір, що вперше було обґрунтовано Ч. Дарвіном [1]. Природний добір, як складова селекційного процесу базується на конкуренції організмів, тобто на індивідуальній ілімінації. Творча роль природного добору проявляється у взаємодії організмів і варіюючих факторів довкілля [2]. М.І. Вавілов визначив селекцію як еволюцію, скеровану волею людини. Тобто в основі селекційного процесу лежать еволюційні закономірності, які реалізуються через природний добір [3]. Природний добір зберігає найбільш адаптовані

форми, а штучний добір спрямований на відбір найбільш цінних генотипів за господарськими ознаками, визначеними селекційними програмами [4]. До першої половини ХХ століття зберігалось класичне співвідношення між штучним і природним добром, що сприяло виведенню ряду високопродуктивних сортів зернових культур, які одержали широке розповсюдження у сільськогосподарському виробництві різних регіонів України.

В подальші роки співвідношення між природним і штучним добром змінюється на користь останнього. Постає питання про введення природного добору в сучасний

селекційний процес для оптимальної взаємодії продуктивних, рецесивних ознак з адаптивними ознаками, що контролюються домінантними генами [5]. Тим не менше, інтерес до природного добору суттєво падає, бо суб'єкти природного добору: біоценоз → агроценоз → едафічні фактори, які включають показники родючості і генезису ґрунтів, поступово руйнуються під дією антропогенних факторів – застосування інтенсивної системи мінерального живлення рослин та захисту їх від бур'янів, шкідників і хвороб [6, 7]. Очевидно, що сорти відібрані методом штучного добору краще реагуватимуть на внесення мінеральних добрив, однак загалом у виробничих посівах ми втрачимо їх продуктивність через низьку пристосованість до факторів зовнішнього середовища, що стрімко змінюється.

Включення природного добору до селекційного процесу, можливо, є ключовим завданням сучасної селекції, тому що набуті ознаки стійкості після одного або декількох циклів схрещування зникатимуть, якщо такі ознаки постійно не підтверджуються в процесі природного добору.

Матеріали і методи

Дослідження по селекції та вивченню біологічних і морфологічних особливостей вики ярої на Білоцерківській дослідно-селекційній станції тривають більше 80-ти років, починаючи з 1928 р. Важливою їх особливістю є періодичне переміщення в просторі через організаційні причини. Саме це дало можливість розглянути результативність селекції залежно від місця розміщення, генезису ґрунтів та особливостей їх використання.

Перша (I) 1928–1944 рр. селекційна ділянка була розташована на східній окраїні м. Біла Церква на глибоких чорноземах із вмістом гумусу 3,5 % з низькою гідролітичною кислотністю, розораністю більше 100 років, без застосування мінеральної системи удобрення.

Друга (II) 1945–1964 рр. ділянка розміщувалась на західній окраїні міста, на опідзолених чорноземах із вмістом гумусу 2,9 %, розораністю до 100 років, та застосування мінеральної системи удобрення з 1950 р.

Третя (III) ділянка (1965–1980 рр.) знаходилась на північній окраїні міста і розміщувалась на глибоких слабовилугованих чорноземах із вмістом гумусу 5,1 %, розораністю більше 100 років та застосуванням мінеральної системи удобрення з 1970 р.

Четверта (IV) 1981–2010 рр. ділянка розміщується на південь від м. Біла Церква на

глибоких слабовилугованих чорноземах із вмістом гумусу 5,3 %, розораністю більше 100 років та застосуванням мінеральної системи удобрення з 1985 р.

Наразі відсутня детальна фізико-хімічна та мікробіологічна характеристика ґрунтів цих ділянок. Тим не менш, приведені дані певною мірою характеризують особливості роботи на окремо взятій ділянці.

Результати та обговорення

За 80-ти річний період роботи по селекції вики ярої на різних селекційних ділянках загалом було виведено та впроваджено в сільськогосподарське виробництво 22 сорти.

За дванадцятирічний період роботи на (I) селекційній ділянці поряд з всебічним вивченням культури було створено цінний селекційний матеріал та відібрано ряд високопродуктивних сортів із яких два сорти Білоцерківська 874/31 і Білоцерківська 27 районувались в Україні і мали широке розповсюдження в 60-х роках [8].

Працюючи на (II) селекційній ділянці, за 20 років досліджень вдалось районувати два ранньостиглих сорти для зони Лісостепу України, які не мали широкого поширення, та один середньостиглий сорт районуваний в одній області Російської Федерації. З огляду на ґрунтову відмінність, насиченість сівозміни цукровими буряками та пов'язане з цим інтенсивним впровадженням мінеральної системи удобрення, ця ділянка виявилась невдалою для селекції ярої вики.

Помічено, що помилка у виборі селекційної ділянки наперед визначає невдачу селекціонера і, не може бути виправлена ніякими теоретичними і математичними прийомами і засобами [9].

Дещо іншу ситуацію спостерігаємо з переходом на (III) селекційну ділянку. Лише за 16 років, використовуючи спочатку досить одноманітні за походженням селекційні матеріали створені на другій ділянці, вдалось передати на Державне сортовипробування та районувати 5 сортів [10]. Очевидно, що справа не стільки в різноманітності вихідного матеріалу, а в характеристиці едафічних факторів, що сприяють природному добору, і таким чином виявленню генотипів стійких до негативної дії факторів зовнішнього середовища. В 70-ті роки ключовою ознакою для сортів вики ярої була стійкість до перезволоження в другій половині вегетації. У цьому зв'язку, слід особливо відзначити сорт Білоцерківська 222, завдяки стійкості якого до

перезволоження в 1,5–2 рази збільшувався врожай насіння у виробничих посівах. Цей сорт був районований в Україні та Білорусії і понад 15 років використовувався як національний стандарт.

У зв'язку з черговою реорганізацією Білоцерківської дослідно-селекційної станції науково-дослідна робота була перенесена на (IV) ділянку. За 25 років роботи на цій ділянці виведено та включено до Реєстру 10 сортів придатних до поширення в Україні. З них, як національні стандарти, застосовували сорти Білоцерківська 88, Білоцерківська 7 і Ярослава. Нові сорти, виведені на основі більш різноманітного селекційного матеріалу, були стійкими до посухи, що значно розширило ареал їх вирощування. За статистичними даними 2006 року сорти вики ярої виведені на Білоцерківській дослідно-селекційній станції займали 80 % площ в посівах на зерно в Україні [11].

Слід додати, що в ході селекційних досліджень на (III) і (IV) ділянках шляхом повторного добору було виведено два сорти. Так на (III) ділянці із сорту Білоцерківська 222 виведено сорт Білоцерківська 33, який мав широке розповсюдження в зоні Лісосепу і Полісся. На (IV) ділянці із сорту Білоцерківська 679 виведено сорт Білоцерківська 88. Що стосується сорту Білоцерківська 679, то він був одночасно районований в Криму і Корелії і шести областях України, що свідчить про надзвичайну його екологічну пластичність, яка могла сформуватись лише під дією природного добору. Сорт Білоцерківська 88, був найбільш поширеним у всіх зонах України.

У той же час, як показала практика селекційної роботи, на (IV) ділянці результативність повторних доборів можлива лише впродовж двох ротацій сівозміни, до повного застосування мінеральної системи удобрення.

У 1998 році завершилась друга ротація в десятипільній сівозміні на (IV) ділянці. Вже на початку третьої ротації було відмічено ускладнення у відборі перспективних селекційних номерів через суперечливі дані в оцінці їх продуктивності за даними сортовипробування. Фактично ми зіткнулись з явищем депресії продуктивності. Підтвердженням цього є дані, одержані в 2008 і 2009 роках, при розмноженні двох сортів вики ярої – Білоцерківська 10 і Ярослава на двох суміжних селекційних ділянках. На (IV)

селекційній ділянці, де вику яру вирощували на полях десятипільної сівозміни впродовж 30 років, одержано на площі 3,0 га в середньому за 2 роки по 16,6 ц/га насіння вказаних сортів. На суміжній ділянці, де вику яру в сівозміні не вирощували впродовж тих самих 30 років, на площі 20 га одержано в середньому 25,4 ц/га, що більше на 8,8 ц/га або у 1,5 рази. Якщо проводити оцінку генотипів на продуктивність і пристосованість за умов депресії продуктивності, то досягти прогресу в селекції дуже складно [12].

Отже, по мірі впровадження мінеральної системи живлення послаблюється творча роль природного добору і звужується можливість відбору генотипів, які поєднують високу продуктивність із стійкістю до негативної дії біотичних та абіотичних факторів зовнішнього середовища.

Багаторічна практика селекційної роботи з викою ярою на Білоцерківській дослідно-селекційній станції вказує на необхідність пошуку нового середовища в якості фону для успішної селекції на адаптивність і продуктивність.

Можливий також варіант рекультиваци діючої селекційної ділянки за принципами біологічного землеробства. Однак це питання потребує детального опрацювання.

Висновки

Включення природного добору як основного компоненту селекційного процесу відіграє важливу роль у виведенні сортів стійких до несприятливих біотичних та абіотичних факторів зовнішнього середовища. Найбільш вірогідним чинником природного добору виступає біоценоз і перш за все ґрунтовий комплекс.

80-ти річна практика селекції вики ярої на Білоцерківській дослідно-селекційній станції свідчить, що в зоні Лісостепу України ефективним суб'єктом природного добору є глибокі, слабовилуговані чорноземи, із вмістом гумусу більше п'яти відсотків, родючість яких формувалась природним шляхом без застосування мінеральної системи удобрення. При тривалому використанні селекційної ділянки, більше трьох ротацій десятипільної сівозміни, в поєднанні із застосуванням мінеральної системи удобрення, ґрунтовий комплекс втрачає здатність ідентифікувати високопродуктивні генотипи стійкі до широкого спектру несприятливих факторів вегетації.

Література

1. Бриггс Ф., Ноулз П. Научные основы селекции растений: перевод с английского Вайсфельд Л.М. и Лашквича Ю.И. / под. общей ред. Г.В. Гуляева – М.: Колос, 1972. – 399 с.
2. Шмальгаузен И.И. Факторы эволюции (теория стабилизирующего отбора). – М.–Л.: Изд. Академии наук СССР, 1946. – 396 с.
3. Молчан И.М., Ильина Л.Г., Кубарев П.И. Спорные вопросы в селекции растений // Селекция и семеноводство. – 1996. – № 1–2. – С. 36–51.
4. Орлюк А.П., Базалий В.В. Принципы трансгрессивной селекции пшеницы. – Херсон, 1988. – 274 с.
5. Рапопорт И.А. Новый метод селекции с одновременным отбором на продуктивность и приспособленность. Новые сорта, созданные методом химического мутагенеза. – М.: Наука, 1988. – С. 3–30.
6. Носко Б.С. Закономерности формирования агрогенного профиля черноземов типичных Лесостепи Украины после распашки целины и многолетней залежи // Почвоведение. – 2013. – № 3. – С. 359–371.
7. Носко Б.С., Гладких Є.Ю., Бабинін В.І., Бурлакова Л.М. Вплив різних факторів і типів ґрунтових процесів на формування фосфатного фонду ґрунтів // Вісник аграрної науки. – 2010. – № 7. – С. 17–22.
8. Стегайло Т.А. Селекция вики яровой на Белоцерковской опытно-селекционной станции // Сборник научных работ Белоцерковской опытно-селекционной станции. – 1958. – С. 185–200.
9. Коваль С.Ф. Комплексный отбор ценных генотипов на провокационном фоне у самоопыляющихся культур // Сельскохозяйственная биология. – 1986. – № 3. – С. 3–13.
10. Сидорчук В.І. Селекция вики яровой и гороха на устойчивость к неблагоприятным (абиотическим) факторам среды // Сборник научных трудов: Селекция и семеноводство зерновых и зернобобовых культур в системе НПО «Сахсвекла». – 1989. – С. 76–82.
11. Сидорчук В.І. Сорта яровой вики с высоким адаптивным потенциалом // Сборник научных трудов: Направления и методы совершенствования селекции зерновых и зернобобовых культур. – 1994. – С. 36–41.
12. Сидорчук В.І., Петриченко С.М. Регрес продуктивності як фактор зниження результативності селекційних досліджень у вики ярої // Фактори експериментальної еволюції організмів. – 2011. – 10. – С. 533–536.

SIDORCHUK V.I.¹, **VASILKIVSKY S.P.**², **HLADKIKH Ye.Yu.**³

¹ Bila Tserkva experimental breeding station,
Ukraine, 09176, Kyiv region, Bila Tserkva district, PV. Mala Vilshanka,
e-mail: v.sidorchuk39@gmail.com

² Bila Tserkva National Agrarian University,
Ukraine, 09117, Kyiv region, Bila Tserkva, Cathedral Square 8/1

³ National Scientific Center “Institute of Soil Science and Agrochemistry Research named after O.N. Sokolovsky”,
Ukraine, 61024, Kharkiv, Chaikovska str., 4, e-mail: ye.hladkikh@ukr.net

ROLE OF NATURAL SELECTION IN MODERN SELECTION

Aims. Introduction of natural selection in selection process is a key task in modern selection as the acquired signs of resistance to varying factors of environment during several cycles of crossing will disappear if such signs each time do not prove to be true in the course of natural selection. **Methods.** Results of selection of spring vetch for the 80-year period from the point of view of influence on selection process of change of a venue of researches were analyzed. **Results.** At double transfer of selection of spring vetch on new sites, in 1966–2010, for the 45-year period 15 grades were zoned, from them 4 served as national standards. Site use leads more than 30 years to a depression of efficiency and decrease in productivity of selection. **Conclusions.** For a maintenance of high level of selection researches it is necessary to provide possibility of change of a selection site, or to carry out a restoration existing, using principles of biological agriculture.
Key words: spring vetch, natural selection, efficiency depression, soil genesis, restoration.

УДК 577.21

СТЕПАНЕНКО А.І.¹, МОРГУН Б.В.¹, ТРОЯНОВСЬКА А.В.², РИБАЛКА О.І.²,
ВЕЛИКОЖОН Л.Г.³

¹ Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України,

Україна, 03680, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 148, e-mail: molgen@icbge.org.ua

² Селекційно-генетичний інститут НААН України,

Україна, 65036, м. Одеса, Овідіопольська дорога, 3, e-mail: alex.rybalka@mail.ru

³ Інститут фізіології рослин і генетики НАН України,

Україна, 03022, м. Київ, вул. Васильківська, 31/17

АЛЕЛЬНІ ВАРІАНТИ ГЕНІВ ПОЛІФЕНОЛОКСИДАЗИ *PPO-A1* ТА *PPO-D1* У СОРТІВ ОЗИМОЇ ПШЕНИЦІ УКРАЇНСЬКОЇ СЕЛЕКЦІЇ

Поліфенолоксидаза (ПФО) – це рослинний фермент, який каталізує окислення фенолів шляхом гідроксилювання і дегідрування з утворенням орто-хінонних сполук, які призводять до небажаного потемніння та знебарвлення макаронних виробів [1], подового хліба [2], парових хлібобулочних виробів [3]. Окрім того висока ПФО активність є також небажаною для більшості класів локшини та продуктів із замороженого тіста, особливо з борошна білозерних сортів пшениці [4].

Отримання сортів пшениці з низькою активністю поліфенолоксидази є важливим завданням селекційних програм пшениці. Складність оцінки селекційного матеріалу на низьку активність ПФО полягає у існуванні значної кількості генетичних локусів, які обумовлюють активність ПФО. Вид м'яка пшениця (*Triticum aestivum* L.) є аллогексаплоїдним, що має три гомеологічні геноми, кожен з яких містить копію будь-якого гена. Також було виявлено, що пшениця містить багато паралогічних *PPO* генів, які виникли шляхом дуплікації і подальших мутацій [5–7].

Активність ПФО зерна пшениці в основному обумовлена генами, розташованими на хромосомах гомологічної групи 2. Виявлено, що гени *PPO-A1* та *PPO-D1*, які локалізовані на плечах хромосом 2AL і 2DL, впливають на ПФО активність і відповідно на стабільність кольору локшини та тіста [8–10].

Крім того була ідентифікована інша паралогічна родина генів, яка складається з генів *PPO-A2*, *PPO-B2* та *PPO-D2*, які також мають значний вплив на рівень активності ПФО [11].

Виявлення алейного поліморфізму генів *PPO-A1*, *PPO-D1*, *PPO-A2*, *PPO-B2* та *PPO-D2* можна здійснювати за допомогою систем молекулярних маркерів, заснованих на полімеразних ланцюгових реакціях (ПЛР) [9, 12].

Про алейний склад генів ПФО у сортів української селекції до цього часу нічого не

відомо. Селекційні програми зі створення білозерних сортів пшениці, які щойно ініційовані в Україні, потребують чіткої характеристики генотипів цінних ліній для ефективної роботи зі створення сортів з низькою активністю ферментів. Отже, метою нашої роботи було впровадження систем молекулярних маркерів для виявлення алейного поліморфізму генів *PPO-A1* та *PPO-D1* в сортах озимої м'якої пшениці української селекції.

Матеріали і методи

Об'єктами дослідження були 82 сорти пшениці вітчизняної селекції наданих Селекційно-генетичним інститутом НААН України і Інститутом фізіології рослин та генетики НАН України.

Загальна ДНК виділялася за допомогою модифікованого ЦТАБ методу [13]. Ідентифікація алелей високої та низької активності ферменту ПФО проводилася за допомогою двох STS маркерів *PPO33* та *PPO29* методом ПЛР з використанням специфічних праймерів [9]. Для мультиплексної ПЛР використовували праймери до референтного гену *TaTM20*, які були обрані згідно [14].

Програма мультиплексної ПЛР для маркеру *PPO33*: початкова денатурація 3 хв при 94 °С, 34 цикли – 30 с. при 94 °С, 30 с. при 59 °С, 1 хв. при 72 °С та 5 хв. фінальна елонгація. Кінцева концентрація праймерів для гену *PPO-A1* у реакції – 0,5 мкМ, для референтного гену *TaTM20* – 0,25 мкМ.

Програма мультиплексної низхідної (Touchdown) ПЛР для маркеру *PPO29*: початкова денатурація 3 хв при 94 °С, 8 циклів – 30 с. при 94 °С, 30 с. при 68 °С (з кожним циклом температура зменшується на 1 °С), 1 хв. при 72 °С та 24 циклів – 30 с. при 94 °С, 30 с. при 61 °С, 1 хв. при 72 °С та 5 хв. фінальна елонгація. Кінцева концентрація праймерів для гену *PPO-D1* у реакції – 0,5 мкМ, для

референтного гену *TaTM20* – 0,3 мкМ.

Розділення продуктів ампліфікації проводили методом горизонтального електрофорезу у 1,2 % агарозному гелі [15].

Результати та обговорення

Скринінг вибірки сортів пшениці вітчизняної селекції здійснювали за допомогою маркерних систем запропонованих *He зі співав.* (2007). Для отримання більш надійних і інформативних результатів тестування нами були розроблені дуплексні ПЛР, в яких у якості референтного виступав ген *TaTM20*.

Результати типової ПЛР з маркером PPO33 наведені на рисунку 1.

Згідно з [9], очікували амплікони розміром 290 та 481 п.н. для алелів *PPO-A1a* та *PPO-A1b* відповідно. Однак, ми спостерігали амплікони

391 та 582 п.н., які підтверджуються аналізом відповідної послідовності гену *PPO-A1* з Генетичного банку (National Center for Biotechnology Information). Однак для деяких сортів (зокрема Гурт, Заграва, Гілея) спостерігали наявність 3-х ампліконів (обидва очікувані та амплікон розміром близько 500 п.н.), що може свідчити про наявність у даних сортах нового функціонального алелю гену *PPO-A1*.

Результати типової ПЛР з маркером PPO29 наведені на рисунку 2.

Для маркеру PPO-29 спостерігали очікуваний амплікон 490 п.н., який свідчить про наявність алелю *b* гену *PPO-D1*. Результати аналізу вибірки сортів та ліній пшениці наведені в таблиці.

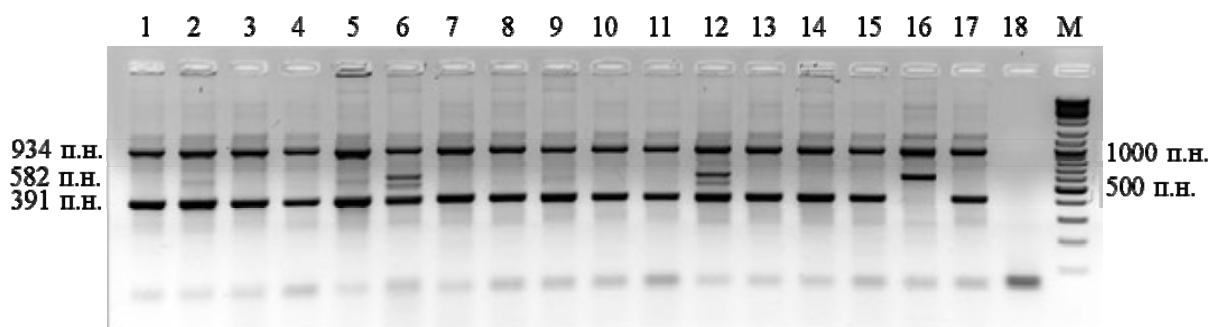


Рис. 1. Електрофореграма результатів мультиплексної ПЛР на маркер PPO33 для виявлення алелів *PPO-A1a* та *PPO-A1b*. Доріжки 1-15 – досліджувані зразки; 16 – позитивний контроль, лінія 3162 КР (*PPO-A1b*); 17 – позитивний контроль, лінія 3118 КР (*PPO-A1a*); 18 – негативний контроль (ТЕ буфер); М – маркер молекулярної маси DNA Ladder Mix

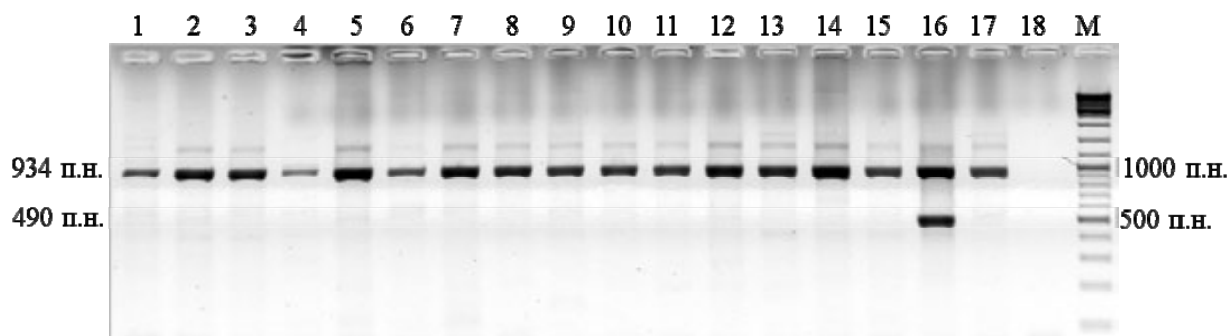


Рис. 2. Електрофореграма результатів мультиплексної ПЛР на маркер PPO29 для виявлення алелю *PPO-D1b*. Доріжки 1-15 – досліджувані зразки; 16 – позитивний контроль, сорт Антонівка (*PPO-D1b*); 17 – позитивний контроль, лінія 311/081 (*PPO-D1a*); 18 – негативний контроль (ТЕ буфер); М – маркер молекулярної маси DNA Ladder Mix.

Таблиця. Результати аналізу 82 сортів пшениці за генами *PPO-A1* та *PPO-D1*

Сорт	<i>PPO-A1</i>	<i>PPO-D1</i>	Сорт	<i>PPO-A1</i>	<i>PPO-D1</i>
Антонівка	a	b	Золотоколоса	a	b
Благодарка	a	b	Солоха	a	b
Борвій	a	b	Смуглянка	a	a
Бунчук	a	b	Славна	a	b
Ватажок	a	b	Чорнява	a	b
Вихованка	a	b	Спасівка	a	a
Вікторія	a	b	Сотниця	a	a
Гармонія	a	b	Полянка	a	b
Господиня	a	a	Борія	a	a
Гурт	a*	b	Гілея	a*	b
Дальницька	a	a	Крижинка	a*	b
Доброчин	a	b	Миронівська 61	a	b
Доброчинна	a*	b	Новокиївська	a	b
Дюк	a	b	Трипільська	a	b
Епоха	a	b	Миронівська 65	a	b
Єдність	b	a	Щедрівка Київська	a	a
Жайвір	a	b	Білява	b	a
Журавка	a	b	Українська 246	a	a/b
Заграва	a*	b	Безоста 1	a	a
Задумка	a	b	Хист	a	b
Заможність	a	b	Поліська 90	a	a
Запорука	a	b	Донецька 48	a	a
Звитяга	a	a	Ліра	a	a
Землячка	a	b	Місія	a	a
Зиск	a	b	Небокрай	a	b
Зміна	a	b	Нива Одеська	a	b
Знахідка	a	b	Ніконія	a	b
Зорепад	a	b	Одеська 265	a	a
Істина	a	a	Одеська 267	a	a
Кірія	a	b	Одеська 51	a	a
Княгиня Ольга	a	b	Отаман	a	a
Косовиця	a	b	Пилипівка	a	a
Красень	a	b	Повага	a	b
Куяльник	a	b	Подяка	a	b
Лад	a	b	Польовик	a	b
Лановий	a	b	Пошана	a	b
Лебідка	a	b	Селянка	a	b
Литанівка	a	b	Скарбниця	a	a
Люна	a	a	Соната	a	a
Соната	a	a	Ужинок	a	a
Турунчук	a	b	Українка	a	b

Примітка: a – алелі *PPO-A1a* та *PPO-D1a*; b – *PPO-A1b* та *PPO-D1b*; a* – новий функціональний алель, для якого спостерігали наявність 3-х ампліконів.

З джерела [9] відомо, що за низьку ПФО активність відповідають алелі *PPO-A1b* та *PPO-D1a*. В результаті дослідження вибірки 82 сортів було виявлено алель *PPO-A1b* лише у сортах Єдність та Білява (український районований сорт білозерної пшениці), що складає 2,4 % загальної вибірки. У сортах Гурт, Добročинна, Заграва, Гілея та Крижинка (6 % разом) спостерігали появу нетипового алелю *PPO-Aa**. В інших сортах наявний алель *PPO-A1a*, який визначає високий рівень активності ПФО.

У 26 сортах вибірки (31,7 %) був визначений алель *PPO-D1a*, який обумовлює високоактивну ПФО, у решти – алель *PPO-D1b*. У сорті Українська 246 спостерігали наявність алелів обох типів.

Висновки

За допомогою розроблених мультиплексних ПЛР на основі STS маркерів PPO33

PPO29 була проаналізована вибірка сортів озимої м'якої пшениці української селекції на розповсюдження алельних варіантів генів *PPO-A1* та *PPO-D1*, які обумовлюють активність поліфенолоксидази. Виявлено, що алелі *PPO-A1b* та *PPO-D1a*, які визначають низькоактивну ПФО, наявні у 2,4 та 31,7 % перевірених сортів відповідно. Це свідчить про невисоку частоту поширення алелів низької активності ПФО зерна серед вітчизняних сортів. Так лише сорти Білява та Єдність несуть обидва низькоактивні алелі. Був виявлений новий можливий алель гену *PPO-A1*, визначення фізіологічної ролі якого потребує подальших досліджень шляхом секвенування та біохімічних тестів. Отримана в даній роботі інформація про алельний стан генів *PPO* дозволить посилити ефективність селекції м'якої озимої пшениці в напрямку отримання сортів з низьким рівнем ПФО зерна.

Література

1. Simeone R., Pasqualone A., Clodoveo M.L., Blanco A. Genetic mapping of polyphenol oxidase in tetraploid wheat // *Cell Mol Biol Lett.* – 2002. – 7. – P. 763–769.
2. McCallum J.A., Walker J.R.L. O-diphenol oxidase activity, phenolic content and colour of New Zealand wheats, flours and milling streams // *J Cereal Sci.* – 1990. – 12. – P. 83–96.
3. Dexter J.E., Preston K.R., Matsuo R.R., Tiples K.H. Development of a high extraction flour for the GRL Pilot Mill to evaluate Canadian wheat potential for the Chinese market // *Can Inst Food Sci Technol.* – 1984. – 14. – P. 253–259.
4. Feillet P., Autran J.C., Icard-Verniere C. Pasta brownness: an assessment // *J Cereal Sci.* – 2000. – 32. – P. 215–233.
5. Fuerst E.P., Xu S.S., Beecher B. Genetic characterization of kernel polyphenol oxidase in wheat and related species // *J Cereal Sci.* – 2008. – 48. – P. 359–368.
6. Jukanti A.K., Bruckner P.L., Fischer A.M. Evaluation of wheat polyphenol oxidase genes // *Cereal Chem.* – 2004. – 81. – P. 481–485.
7. Massa A.N., Beecher B., Morris C.F. Polyphenol oxidase (P.O) in wheat and wild relatives: molecular evidence for a multigene family // *Theor Appl Genet.* – 2007. – 114. – P. 1239–1247.
8. Chang C., Zhang H.P., Xu J., You M.S., Li B.Y., Liu G.T. Variation in two P.O genes associated with polyphenol oxidase activity in seeds of common wheat // *Euphytica.* – 2007. – 154. – P. 181–193.
9. He X.Y., He Z.H., Zhang L.P., Sun D.J., Morris C.F., Fuerst E.P. Allelic variation of polyphenol oxidase (P.O) genes located on chromosomes 2A and 2D and development of functional markers for the P.O genes in common wheat // *Theor Appl Genet.* – 2007. – 115. – P. 47–58.
10. Sun D.J., He Z.H., Xia X.C., Zhang L.P., Morris C.F., Appels R., Ma W.J., Wang H. A novel STS marker for polyphenol oxidase activity in bread wheat // *Mol Breed.* – 2005. – 16. – P. 209–218.
11. Beecher B.S., Skinner D.Z. Molecular cloning and expression analysis of multiple polyphenol oxidase genes in developing wheat (*Triticum aestivum*) kernels // *J. Cereal Sci.* – 2011. – 53. – P. 371–378.
12. Beecher B.S., Carter A.H., See D.R. Genetic mapping of new seed-expressed polyphenol oxidase genes in wheat (*Triticum aestivum* L.) // *TAG.* – 2012. – 124. – P. 1463–1473.
13. Stewart C.N., Via L.E. A rapid CTAB DNA isolation technique useful for RAPD fingerprinting and other PCR applications // *BioTechniques.* – 1993. – 14 (5). – P. 748–749.
14. Kim Y.-Y., Kim D.-Y., Shim D. et al. Expression of the novel wheat gene TM20 confers enhanced cadmium tolerance to bakers' yeast // *J. of Biol. Chem.* – 2008. – 283 (23). – P. 15893–15902.

STEPANENKO A.I.¹, MORGUN B.V.¹, TROYANOVSKA A.V.², RYBALKO O.I.², VELYKOZHON L.G.³

¹ Institute of Cell Biology and Genetic Engineering, National Academy of Sciences of Ukraine, Ukraine, 03680, Kyiv, Akademika Zabolotnogo str., 148, e-mail: molgen@icbge.org.ua

² The Plant Breeding and Genetics Institute – National Center of Seed & Cultivar Investigation of the Ukrainian Academy of Agricultural Sciences, Ukraine, 65036, Odesa, Ovidiopolska road, 3, e-mail: alex.rybalka@mail.ru

³ Institute of Plant Physiology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine, Ukraine, 03022, Kyiv, Vasylykivska str., 31/17

POLYPHENOL OXIDASE GENES *P.O-A1* AND *P.O-D1* VARIATION AMONG UKRAINIAN WINTER WHEAT (*T. AESTIVUM* L.) CULTIVARS

Aims. Polyphenol oxidase (P.O), a ubiquitous enzyme in plants, is associated with browning and discoloration of breeding products such as pan bread, steamed bread, pasta, foodstuff of freezing dough. There are five genes that control the P.O activity: *P.O-A1*, *P.O-D1*, *P.O-A2*, *P.O-B2* and *P.O-D2*. Genes *P.O-A1*, *P.O-D1* can occur in several allelic variants: alleles of high activity (*P.O-A1a* and *P.O-D1b*), alleles of low activity (*P.O-A1b* and *P.O-D1a*) which encode different types of P.O enzymes. **Methods.** The most reliable way to assess the allelic state of P.O gene is molecular identification STS markers P.O33 and P.O29.

Results. Among the studied wheat by codominant and dominant molecular markers two varieties (Bilyava and Ednist) carrying low activity *P.O-A1*, *P.O-D1* alleles and 26 varieties containing one low activity allele *P.O-D1a* were identified. **Conclusions.** The results of the study can be used efficiently to identify genotypes with low P.O activity in wheat breeding.

Key words: *Triticum aestivum* L., *P.O* genes, molecular markers, marker-assisted selection.

УДК 579:577.6

СУПРУН С.М.¹, ДОНЧЕНКО Г.В.¹, ПАРХОМЕНКО Ю.М.¹, ХАРКЕВИЧ Е.С.², КУРЧЕНКО И.Н.², АРЕТИНСКАЯ Т.Б.³, СТЕПАНЕНКО С.П.¹, КРАВЧЕНКО О.А.³

¹ Институт биохимии им. А.В. Палладина НАН Украины,

Украина, 01601, г. Киев, ул. Леонтовича, 9, e-mail: sst@biochem.kiev.ua

² Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины, Украина, ГСП Д 0368, г. Киев, ул. Заболотного, 154

³ Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины, Украина, 03041, г. Киев, ул. Героев обороны, 15

ЛЕЧЕБНО-ПРОФИЛАКТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЦИНКСОДЕРЖАЩЕЙ ВИТАМИННО-ПРОТЕИНОВОЙ ДОБАВКИ

Микромицеты благодаря уникальным физиолого-биохимическим свойствам являются основными продуцентами в биотехнологии – используются для получения лекарственных препаратов в медицине, в сельском хозяйстве, рациональном природопользовании. На их основе была создана новая область медицины – фармацевтическая микология. Грибы содержат белок, сходный по аминокислотному составу с животным, богаты витаминами, коферментами, а также синтезируют биологически активные вещества, перспективные для профилактики и лечения целого ряда патологических состояний. На основе грибов различных таксонов могут быть получены ферменты, витамины, антибиотики, полисахариды и лекарственные

средства, обладающие иммуномодулирующей и противоопухолевой активностью. От других богатых белком продуктов питания грибы выгодно отличаются низкой калорийностью и наличием пищевых волокон, что является одним из оснований их использования в качестве кормовых добавок. Грибы технологичны: нетребовательны к субстрату, обладают довольно высокой скоростью роста. Однако они требуют для своего роста и накопления биомассы внесения в среду ряда микроэлементов, в частности цинка [1–4]. Испытание наномерных биогеенных металлов в сельском хозяйстве дало положительный результат. Благодаря использованию достижений современных технологий удалось

синтезировать нанокарбоксилаты пищевых кислот биогенных металлов [5, 6]. Совместное их использование с биологически активными веществами грибов изучено не было.

Цель исследований: получение цинксодержащей лечебно-профилактической добавки на основе селекционированных штаммов-продуцентов микроскопических грибов с целью применения в животноводстве.

Материалы и методы

В работе был использован метод поэтапной селекции микромицетов и получены штаммы – белково-витаминные продуценты: *Mycelia sterilia* (white) ИМВ F-100014, *Penicillium sclerotiorum* F-100015, *Fusarium sambucinum* F-139, *Fusarium sambucinum* ИМВ F-100011. Штаммы депонированы и хранятся в депозитории Украинской коллекции микроорганизмов (ИМВ НАН Украины).

Исследованные микромицеты выращивали на минеральной среде Чапека с мелассой (1 % по р.в.) в качестве единственного источника углерода и добавлением наноаквахелата цинка (1–2 г/л). Посевной материал (инокулят) готовили в колбах Эрленмейера на качалках при 240 об/мин в течение 24 часов. Культивирование проводили вышеуказанным способом 72 часа в колбах или в производственных условиях с использованием ферментера емкостью 1,2 м³ 28–30 часов (ПП БТУ – Центр, г. Ладыжин). Среду для ферментации стерилизовали в автоклаве при 1–1,5 атм. в течение 30 мин и засеивали 5 %-ным инокулятом. Получено две формы препарата – порошкообразную и жидкую (с использованием термической обработки). В опытах с нанопрепаратом цинка добавляли 1–2 мл/л водного раствора наноаквахелата цинка в концентрации 3–5 г/л. Определение витаминов и других биологически активных веществ проводили с использованием стандартных методов [7, 8], аминокислоты – на аминокислотном анализаторе ААА–339 (Чехия). Содержание хитина в биомассе определяли по разнице количества N-ацетилглюкозамина после гидролиза 2 и 6 N соляной кислотой и производили перерасчет количества глюкозамина на хитин с использованием коэффициента 1.17 [9, 10].

Разделение липидов на фракции проводили методом тонкослойной хроматографии на пластинках, покрытых силикагелем. Метилловые эфиры жирных кислот (МЭЖК) растворяли в гексане и хроматографировали на хроматографе HRGC 5300 (Италия) на стеклянной набивной колонке 3,5 м, започне-

нной Chromosorb W/HP с нанесенной 10 % жидкой фазой Silar 5CP при программированной t^c 140–250°C, с нарастанием 2° мин. Идентификацию индивидуальных жирных кислот проводили с помощью стандартов фирмы «Sigma» и «Serva». Содержание индивидуальных жирных кислот выражали в процентах от общей суммы [11]. Опыты по доклиническому испытанию препарата проводили на насекомых, рыбах и перепелах. Корм гусениц дубового шелкопряда Полеский тасар обрабатывали жидкой формой препарата. В эксперименте с личинками карпа использовали группы по 20 особей, весом 300 мг каждая. Эксперимент по изучению стрессостойкости проводили при отсутствии аэрации и корма. В опытные группы особей, содержащихся в озерной воде, добавляли по 5 мл препарата с различной концентрацией цинка (2 и 3 мл/л), контролем служил препарат без цинка и вода. В опыте с перепелами (каждая по 20 особей) к основному рациону вносили добавку в количестве 2,0; 4,0; 6,0 г/особь; длительность эксперимента составляла 60 суток. В опытах на животных использовали методы биохимического и иммунологического анализа [12].

Результаты и обсуждение

Нами были исследованы физиолого-биохимические свойства полученных штаммов. Для получения витаминно – протеинового препарата путем совместного культивирования подобраны следующие штаммы грибов: *Fusarium sambucinum* F-100011 – продуцент витамина PP (никотиновой кислоты) и его производных, а также штамм *Fusarium sambucinum* F-139 – продуцент CoA и белка. Удельная скорость роста данных штаммов составляла 0,28–0,35 ч⁻¹.

Штаммы синтезировали комплекс незаменимых аминокислот. Так, у *F. sambucinum* F-100011 общая сумма аминокислот составляла 27,68 мг % биомассы, с преобладанием лизина, дейцина, аспарагиновой кислоты, а у *F. sambucinum* F – 139–25 мг % биомассы, с преобладанием глутаминовой и аспарагиновой кислот. У *F. sambucinum* F-100011 идентифицировано 26 жирных кислот, из насыщенных – пальмитиновая (до 14 %) и пальмитолеиновая, а из полиненасыщенных (76 %) жирных кислот – олеиновая (23,2 %), линолевая (46,2 %), линоленовая (6,95 %) и арахидоновая (2,0–6,0 %), являющиеся предшественниками простагландинов и входящие в состав структурных элементов мембран.

Цинксодержащая витаминно-протеиновая добавка представляет собой комплекс

природных биологически активных веществ (витаминов, коферментов, незаменимых аминокислот, микроэлементов, ненасыщенных жирных кислот). Он содержит значительное количество никотиновой кислоты и ее производных, в частности NAD^+ (6,0 мг/г а.с.в.), CoA (2,0 мг/г а.с.в.), витаминов Е и В₁₂. Известно, что цинк входит в состав ферментов, активирующих восстановительные процессы в тканях. Таким образом, входящие в состав препарата вещества обуславливают его высокую биологическую активность, антиоксидантные и иммуномодулирующие свойства.

Была проведена проверка действия препарата на иммунологические, паразитологические, биохимические показатели рыб, насекомых и перепелов. В эксперименте по обработке личинок рыб препаратом снижалось поражение сапролегниозом, значительно повышалась стойкость к заболеваниям по сравнению с контролем в условиях отсутствия аэрации и корма. (рис.). Титр природных антител в сыворотке рыб подопытных групп в основном изменялся в пределах 3,12–3,46. Под действием препарата титр комплемента

снижался до 2,90, тогда как у рыб контрольной группы он равнялся 4,42, что свидетельствует о возрастании неспецифического иммунитета. Введение препарата оказывало протекторное действие и заметно снижало обычный уровень зараженности паразитами.

Использование цинксодержащей витаминно-протеиновой добавки сокращало средний период кормления гусениц, количество погибших особей снижалось на 18 % по сравнению с контролем. Выход качественных коконов увеличивался на 31 % (табл. 1). У гусениц дубового шелкопряда при применении препарата наблюдалось улучшение производственных показателей, снижение заболеваемости ядерным полиэдрозом.

При испытании добавки на перепелах отмечено стабильное увеличение прироста живой массы на 10,5 %, повышение бактерицидной (БАСК) и лизоцимной (ЛАСК) активности сыворотки крови (табл. 2). Содержание гемоглобина увеличивалось на 6,2 %, повышалась выживаемость особей, особенно молодых.

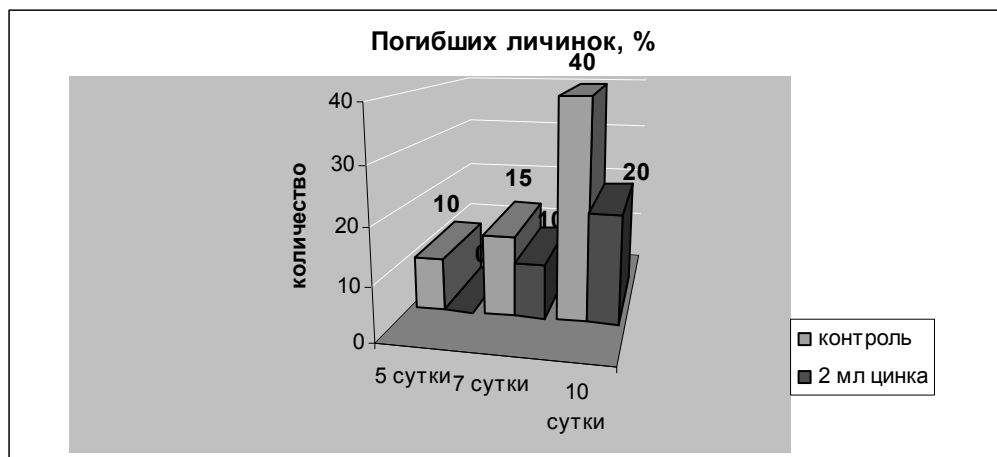


Рис. Влияние цинксодержащей витаминно-протеиновой добавки на выживаемость личинок карпа

Таблица 1. Влияние цинксодержащего витаминно-протеинового препарата на биологические показатели дубового шелкопряда

Вариант	Средний период кормления гусениц, сутки	Погибших гусениц, %	Выход качественных коконов, %	Средняя масса, мг % к контролю			
				кокона		оболочки	
				самки	самцы	самки	самцы
Zn 2 мл/л	42,0 ± 0,48	0,5	96,0	7026	5006	618	564
Zn 3 мл/л	42,6 ± 0,50	0,7	95,2	6970	4992	608	558
препарат без Zn	46,1 ± 0,51	2,5	90,0	6687	4383	580	528
контроль (без обработки)	50,0 ± 0,80	18,5	65,0	6088	4600	458	462

Таблица 2. Бактерицидная и лизоцимная активность сыворотки крови перепелов после применения препарата через 60 суток ($M \pm m$, $n = 20$)

Показатели	Группы перепелов								
	Контроль	Опыт 1	%	Опыт 2	%	Опыт 3	%	Опыт 4	%
БАСК, %	12,60±0,28	13,05±0,33	3,5	14,50±0,41	15,0	13,60±0,58	7,9	13,35±0,42	5,9
ЛАСК, %	15,70±0,54	16,30±0,39	3,8	18,76±0,61	19,4	17,40±0,67	10,8	16,45±0,51	4,7

Выводы

Полученные результаты свидетельствуют о том, что высокая биологическая ценность витаминно-протеиновой добавки определяется не только значительным содержанием витамином группы В (никотиновой, пантотеновой кислот), незаменимых аминокислот, ненасыщенных жирных кислот, но также использованием наноаквахелата цинка.

Результаты доклинического испытания

грибного препарата показали улучшение роста и развития животных, их выживаемости, улучшение биохимических и иммунологических характеристик, что позволяет прогнозировать эффективность использования цинксодержащей витаминно-протеиновой добавки как лечебно-профилактического средства для повышения производительных показателей и природной резистентности сельскохозяйственных животных.

Литература

1. Hobbs Ch. Medicinal mushrooms an exploration of tradition healing and culture. – Botanica press. Santa Cruz С.А., 1995. – 251 p.
2. Беккер З.Е. Физиология и биохимия грибов. – М.: Изд-во Моск. ун-та, 1988. – 260 с.
3. Скворцова М.М., Горшина Е.С., Макарова М.А., Качалай Д.П. Мипро-вит – грибной препарат иммуномодулирующего и антиоксидантного действия // I съезд микологов России. (Москва, март 2001 г.). – Тез. докл. – М.: Национальная Академия Микологии, 2002. – С. 256.
4. Феофилова Е.П., Немцев Д.В., Терешина В.М., Козлов В.П. Полиаминосахариды мицелиальных грибов: новые биотехнологии и перспективы практического использования // Прикл. биох. микробиол. – 1996. – 32, № 5. – С. 483–492.
5. Копилевич В.А., Максін В.І., Каплуненко В.Г., Косинов М.В. Функциональные наноматериалы для потребностей сельского хозяйства // Вісник НАУ. – 2008. – № 130. – С. 349–354.
6. Аретинська Т.Б., Трокоз В.О., Максін В.І., Каплуненко В.Г., Косинов М.В. Ефективність використання наноаквахелатів мікроелементів при вирощуванні дубового шовкопряда // Біологія тварин. – 2009. – 11, № 12. – С. 312–315.
7. Экспериментальная витаминология, под ред. Островского Ю.М. – Минск: Наука и техника, 1979. – 546 с.
8. Методы экспериментальной микологии / под ред. В.И. Билай. Справочник. – Киев: Наук. думка, 1982. – 583 с.
9. Johnson A.R. Improved method of hexosamine determination // Anal. Biochem. – 1971. – 44, N 2. – P. 628–635.
10. Петрушко Г.М., Калужный М.Я. Хитин дрожжеподобных организмов рода *Candida* // Прикл. биох. микробиол. – 1971. – 7, № 6. – С. 637–642
11. Байдалинова Л.С., Кривич В.С., Бахлодина Л.П. Методические рекомендации и указания по газовой хроматографии жирных кислот. – Калининград, 1977. – 33 с.
12. Коцюмбас І.Я. Доклінічні дослідження ветеринарних лікарських засобів. – Львів: Тріада плюс, 2006. – 360 с.

SUPRUN S.M.¹, DONCHENKO G.V.¹, PARKHOMENKO J.M.¹, KHARKEVICH E.S.², KURCHENKO I.N.², ARETINSKAYA T.B.³, STEPANENKO S.P.¹, KRAVCHENKO E.B.³

¹ Palladin Institute of Biochemistry of NAS of Ukraine, Ukraine, 01601, Kiev, Leontovycha str., 9, e-mail: sst@biochem.kiev.ua

² D.K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology NAS of Ukraine, Ukraine, Kiev, Zabolotnogo str., 154

³ National University of life and environment science of Ukraine, Ukraine, Kiev, Heroiv oborony str., 15

MEDICINAL-PREVENTATION PROPERTIES OF VITAMIN-PROTEIN ZINC CONTAINING PRODUCT

Aims. Preparation of zinc containing vitamin and protein supplement based on the selection strains producers of vitamins, coenzymes and studying its effect on the performance and viability of animal productivity.

Methods Morphological, physiological and biochemical properties for selection strain mycelial fungi-producing protein, vitamins и other biologically active substances have been studied, using of known methods. Modern methods have been used to for preclinical animal trials. **Results.** Established the strains of *Fusarium sambucinum* F-10011F F-139 have a high growth rate of 0.28–0.34 hour⁻¹, rich in essential amino acids, unsaturated fatty acids such as oleic, linoleic, linolenic and arachidonic have been detected. Especially valuable presence in fungi arachidonic acid which is a precursor of prostaglandins in the body of animals and humans. The biotechnology of biopreparation obtaining based on physiology-biochemical properties was developed using joint cultivation of selected strains of *Fusarium sambucinum*. The preparation has high content of vitamins, unsaturated fatty acids and other biologically active substances a but and zinc nanoakvahelat. The results of preclinical testing of fungal product have revealed a positive impact not only on the growth of living biomass but also to increase to organism resistance to various infections diseases increase bakteriatsidnoy and lysozyme aktivnosti of blood serum, and this led to increased survival of juveniles **Conclusions.** The resulting protein-vitamin supplement containing zinc nanoakvahelat urluchay biochemical and immunological characteristics of animals. The experimental data allow to predict the effectiveness of using supplements as treatment and prevention to improve performance indicators and the natural resistance of farm animals.

Key words: biotechnology, vitamins, protein, food additiv.

УДК 57.085.23

ТАНАСІЄНКО І.В.¹, БУЗІАШВІЛІ Н.², ЄМЕЦЬ А.І.¹, БЛЮМ Я.Б.¹

¹ Державна Установа «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України», Україна, 04123, м. Київ, вул. Осиповського, 2а, e-mail: iratanasoenko@gmail.com

² Київський національний університет ім. Тараса Шевченка ННЦ «Інститут біології», Україна, 01601, м. Київ, вул. Володимирська, 64/13

АГРОБАКТЕРІАЛЬНА ТРАНСФОРМАЦІЯ ТОМАТІВ (*SOLANUM LYCOPERSICON*) ГЕНОМ ЛАКТОФЕРИНУ ЛЮДИНИ

У результаті взаємодії із навколишнім середовищем рослини організми зазнають впливу негативних абіотичних та біотичних факторів. Їх здатність протистояти стресовим умовам та адаптуватись до них, зберігаючи власний життєвий потенціал, залежить від реалізації захисних механізмів організму. Для багатьох сільськогосподарських культур, зокрема томатів, проблема комплексної довготривалої стійкості до цих стресових факторів досі не вирішена [2]. Оскільки плоди томатів широко використовують у харчуванні без попередньої термічної обробки, застосування традиційних хімічних засобів боротьби із фітопатогенами рослин, таких як інсектициди, фунгіциди та ін., значно обмежується, тоді як втрати врожаю внаслідок хвороб та ушкодження рослин і плодів шкідниками досягають 80%. Окрім того, додаткову загрозу для здоров'я людини становить вживання контамінованих продуктів, внаслідок синтезу патогенами токсинів, наприклад мікотоксинів, що характеризуються канцерогенними, мутагенними, тератогенними,

ембріотоксичними, алергічними, імуносупресорними ефектами [1].

Для вирішення даної проблеми необхідна селекція стійких до фітопатогенів сортів рослин. Однак томати вражаються більш ніж п'ятнадцятьма видами збудників хвороб, не враховуючи широкого ряду шкідників, що послаблюють захисну систему рослин та роблять плоди не придатними для використання в їжу. Альтернативою створенню сортів стійких до певних видів і штамів мікроорганізмів є підвищення системної стійкості рослин до широкого спектру патогенів та несприятливих факторів абіотичного походження. Для досягнення поставленого завдання використовують технології переносу протимікробних генів, зокрема лактоферину, до рослин-реципієнтів [7]. Лактоферин – глікопротеїн молекулярною масою 80 кДа, віднесений до родини трансферинів завдяки його здатності приєднувати та переносити іони заліза, секретується в організмі людини разом із молоком, слиною, жовчю, шлунковим соком, носовим слизом, сльозами, вагінальним

секретом [6]. Цей білок характеризуються широким спектром біологічної активності, включаючи антибактеріальну, протівірусну, протизапальну та імуномодулюючу функції [6] та є перспективним для привнесення в рослини-реципієнти.

Матеріали та методи

Рослинний матеріал та середовище. Для експериментів було використано насіння томатів сорту Манімейкер (Moneymaker). Насіння стерилізували у 5 %-ному розчині гіпохлориду натрію протягом 20 хв, після чого відмивали у стерильній дистильованій воді (чотири рази по 10 хв). Після відмивання насіння підсушували на фільтрувальному папері та висаджували на середовище Мурашіге та Скуга [8]. Як експланти використовували гіпокотилі, сім'ядольні листки та апікальну меристему 7-и денних проростків. Кожен гіпокотиль розрізали лезом на фрагменти довжиною 3–4 мм, сім'ядольні листки також розрізали перпендикулярно до центральної жилки на 2–3 частини в залежності від розміру кожного окремого листка.

Для ініціації регенерації рослин перераховані типи експлантів вирощували на базовому середовищі МС (бМС) – солі МС [8], сахароза 30 г/л, міо-інозитол 100 мг/л, нікотинова кислота 0,5 мг/л, піридоксин 0,5 мг/л, тіамін-НСІ 1 мг/л, гліцин 2 мг/л, доповненому різними фітогормонами:

1. Середовище МСТ1: бМС, доповнене 2 мг/л зеатину та 0,1мг/л індоліл-3-оцтовою кислотою (ІОК)

2. Середовище МСТ2: бМС, доповнене 2 мг/л 6-бензиламінопурину (БАП) та 0,2 мг/л ІОК.

Висаджені експланти культивували при температурі 24°C та 16-годинному фотоперіоді. Ефективність регенерації рослин фіксували через місяць після висадження експлантів на середовище із фітогормонами. Частоту регенерації пагонів визначали як співвідношення кількості пагонів, що регенерували, до загальної кількості висаджених експлантів томату. Після того, як пагони досягали розмірів 2–3 см в довжину, їх переносили для подальшого вкорінення на живильне середовище того ж складу (бМС), але без додавання фітогормонів. У дослідах використовували по 100 експлантів кожного типу. Вкорінені рослини-регенеранти розміром 7–8 см висаджували у ґрунт.

Бактеріальні штами та плазміни. Для

проведення агробактеріальної трансформації томату було створено конструкцію рВІN35LF (рис.), що містила ген лактоферину людини (*hLF*) під контролем 35S промотору мозаїки цвітної капусти та ген стійкості до канаміцину (*nptII*) як селективний маркерний ген. Вектор було створено на базі плазмід рAFT 105 та рВІNAR. Плазмиду було привнесено до супервірулентного штаму *Agrobacterium tumefaciens* ЕНА105.

Підбір ефективних концентрацій селективного агенту. Оскільки для трансформації томатів використовували різні типи експлантів, то попередньо були визначені селективні концентрації канаміцину. Антибіотик тестували в діапазоні концентрацій від 10 мг/л до 100 мг/л, ефективність концентрацій оцінювали за здатністю калюсних клітин виживати, проліферувати та регенерувати повноцінні пагони у присутності різних концентрацій селективного агенту.

Агробактеріальна трансформація томат. Культуру агробактерій вирощували на середовищі LB [11], що містило 100 мг/л канаміцину, протягом двох діб на шейкері при температурі +28 °С. Для трансформації томатів всі перераховані вище типи експлантів інокулювали із суспензією бактеріальних клітин відразу після ізолювання, через 2 доби або 15 діб культивування. Трансформовані експланти переносили до термостату на 2-і доби та культивували при температурі +28 °С. Після ко-культивування експланти переносили на свіже живильне середовище для калюсогенезу та регенерації, доповнене 500 мг/л цефотаксиму для елімінації бактерії та 50 мг/л канаміцину (селективний агент). Пасаж культури проводили кожен місяць.

Результати та обговорення

Ефективне перенесення чужинної ДНК у клітини-мішені та їх подальша регенерація є одним із основних етапів успішної генетичної трансформації рослин, зокрема томату. Тож на першому етапі досліджень було вивчено регенераційний потенціал різних типів експлантів: гіпокотилів, сім'ядольних листків та апікальної меристеми томатів, що найчастіше використовуються для агробактеріальної трансформації цієї сільськогосподарської культури [3–5, 9, 10,]. Для дослідження регенераційного потенціалу всіх вище перерахованих експлантів використовували середовище на основі МС [8], доповнене двома різними комбінаціями фітогормонів (табл.).

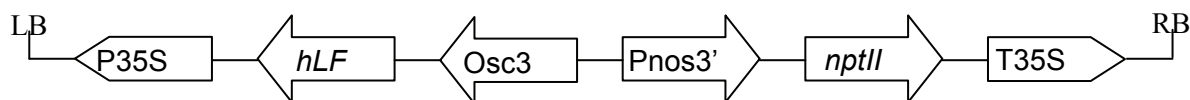


Рис. Схема Т-ДНК конструкції рВІN35LF. LB та RB – ліва та права границі Т-ДНК, Р 35S – промотор вірусу мозаїки цвітної капусти; *hLF* – ген лактоферину людини, *Osc3* – октопіновий термінатор, Р *pos3'* – нопаліновий промотор, *nptII* – ген неоміцин-фосфотрансферази II; T35S – термінатор вірусу мозаїки цвітної капусти.

Таблиця. Ефективність регенерації рослин томатів із різних типів експлантів

Тип експлантів Концентрація фітогормонів	Частота регенерації, %		
	Гіпокотилі	Сім'ядольні листки	Апікальна меристема
ЗТ - 2мг/л ІОК - 0,1мг/л	94,9%	50%	100%
БАП - 2мг/л ІОК - 0,2мг/л	35,2%	33,4%	100%

Протягом кількох діб культивування гіпокотилів та сім'ядольних листків на середовищах МСТ1 та МСТ2 спостерігали збільшення експлантів внаслідок активної проліферації клітин. Через 7–10 діб починалось формування калусної тканини на рановій поверхні експлантів. Отриманий калус характеризувався високим морфогенетичним потенціалом, в результаті чого через 20–25 діб культивування спостерігали формування точок регенерації з наступним розвитком пагонів. Однак незважаючи на інтенсивний калусогенез на середовищі МСТ2 отриманий калус характеризувався нижчим регенераційним потенціалом у порівнянні із калусом, отриманим на середовищі МСТ1. Проте у разі перенесення експлантів на середовище МСТ1, що містило зеатин, фіксували підвищення ефективності регенерації обох типів експлантів. Так ефективність регенерації із гіпокотилів та сім'ядольних листків на середовищі, що містило зеатин, складала 94,9 % та 50 %, відповідно. У той час як на живильному середовищі, що містило БАП, регенераційний потенціал експлантів томату знаходився на рівні 35,2 % для гіпокотилів та 33,4 % для сім'ядольних листків (табл.). Слід відзначити, що апікальна меристема ефективно регенерувала у повноцінні фертильні рослини на обох типах середовищ,

минаючи стадію калусогенезу. Слід також відзначити, що на середовищі МСТ2 через 15 діб культивування спостерігали інтенсивний розвиток коренів із калусної тканини. На середовищі, доповненому зеатином, подібного ризогенезу не фіксували.

Встановлення ефективної селективної концентрації канаміцину. Для визначення селективних концентрацій було проведено оцінку впливу канаміцину (10–100 мг/л) на процеси морфогенезу гіпокотилів, сім'ядольних листків та апікальної меристеми. Для цього на середовище МСТ1, доповнене канаміцином у різних концентраціях, висаджували по 20 експлантів. Експерименти проводили у трьох повторностях. Було встановлено, що в перший тиждень культивування експланти, як і у випадку культивування на звичайному живильному середовищі без антибіотику, характеризувались активною проліферацією клітин. Через 10–15 діб культивування спостерігали етіювання гіпокотилів та сім'ядольних листків, в той час як із апікальної меристеми розвивались фенотипово повноцінні пагони. Проте через місяць після початку культивування на селективному середовищі у рослини-регенерантів, отриманих із апікальної меристеми, також спостерігали ознаки руйнування хлорофілу. Таким чином, через 30

діб після початку експерименту всі типи експлантів гинули вже при концентрації діючої речовини 50 мг/л. Найбільш чутливими до впливу антибіотику виявились гіпокотилі томату. Ознаки проліферації їх клітин зникали через тиждень після початку культивування на середовищі, що містило 25 мг/л канаміцину. На відміну від гіпокотилів, сім'ядольні листки зберігали проліферативну активність протягом 15 діб культивування за цих же умов. Однак через місяць після висадження даного типу експлантів на середовище, що містило 25 мг/л селективного агента, з'являлись ознаки некротизації тканин. На середовищі із 100 мг/л канаміцину після 30 діб культивування виживали окремі фрагменти тканин, що гинули впродовж наступних 10 діб культивування на свіжому середовищі. Отже для подальшої роботи із генетичної модифікації томатів використовували 50 мг/л канаміцину.

Трансформація гіпокотилів, сім'ядольних листків та апікальної меристеми томату геном лактоферину людини. Для агробактеріальної трансформації томатів штамом *A. tumefaciens* ENA105, що містив вектор pBIN35LF, використовували по 75 експлантів кожного типу. Щойно ізольовані експланти томату інокулювали із суспензією клітин бактерії та ко-культивували протягом двох діб у термостаті при 28°C. Для елімінації бактерії та підвищення життєздатності експлантів тканину після трансформації відмивали у стерильній дистильованій воді, підсушували на фільтрувальному папері та висаджували на середовище, доповнене цефотаксимом та канаміцином. Для рівномірного доступу поживних речовин та антибіотику до рослинних тканин експланти занурювали у шар живильного середовища. Із-за формування шару бактеріальних клітин на поверхні експлантів через 3–4 доби після відмивання тканини проводили повторне відмивання експлантів у стерильній дистильованій воді та підвищували вміст цефотаксиму у живильному середовищі до 700 мг/л. Однак не зважаючи на зміни концентрації антибіотику інфіковані тканини

гинули через два тижні після інокуляції в суспензії бактеріальних клітин.

Оскільки щойно ізольовані експланти томату виявились надзвичайно чутливими до впливу бактерії, надалі проводили прекультивуацію гіпокотилів та сім'ядольних листків на середовищі МСТ1 протягом 2-х та 15-ти діб. Тобто в останньому випадку використовували сформовану калюсну тканину до початку розвитку меристематичних бруньок. Що стосується апікальної меристеми, то у зв'язку із інтенсивною регенерацією пагонів даним типом експлантів попередньої прекультивуації тканин не проводили. Для зменшення негативного впливу агробактерії на апікальну меристему суспензію бактеріальних клітин розводили середовищем МС [8] у співвідношенні 1:1 та використовували для інокуляції. Подальші маніпуляції із даним типом експлантів проводили за раніше описаною схемою.

Після перенесення всіх типів експлантів на селективне середовище спостерігали пригнічення їх росту та часткову некротизацію тканин. Калюсна тканина, що була використана для трансформації, характеризувалась пригніченим ростом в перший тиждень селекції та масовою некротизацією тканин протягом наступних 10-ти діб культивування рослинного матеріалу на селективному середовищі. В той час як сім'ядольні листочки після 2-х діб прекультивування формували калюсну тканину вже через 2 тижні після початку селекції. Формування пагонів та їх елонгацію спостерігали через 1,5 місяці селекції. Слід відмітити, що на пагонах, які інтенсивно розвивались із апікальної меристеми протягом першого тижня селекції, через 20 діб культивування відзначали появу ознак етіювання тканин. Отримані рослини томату знаходяться на етапі вкорінення на безгормональному середовищі бМС доповненому селективним агентом.

Висновки

Було підібрано умови для ефективної трансформації та селекції комерційно важливого сорту томатів Манімейкер.

Література

1. Шамрай С.М. Микотоксини – постоянная угроза со стороны «экологически чистых» природных ядов [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://www.e-osnova.ru/PDF/osnova_1_0_3.pdf.
2. Поликсенова В.Д. Индуцированная устойчивость растений к патогенам и абиотическим стрессовым факторам // Вестник БГУ. – 2009. – 2. № 1. – С. 48–60
3. Abu-El-Heba A., Hussein M., Abdalla A.A rapid and efficient tomato regeneration and transformation system // Landbauforschung. – vTI Agricult Forestry Res. – 2008. – 58. – P. 103–110.

4. Hamza S., Chupeau Y. Re-evaluation of conditions for plant regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation from tomato (*Lycopersicon esculentum*) // J Exp Bot. – 1993. – 44. – P. 1837–1845.
5. Ling H-Q., Kriseleit D., Ganal M. Effect of ticarcillin/potassium clavulanate on callus growth and shoot regeneration in *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) // Plant Cell Rep. – 1998. – 17. – P. 843–847
6. Lønnerdal B., Suzuki Y.A. Lactoferrin. In: McSweeney PLH, Fox PF, editors. Proteins: Basic Aspects. Advanced Dairy Chemistry. – New York: Springer Science+Business Media, 2013. – P. 295–315.
7. Marcos J.F., Mucoz A., Пйрез-Пайб E., Misra S., Lypez-Garcна B. Identification and rational design of novel antimicrobial peptides for plant protection // Annu. Rev. Phytopatol. – 2008. – 46. – P. 273–301.
8. Murashige T., Skoog F.A. revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. – 1962. – 15. – P. 473–479
9. Park S., Morris L., Park E., Hirschi D., Smith H. Efficient and genotype-independent *Agrobacterium* – mediated tomato transformation // J. Plant Physiol. – 2003. – 160. – P. 1253–1257.
10. Raj S., Singh R., Pandey S., Singh B. *Agrobacterium*-mediated tomato transformation and regeneration of transgenic lines expressing *Tomato leaf curl virus* coat protein gene for resistance against TLCV infection // Current sci. – 2005. – 88, N 10. – P. 1674 – 1679.
11. Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual // Cold Spring Harbor Laboratory Press. – 1989.

TANASIENKO I. ¹, BUZIASHVILI N. ², YEMETS A.I. ¹, BLUME YA. ¹

¹ *Institute of Food Biotechnology and Genomics, Nat. Academy of Sci. of Ukraine, Ukraine, 04123, Kyiv, Osipovskogo str., 2A, e-mail: iratanasoenko@gmail.com*

² *National Taras Shevchenko University of Kyiv, ESC “Institute of Biology”, Ukraine, 01601, Kyiv, Volodymerska str., 64/13*

AGROBACTERIUM-MEDIATED TOMATO (*SOLANUM LYCOPERSICUM*) TRANSFORMATION WITH HUMAN LACTOFERRIN GENE

Aims. Chemicals are classical agents for the control of plant diseases, however, the emergence of new resistant pathogens strains and their toxins as well as chemicals’ limited biological activity and negative long-term effects both on human health and the environment are the challenges for biotechnologists to develop an alternative approach of plant protection. **Methods.** Cell and tissue culture protocols were combined with *Agrobacterium*-mediated transformation to obtain modified tomato plants. **Results.** A range of explants, culture mediums, pre-cultivation time and their combination were established for the development of the effective tomato transformation protocol. Therefore, the regeneration of green shoots from the transformed explants under the selective pressure has been obtained. **Conclusions.** The effective protocol for transformation of commercial tomato cultivar “Many maker” was obtained.

Key words: *Agrobacterium*-mediated transformation, tomato, human lactoferrin gene, systemic resistance.

УДК 636.4.082.12:611.7

ХОХЛОВ А.М.

Харьковская государственная зооветеринарная академия,

Украина, 62341, Харьковская обл., Дергачевский район, п/о Малая Даниловка, ул. Академическая, 1, e-mail: zoovet@zoovet.kh.ua

ЭВОЛЮЦИЯ ЗУБНОЙ И КОСТНОЙ СИСТЕМЫ У ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА *SUS*

Свинья как животное всеядное в отношении устройства зубной системы стоит между плотоядными и травоядными. Степень морфологических сходств и различий может указывать на большую или меньшую филогенетическую близость (родственность) разных видов между собой. Исходя из этого, нами была сделана попытка разобраться в

эволюции зубной системы у представителей рода *Sus* [5].

Зубная система в целом и строение отдельных зубов имеют очень большое диагностическое значение. Эволюция зубной системы у представителей рода *Sus* представлена в таблице 1.

Таблица 1. Эволюция зубной системы у представителей рода *Sus*

Виды	Зубная формула				Всего зубов
	I резцы	C клыки	Pm премоляры	M моляры	
Бабирус (<i>Babirussinae</i>)	1/3 = 8	1/1 = 4	2/2 = 8	3/3 = 12	32
Бородавочник (<i>Phacochoerus</i>)	1/3 = 8	1/1 = 4	2/2 = 8	3/3 = 12	32
Лесная свинья (<i>Hylochoerus</i>)	1/3 = 8	1/1 = 4	3/2 = 10	3/3 = 12	34
Пекари (<i>Tajassinac</i>)	2/3 = 10	1/1 = 4	3/3 = 12	3/3 = 12	38
Кистеухая свинья (<i>Potamochoerus</i>)	3/3 = 12	1/1 = 4	4/3 = 14	3/3 = 12	42
Дикая европейская свинья (<i>Sus scrofa ferus</i>)	3/3 = 12	1/1 = 4	4/4 = 16	3/3 = 12	44
Домашняя свинья (<i>Sus domestica</i>)	3/3 = 12	1/1 = 4	4/4 = 16	3/3 = 12	44

У взрослых бабирус всего 32 зуба, в том числе 8 резцов, 4 клыка, 8 премоляров и 12 моляров. Питаются особи преимущественно растительными кормами. Установлено, что пекари уже в эоцене, т.е. 50 миллионов лет назад, отделились от свиней и с нижнего олигоцена независимо развивались в Южной и Центральной Америке. В Европе и Азии пекари были, но исчезли в нижнем плиоцене. От свиней пекари отличаются очень существенно и по ряду особенностей стоят ближе к жвачным копытным. Зубная система взрослых пекари – 34 зуба, в том числе 10 резцов, 4 клыка, 12 премоляров и 12 моляров. Они хорошо приспособлены к использованию травянистых кормов. К семейству Suidae относится кистеухая, или речная свинья появилась она в нижнем олигоцене Европы, откуда расселилась в Азию и Африку. Раньше выделяли 5 видов речных свиней, сейчас их относят к одному виду. Этот вид населял Африку, к югу от Сахары и остров Мадагаскар. Кроме растительных кормов (главным образом подземных частей растений и плодов), кистеухая свинья поедает животные корма, мертвых животных, а также новорожденных копытных. Зубная система включает 12 резцов, 4 клыка, 14 премоляров и 12 моляров, всего 42 зуба. Кабан, или дикая свинья (*Sus scrofa*) – самый широко распространенный вид. Появился в нижнем олигоцене Европы и широко распространился в разных географических и климатических зонах континента.

Наряду с широким использованием растительных кормов, кабан использует животные корма: земляные черви, насекомые и

их личинки, моллюски, рыба, грызуны, яйца птиц, ящерицы, змеи, лягушки, мертвые животные и т.д. За сутки кабан потребляет от 2,5 до 6 кг кормов [1, 5].

К нему относятся географические расы кабана Европы и Азии, а также все домашние породы свиней. Наличие у дикого европейского кабана и крупной белой породы свиней 44 зуба указывает на их фенотипическую и генетическую схожесть, что подтверждается нами на уровне маркерных генов [5].

К вопросу остеогенеза берцовой кости в связи с domestikацией свиньи. Костная ткань является весьма важным показателем при изучении domestikации свиньи. Благодаря своей большой плотности костная ткань играет важную роль в обеспечении органов произвольного движения, формирует внешний облик животного, создаёт ряд полостей для расположения жизненно важных органов, участвует в минеральном обмене организма и др [3].

Материалы и методы

Изучение влияния domestikации на морфологические показатели свиньи в настоящем сообщении представлены изучением некоторых вопросов остеогенеза на примере голени плодов 50-ти и 70-ти дневного возраста *Sus scrofa ferus* и крупной белой породой свиней. При сравнении с плодами предыдущей стадии развития плоды 70-суточного возраста крупнее, туловище стало более длинным и округлым, шея хорошо выражена. В результате этих изменений плоды не кажутся большеголовыми. На верхней челюсти зачатков зубов нет. В то же время на нижней челюсти

имеются зачатки клыков и 3-й пары резцов, на конечностях копыта полностью ороговели. В качестве методов исследования было применено определение массы кости, а также метод приготовления постоянного гистологического препарата. У плодов *Sus scrofa ferus* и плодов свиньи крупной белой породы 50-ти дневного возраста голень более или менее сформирована и представлена как большеберцовой, так и малоберцовой костями: их межкостное пространство заполнено соединительнотканными элементами. Как известно, малоберцовая кость свиньи проходит на всём протяжении голени, но развита она значительно слабее, чем большеберцовая. В этом возрасте у плода происходит выраженный остеогенез, поэтому для изготовления из неё гистопрепаратов требуется предварительная декальцинация. Последняя осуществлялась в 10 % растворе муравьиной кислоты. Для гистологического исследования готовились парафиновые срезы по общепринятой методике. Остеогенез изучался на препаратах окрашенных гематоксилином и эозином, пикроиндигокармином, фукцин-аланин-бляу-оранжем по Маллори [4].

Результаты и обсуждение

Масса костей голени у плодов диких свиней и крупной белой породы неодинакова. В 50-дневном возрасте она значительно больше у диких свиней и составляет $0,230 \pm 0,01$ г, тогда как у домашних $0,107 \pm 0,03$ г. В 70-дневном возрасте наоборот отмечается рост массы костей у плодов одомашненных животных ($0,380 \pm 0,02$ г) и практически остаётся без изменений у диких животных ($0,240 \pm 0,02$ г). Изучение гистопрепаратов показало, что у плодов *Sus scrofa ferus* 50-ти дневного возраста обнаружена дифференцировка на проксимальный и дистальный эпифизы и диафиз.

В диафизе уже наблюдается как перихондральное так и энхондральное окостенение, обнаруживается первичный костный мозг с процессами кроветворения. При этом граница разрушения хряща с точками оссификации более или менее ровная, выступают чётко. Зона колонок хрящевых клеток обнаруживает постепенный переход в хрящ с пузырьчатыми клетками, значительная часть которых в состоянии деструкции. Между последними заметно внедрение сосудистой сети и элементов малодифференцированной соединительной ткани, среди которых обнаруживается не только клетки крови, но главным образом остеобласты и в меньшей степени остеокласты. За зоной колонок

хрящевых клеток располагается гиалиновый хрящ нормальной структурной организации. Местами в нём можно наблюдать лагуноподобные образования, содержащие малодифференцированную соединительную ткань, среди которой обнаруживаются структуры сосудистой организации с клетками крови в их просвете.

Изучение голени в области диафиза показывает, что остеогенез совершается на всём его протяжении. При этом обнаруживается пери- и энхондральное окостенение. Большая часть гиалинового хряща обычно уже разрушена, тогда как остальная находится в состоянии дегенерации. Последний обычно представляет уплотнившиеся участки в виде балок, расположенных островками различной величины. Вокруг этих островков выявляется формирующая костная ткань. В промежутках между хрящевыми балками выявляется первичный косный мозг, богатый остеобластами, среди которых обнаруживаются очаги эритро- и лейкопоэза, кровеносные сосуды.

Таким образом, наблюдаемые нами гистоструктурные особенности дают основание говорить о том, что у плодов дикого кабана 50-ти дневного возраста более или менее интенсивно совершается остеогенез, наряду с которым происходят и процессы эритро- и лейкоцитопоэза. Если же сопоставить остеогенез в голени плодов дикого европейского кабана 50-ти дневного возраста в сравнении с плодами такого же возраста, крупной белой породы свиней, то можно отметить, что в основном этот процесс у первых протекает более умеренно, с некоторым замедлением. Так, у отдельных плодов *Sus scrofa ferus* в диафизе обнаруживались значительные очаги резорбирующегося хряща. К тому же у плодов свиньи породы крупная белая была более выражена васкуляризация первичного костного мозга, а его сосудистая сеть более наполнена клетками крови, более интенсивно совершался эритро- и лейкопоэз.

Плоды 70-ти дневного возраста. По сравнению с предыдущим возрастом, процесс оссификации голени у плода дикого европейского кабана протекает ещё интенсивнее. При этом следует отметить не только увеличение массы органа, но и усиление остеогенеза, более интенсивное развитие красного костного мозга, усиление эритро- и лейкоцитопоэза. Установлено, что по своей конфигурации большеберцовая кость у плодов

кабана заметно отличалась от плодов крупной белой породы свиней. Так, у плодов *Sus scrofa ferus* форма этой кости на всём её протяжении приближалась к цилиндрической с некоторым изгибом со стороны проксимального эпифиза. У плодов этого же возраста свиньи породы крупная белая большеберцовая кость в направлении её проксимального эпифиза имела заметное расширение, благодаря этому и межкостное пространство у них более широкое, чем таковое голени плодов кабана. Стало быть, у домашней свиньи более массивное развитие большеберцовой кости имеют место уже в период внутриутробного развития.

На гистопрепаратах наблюдается дальнейшее развитие костей голени как за счёт роста их в длину, так и за счёт усиления остеогенеза как такового. При этом в связи с увеличением массы плода и увеличением кости в длину эпифизарные хрящи не уменьшаются, площадь их даже увеличивается. В этот период жизни плода в эпифизарном хряще наблюдается не только его разрушение и замещение костной тканью, но происходит дальнейший его рост, обеспечивая рост кости в длину. В нём ещё сохраняется мощно развитая зона с нормальной структурной организацией, хорошо развита зона колонок хрящевых клеток с постепенным переходом в пузырьчатые формы с последующей их деструкцией и переходом в зону оссификации.

Следует также отметить, что в эпифизарных хрящах наблюдаются лагунообразные структуры с наличием в них элементов малодифференцированной соединительной ткани и сосудов, заполненных клетками крови. Отдельные из этих лагун содержат остеобластические элементы, что и даёт нам основание рассматривать их в качестве точек энхондральной оссификации.

Характеризуя формирование костной ткани и кости как органа у 70-ти дневных плодов дикого европейского кабана, отмечаем следующее. В центральном участке диафиза уже обнаруживается более или менее сформированная костномозговая полость, заполненная красным костным мозгом с высокой степенью дифференцировки его клеточных элементов. В красном костном мозге содержатся не только красные кровяные клетки различной степени развития, иллюстрирующей интенсивность эритро- и гранулоцитопоза, но и наличие в нём сосудистой сети различного диаметра. При этом более крупные из них имеют выраженную эндотелиальную стенку.

Просвет сосудов заполнен клетками крови, среди которых основная масса представлена эритроцитами и отдельными лейкоцитами. Красный костный мозг заполняет также и промежутки между трабекулами формирующейся энхондральной костной ткани. Перекладины последней неровные, они содержат замурованные остатки хряща. Ближе к эпифизарным хрящам в диафизе наблюдается заметное нарастание островков дегенерирующегося хряща, и достигая максимума в зоне оссификации.

Остеобластические элементы рассеяны на всём протяжении диафиза, однако их заметно большее количество наблюдается вдоль костных трабекул, располагающихся вблизи периста. В этих участках остеобласты довольно крупные, сочные и нередко располагаются в несколько рядов.

Как в большеберцовой, так и в малоберцовой костях остеогенез в основном протекает по одному плану. Однако, всё же следует подчеркнуть, что в малоберцовой кости зона оссификации находится значительно ближе к средней части диафиза, чем это наблюдается в большеберцовой кости. Зона колонок хрящевых клеток в малоберцовой кости заметна уже таковой большеберцовой кости. В целом количество красного костного мозга, сосудистых и остеобластических элементов обычно превалирует в последней.

У плодов аналогичного возраста свиньи крупной белой породы остеогенез в целом протекает сходно. Однако, как нами уже отмечено выше, сама по себе голень плодов свиньи крупной белой породы оказалась более массивной, чем таковая плодов дикого европейского кабана. По понятным причинам это обстоятельство не могло не сказаться на процессах остеогенеза как такового. У плодов дикого европейского кабана остеогенез голени совершался, как бы умереннее, менее интенсивнее, чем это можно было наблюдать в голени плодов свиньи крупной белой породы, у последних остеогенез сопровождался проявлением более мощных балок костной ткани, обилием остеобластических элементов, наличием более крупных очагов эритро- и гранулоцитопоза, большим количеством костного мозга.

Очевидно, что уровень кормления и условия содержания животного в период беременности также как и наследственные факторы оказывают существенное влияние на процесс остеогенеза.

Испытание костей домашних и диких свиней на прочность. В процессе domestikации сви́ньи происходят не только морфологические и функциональные изменения пищеварительной, дыхательной, но и опорной системы животных. Установлено, что все абсолютные показатели прочности костей у дикого европейского кабана значительно выше, чем у современной крупной белой породы сви́ней. Самую высокую плотность, как указывают наши исследования, имеют кости конечностей, которые испытывают, как известно, большие механические воздействия и поэтому в процессе domestikации изменились менее значительно. Так, плечевая кость выдерживает испытание на сжатие у диких сви́ней – $460,1 \pm 6,7$ кг/см², а у крупной белой породы сви́ней – $427,2 \pm 6,1$ кг/см² ($td = 3,6$ при $P < 0,01$), а различия в пястной кости менее существенные ($td = 2,44$ при $P > 0,01$). Следовательно, прочность длинных трубчатых костей выше у диких животных в сравнении с домашними. Прочность рёбер: у диких – $29,96 \pm 0,18$ кг/см², а у домашних – $19,38 \pm 0,15$ ($td = 6,8$ при $P < 0,001$). Таким образом, наибольшей прочностью при испытании на сжатие обладали трубчатые крупные кости, наименьшей – ребра.

Выводы

1. На основании полученных результатов исследований можно предположить, что в процессе эволюции животных рода *Sus* наибольшим изменениям подверглись премолляры и резцы. Однако с момента одомашнивания сви́ней и до настоящего времени зубная система *Sus scrofa domestica* сохраняется в

неизменном виде, что, вероятно, связано с генетической сбалансированностью генотипа.

2. Изучение формирования костно-мышечной системы в процессе онтогенеза сви́ней показало отличия в процессах остеогенеза и эритропоэза. Более высокая интенсивность остеогенеза характерна для домашней сви́ньи, что показано при морфологическом и гистологическом изучении берцовой кости. К 70-дневному возрасту плодов масса берцовой кости у кабана заметно меньше и составляла 67,2 % по сравнению с крупной белой породой. В то же время напряженность эритропоэза была существенно выше у диких сви́ней, что является адаптивным проявлением видовых особенностей. Дикий кабан может быть донором ценных адаптивных свойств для повышения естественной резистентности и жизнеспособности животных современных пород.

3. В процессе domestikации происходят не только морфологические и физиологические изменения пищеварительной и дыхательной, но и опорной систем животных. Абсолютные показатели прочности костей у дикого европейского кабана существенно выше по сравнению с домашними животными. Самую высокую прочность имеют кости конечности, которые испытывают большие механические воздействия и в процессе domestikации изменились незначительно. Так, плечевая кость выдерживает испытание на сжатие у диких сви́ней 460,0 кг/см², а у домашних 427,2 кг/см². При испытании на сжатие наибольшей прочностью обладали крупные трубчатые кости, а наименьшей ребра.

Литература

1. Князев С.П. Филогенез и таксономические взаимоотношения внутривидовых форм сви́ней *Sus scrofa* (*Suidae*) // Зоологический журнал. – 2004. – 83. – С.105–118.
2. Тихонов В.Н., Жучаев К.В. Микроэволюционная теория и практика породообразования сви́ней. – Новосибирск, 2008. – С. 10–62.
3. Пилипенко М.Ю., Хохлов А.М. Остеогенез сви́ней у зв'язку з їх domestikацією // Вісник с.-г. науки. – 1979. – № 10. – С. 47–48.
4. Пилипенко М.Е., Хохлов А.М. К морфологии органов кроветворения в связи с domestikацией сви́ньи / Генетические и методические аспекты селекции с.-х растений и животных. – К.: Наукова думка, 1983. – С. 170–172.
5. Хохлов А.М. Генетический мониторинг domestikации сви́ней – Х.: Эспада, 2004. – 126 с.

KHOHLOV A.M.

Kharkov State Zooveterinary Academy,

Ukraine, 62341, Kharkov region, Dergachi district, v. Malaya Danilovka, Academichna str., 1, e-mail: zoovet@zoovet.kharkov.ua

EVOLUTION OF TOOTH AND BONE SYSTEMS IN *SUS* GENDER REPRESENTATIVES

Aims. Questions about phylogenetic development of tooth system in *Sus* gender representatives and also osteogenesis and processes in ontogenesis of wild European boar and domesticated breed of White Swine

haven't been enough covered in scientific sources. **Methods.** Morphological, zootechnical and histological methods of investigation of separate skeletal bones formation in ontogenesis of wild boar and White Swine breed have been used. **Results.** Weight of bone and osteogenesis in foetus of wild European boar in comparison with foetus development of White Swine breed has been studied. There was boar's leg weight during 50-days age more on 118 %, than White Swine's one. Bones of domestic animals grew more intensively at 70-days age that is connected with domestication process. However, development of red marrow and erithropoesis took place more intensively in bony tissue of wild animals. **Conclusions.** Premolars and incisors of *Sus* gender have been the most changed during evolutionary processes of tooth system. Formation of bone and muscle system in ontogenesis process of wild and domestic swine proved that there was high intensity of osteogenesis for domestic animals, and there was high intensity of erithropoesis for wild swine. Wild boar can be donor of valuable peculiarities for high natural resistance and life of modern breeds.

Key words: genus *Sus*, evolution, tooth and bone systems.

УДК 631.52:575.113

ЧЕРЧЕЛЬ В.Ю.¹, САТАРОВА Т.М.¹, БОРИСОВА В.В.¹, АБРАИМОВА О.Є.¹, ФЕДЬКО М.М.¹, СТЕПНЕВСЬКА Я.В.²

¹ ДУ Інститут сільського господарства степової зони НААН України,

Україна, 49600, м. Дніпропетровськ, вул. Дзержинського, 14, e-mail: satarova2008@yandex.ru

² ДВНЗ Український державний хіміко-технологічний університет,

Україна, 49005, м. Дніпропетровськ, пр. Гагаріна, 8

ВИКОРИСТАННЯ SNP-АНАЛІЗУ ДЛЯ ХАРАКТЕРИСТИКИ ГЕНЕТИЧНОЇ СТРУКТУРИ СЕЛЕКЦІЙНОГО МАТЕРІАЛУ КУКУРУДЗИ І СОРГО

Аналіз однуклеотидного поліморфізму ДНК (SNP-аналіз) є сучасним молекулярно-генетичним методом, який набуває широкого використання в практичній селекції культурних рослин і ефективно застосовується для ідентифікації та паспортизації генотипів, кластеризації і прогнозування гетерозису, маркування господарсько-цінних ознак [1]. Кукурудза і сорго – культурні рослини родини *Gramineae*, цінні харчові, кормові та технічні культури, однак, неоднаково вивчені у відношенні молекулярно-генетичного поліморфізму та селекційного поліпшення. Кукурудза за характером молекулярно-генетичного поліморфізму вивчена значно ширше та може слугувати моделлю для розробки методичних підходів і принципів застосування SNP-аналізу у злаків, в тому числі у сорго, селекція і виробництва якого в Україні інтенсифікуються. С точки зору класифікації ліній, стратегії їх використання в гібридах та при закладанні синтетичних популяцій для нових циклів відборів актуальним є визначення генетичної структури лінії та характеру її зміни від предків до нащадків в процесі синтезу лінії [2]. Метою даної роботи було визначення внеску предкових популяцій в генетичну структуру сучасних ліній кукурудзи за результатами аналізу однуклеотидного

поліморфізму ДНК.

Матеріали і методи

SNP-генотипування 5 ліній кукурудзи та їх предкових форм проводили з використанням GoldenGate тесту, системи зчитування результатів Illumina VeraCode і матриці Sentrix array matrice (SAM) [3]. Молекулярно-генетичну частину роботи проводили на базі фірми BioDiagnostics, Inc. (США), якою на основі Illumina VeraCode Bead Plate розроблено використану в нашій роботі панель BDI-III з 384 SNP-маркерів, найбільш придатних для виявлення поліморфізму сучасного селекційного генофонду кукурудзи [4]. ДНК виділяли з пагонів 7-добових проростків за [5]. Для аналізу внеску предкових популяцій в генетичну структуру ліній кукурудзи української селекції результати SNP-генотипування були оброблені нами за комп'ютерною програмою STRUCTURE [6] з використанням моделей admixture та корельованої частоти алелів. Даний тип аналізу висуває наступні вимоги до зразків: особини, що аналізуються, можуть мати змішане походження, тобто, передбачається, що особина *i* успадковує певну фракцію свого геному від однієї, декількох або всіх *k* популяцій предків, а генотипи нащадків є результатом корельованого дрейфу частот алелів предкових популяцій.

Методичні принципи аналізу дозволяють розрахувати коефіцієнти приналежності даного генотипу (Q) до кожної з k -груп, тобто визначити залишковий внесок предків в генотип сучасної лінії-нащадка. Попарні генетичні дистанції між лініями визначали як частку проаналізованих SNP-маркерів, за якими обидві лінії мали однаковий алейльний стан.

Результати та обговорення

Попередній SNP-аналіз генетичної структури популяції з 90 ліній кукурудзи дозволив розділити їх на $k = 5$ основних груп. Як такі, що належать до певної групи, вважаються лінії з $Q \geq 0,600$ [6]. Для групи 1 найбільш типовою виявилася лінія В73 ($Q = 0,998$), для групи 2 – лінія Oh43 ($Q = 0,989$), для групи 3 – Мо17 ($Q = 0,998$), для групи 4 – Р165 ($Q = 0,998$), для групи 5 – В14 ($Q = 0,997$). Для кожної з 6 досліджених нами ліній були розраховані коефіцієнти приналежності Q до тієї чи іншої групи за алейльним станом SNP-локусів.

Лінія ДК2/427 (табл. 1, 2) була створена шляхом добору з популяції від самозапилення гібрида $F_2 \times$ ДК427, відомо, що лінія ДК427 є потомком лінії Oh43.

Лінія ДК2/427 зберегла основну частку генетичного матеріалу групи 2 (Oh43), за часткою генетичного матеріалу груп 1 (В73) і 5 (В14) зайняла проміжне положення між предковими формами та має дещо збільшену частку групи 3 (Мо17). Останні, однак, зробили незначний, менше 1 %, внесок в генотип лінії ДК2/427.

Розподіл генетичних дистанцій вказує на значну віддаленість предка батьківської форми – лінії Oh43 та на поступове зменшення варіювання за складом нуклеотидів в SNP-сайтах в напрямку від Oh43 через ДК427 до ДК2/427. Безпосередньо материнська форма

гібрида, з якого відібрано лінію ДК2/427, лишилася на досить значній генетичній відстані від свого нащадка.

Лінія ДК272 (табл. 3, 4) веде походження від гібрида ДК2/707 \times ДК2/427. Лінія ДК2/707 створена шляхом самозапилення рослин гібрида $F_2 \times$ ДК507, причому лінія ДК507 є нащадком лінії В37. Походження лінії ДК2/427 наводиться вище.

Лінія ДК296 створена шляхом відборів з гібрида F_1 , предками материнської форми якого були лінії А619 та ДК366, а в родоводі чоловічої форми присутня лінія Мо17. Аналіз зміни Q -коефіцієнтів при формуванні лінії ДК296 (табл. 5) та генетичних дистанцій (табл. 6) показує зовсім іншу, ніж у попередніх випадках, тенденцію перерозподілу генетичного матеріалу в процесі гібридизації та добору. Так, жодна з предкових форм не зберегла своєї домінуючої ролі, і лінія-нащадок ДК296 від групи 2 (Oh43) має частку лише в 0,347, а від групи 3 (Мо17) – 0,564, тобто, відноситься до групи, які слід позначити як групу 6 (Міх).

Навіть в четвертому поколінні від вихідної лінії Oh43 внаслідок спрямованої гібридизації та відборів за довжиною вегетаційного періоду, консистенцією зерна та посухостійкістю в генотипі лінії ДК272 зберігається переважна частка генетичного матеріалу групи 2 (Oh43), а частка групи 4 (Р165) продовжує зменшуватися. В генотипі лінії ДК272 також відмічається невелике поступове зростання частки генетичного матеріалу груп 1 (В73), 5 (В14) і, особливо, групи 3 (Мо17). Зміна генетичних дистанцій підтверджує тенденції щодо перерозподілу генетичного внеску предків в геном лінії ДК272, виявлені при аналізі її генетичної структури.

Таблиця 1. Внесок предкових форм в генотип нащадків при створенні лінії кукурудзи ДК2/427

Лінія	Коефіцієнти приналежності Q				
	Група 1	Група 2	Група 3	Група 4	Група 5
Лінія-предок однієї з батьківських форм гібрида F_1					
Oh43	0,002	0,989	0,003	0,003	0,003
Нащадок					
ДК2/427	0,005	0,912	0,011	0,069	0,004

Таблиця 2. Генетичні дистанції між лінією ДК2/427 та компонентами предкової популяції

Компоненти предкової популяції	Лінія ДК2/427
Материнська форма гібрида F ₁	
F ₂	0,311765
Лінія – предок батьківської форми гібрида F ₁ (лінії ДК427)	
Oh43	0,359195
Батьківська форма гібрида F ₁	
ДК427	0,189504

Примітка: генетична дистанція між Oh43 та ДК427 складає 0,349854.

Таблиця 3. Внесок предкових форм в генотип нащадків при створенні лінії кукурудзи ДК272

Лінія	Коефіцієнти приналежності Q				
	Група 1	Група 2	Група 3	Група 4	Група 5
Предкові форми збоку одного з батьків					
Oh43	0,002	0,989	0,003	0,003	0,003
ДК2/427	0,005	0,912	0,011	0,069	0,004
Нащадок					
ДК272	0,015	0,863	0,087	0,021	0,013

Таблиця 4. Генетичні дистанції між лінією ДК272 та компонентами предкової популяції

Компоненти предкової популяції	Лінія ДК272
Лінія – прапредок материнської форми гібрида F ₁ (лінії ДК2/707) збоку ДК507- 1гер	
V37	0,449568
Лінії – предки материнської форми гібрида F ₁ (лінії ДК2/707)	
F ₂	0,271642
ДК507	0,426087
Лінія – прапредок батьківської форми гібрида F ₁ (лінії ДК2/427) збоку ДК427	
Oh43	0,401734
Лінії – предки батьківської форми гібрида F ₁ (лінії 2/ДК427)	
F ₂	0,271642
ДК427	0,314706
Батьківська форма гібрида F ₁	
ДК2/427	0,275072

Примітка: генетична дистанція між F₂ та ДК2/427 складає 0,311765, між ДК427 та ДК2/427 – 0,189504, між Oh43 та ДК2/427 – 0,359195.

Таблиця 5. Внесок предкових форм в генотип нащадків при створенні лінії кукурудзи ДК296

Лінія	Коефіцієнти приналежності Q				
	Група 1	Група 2	Група 3	Група 4	Група 5
Лінії-предки материнської форми гібрида F ₁					
A619	0,001	0,989	0,004	0,004	0,002
ДК366	0,045	0,757	0,114	0,043	0,040
Лінія-предок батьківської форми гібрида F ₁					
Mo17	0,001	0,001	0,998	0,001	0,001
Нащадок					
ДК296	0,004	0,347	0,564	0,078	0,007

Генетична структура ліній ДК231 та ДК236 та динаміка зміни генетичних дистанцій при їх генезисі представлені у табл. 7–9. Ці дві лінії створені шляхом добору та самозапилення відібраних рослин з однієї і тієї ж вихідної популяції, сформованої з беккросного гібрида (ДК633 × F₂) × ДК633. Відомо, що лінія ДК633 веде своє походження від лінії Мо17.

Отримані з однієї вихідної популяції, лінії ДК231 та ДК236, тем не менш, розрізняються за перерозподілом часток предкових геномів. Так, лінія ДК231 успадкувала від предкової форми

Мо17 (група 3) за два покоління відбору лише 78,66 % генних комплексів, а внесок інших груп залишився незначним. При створенні лінії ДК236 навпаки, нова лінія через два покоління добору зберегла частку геному Мо17 (група 3) на 99,30 %, решта груп мали невеликий та проміжний між предковими формами внесок в генотип нової лінії. Аналіз генетичних дистанцій показує, що обидві сестринські лінії значно наближені саме до материнської форми і її предка Мо17, особливо ДК236, та, навпаки, віддалені від батьківської лінії F₂.

Таблиця 6. Генетичні дистанції між лінією ДК296 та компонентами предкової популяції

Компоненти предкової популяції	Лінія ДК296
Лінії – предки материнської форми гібрида F ₁	
А619	0,407303
ДК366	0,355114
Лінія – предок батьківської форми гібрида F ₁	
Мо17	0,276836

Примітка: генетична дистанція між А619 та ДК366 становить 0,440000, між А619 та Мо17 – 0,412429, між ДК366 та Мо17 – 0,432277.

Таблиця 7. Внесок предкових форм у генотип нащадків при створенні лінії кукурудзи ДК231

Лінія	Коефіцієнти приналежності Q				
	Група 1	Група 2	Група 3	Група 4	Група 5
Предкова форма збоку першого батька					
Мо17	0,001	0,001	0,998	0,001	0,001
Нащадок					
ДК231	0,014	0,175	0,785	0,018	0,008

Таблиця 8. Внесок предкових форм у генотип нащадків при створенні лінії кукурудзи ДК236

Лінія	Коефіцієнти приналежності Q				
	Група 1	Група 2	Група 3	Група 4	Група 5
Предкова форма збоку першого батька					
Мо17	0,001	0,001	0,998	0,001	0,001
Нащадок					
ДК236	0,002	0,003	0,991	0,001	0,003

Таблиця 9. Генетичні дистанції між ДК231, ДК236 та компонентами предкової популяції

Компоненти предкової популяції	Лінія ДК231	Лінія ДК236
Лінія-предок материнської форми гібрида F ₁ (лінії ДК633)		
Мо17	0,232955	0,177966
Материнська лінія гібрида F ₁		
ДК633	0,126437	0,088319
Батьківська лінія гібрида F ₁		
F ₂	0,325581	0,354651
Лінії, відібрані з предкової популяції (гібрида F ₁)		
ДК231	0	0,11050
ДК236	0,11050	0

Примітка: генетична дистанція між Мо17 та ДК633 складає 0,106936, між Мо17 та F₂ – 0,429412, між ДК633 та F₂ – 0,418879.

Різні типи успадкування часток геномів предкових форм, розглянуті нами на наведених вище прикладах, фактично є узагальненим відображенням рекомбінаційного потенціалу вихідних популяцій, створених із залученням генетично різноманітних батьківських форм, та результатом цілеспрямованого добору з цих популяцій генотипів, які відповідають моделі, найбільш прийнятної для умов Степу.

Висновки

Отримані результати засвідчують різноспрямованість зміни генетичної структури селекційного матеріалу в процесі дії добору при рекомбінації та синтезу нових ліній кукурудзи. Так, при використанні у гібридизації батьківських форм, споріднених до групи Oh43 (2), в лінії-нащадку суттєво, на 75,7–91,2 %, превалюють генні комплекси вихідної групи 2. При використанні у гібридизації батьківських форм, створених на основі генетичного

матеріалу, спорідненого до групи Mo17 (3) в лінії-нащадку суттєво, на 78,5–99,1 %, переважають генні комплекси групи 3. Проте, при гібридизації батьківських форм, які одночасно походять від групи 2 (Oh43) та групи 3 (Mo17), відбувається змішування генних комплексів цих двох комплексів у співвідношенні для проаналізованої лінії ДК296, відповідно, 34,7 : 56,4 %. Таким чином, аналіз генетичної структури селекційного матеріалу за результатами SNP-генотипування дозволяє контролювати напрямок зміни та співвідношення часток матеріалу різного походження в їх родоводі і рекомендується для застосування у споріднених видів родини *Gramineae*, зокрема, кукурудзи і сорго.

Робота виконана за підтримки Державного агентства з питань науки, інновацій та інформатизації України в рамках договору № ДЗ/462-2013.

Література

1. Syvdnen A.-Ch. Accessing genetic variation: genotyping single nucleotide polymorphisms // *Nature reviews. Genetics.* – 2001. – 2. – P. 930–942.
2. Lu Y., Yan J., Guimardes C.T. et al. Molecular characterization of global maize breeding germplasm based on genome-wide single nucleotide polymorphisms // *Theor. Appl. Genet.* – 2009. – 120. – P. 93–115.
3. Fan J.B., Gunderson K.L., Bibikova M. et al. Illumina universal bead arrays // *Methods Enzymol.* – 2006. – 410. – P. 57–73.
4. Venkatramana P., Carison C., Blackstad M. et al. Development and characterization of single nucleotide polymorphism (SNP) panel for markers-assisted backcrossing in corn [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://www.biodiagnostics.net/wp-content/uploads/2012/07/singlenucleotide.pdf>.
5. Murray M.G., Thompson W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA // *Nucleic Acids Res.* – 1980. – 8, N 19. – P. 4321–4326.
6. Pritchard J.K., Wen X., Falush D. Documentation of structure software: Version 2.3 [Електронний ресурс]. – 2010. – 38 p. – Режим доступу: <http://pritch.bsd.uchicago.edu/structure.html>

CHERCHEL V.JU.¹, SATAROVA T.M.¹, BORYSOVA V.V.¹, ABRAIMOVA O.E.¹, FEDKO M.M.¹, STEPNEVSKA YA.V.²

¹ *State enterprise Institute of agriculture of steppe zone NAAS of Ukraine, Ukraine, 49600, Dnipropetrovs'k, Dzerzhinsky str., 14, e-mail: satarova2008@yandex.ru*

² *Ukrainian State University of Chemical Technology, Ukraine, 49005, Dnipropetrovs'k, Gagarin av., 8*

APPLICATION OF SNP-ANALYSIS FOR THE CHARACTERIZATION OF GENETIC STRUCTURE OF BREEDING MATERIAL IN MAIZE AND SORGHUM

Aims. The determination of the contribution of precursor populations into the genetic structure of modern inbreds according to the results of DNA single nucleotide polymorphism analysis. **Methods.** SNP-genotyping of 5 maize inbreds with GoldenGate test, Illumina VeraCode, Sentrix array matrix, BDI-III-panel of 384 SNP-markers, computer analysis by STRUCTURE software. **Results.** A share of precursor pedigree genomes into genomes of modern maize inbreds DK2/427, DK272, DK296, DK231 and DK236 on SNP-markers has been determined. **Conclusions.** SNP-genotyping permits to control the direction of alterations and ratios of genetic material of different origin and has been recommended to the application in selection of related species in *Gramineae*, maize and sorghum.

Key words: SNP-markers, genetic distance, breeding material, maize, sorghum.

PLANT AND ANIMAL LECTINES AS MODULATORS OF *MGMT* AND *MARP* GENE EXPRESSION *IN VITRO*

Repair enzyme O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase (*MGMT*) is the major defence factor against the mutagenic, carcinogenic and cytotoxic effects of alkylating agents [1, 2]. It can transfer an alkyl group from the O⁶-position of guanine to its own cysteine residue with further degradation of *MGMT* molecule [3, 4]. Thus, *MGMT* protects normal cells from endogenous and exogenous mutagens and carcinogens. But alkylating agents are widely used in cancer chemotherapy schemes. The *MGMT* expression and activity in malignant cells are often high, and need to be inhibited. Besides the secondary tumorigenesis after the treatment with alkylating agents is possible. Thus, the protection of non-tumor cells from genotoxic anti-cancer drugs is an issue. Therefore, this enzyme is considered to be one of the targets to regulate antitumor efficacy of alkylating agents [1, 5, 6].

The expression level of *MGMT* gene can differ widely in individuals, in tissues and organs of the same organism, and in normal and tumor cells of the same organ [7, 8]. In our previous investigations we found and described the unknown protein with M.w. \approx 50 kDa [9, 10] named as *MARP* (anti-Methyltransferase Antibody Recognizable Protein), shown to be highly inducible, and presumed to be the part of DNA repair system in mammalian cells. It can be regulated by some cytokines and growth factors [11].

Therefore the search for effective modulators of *MGMT* activity and expression is actual for improving anti-tumor efficacy of alkylating agents and preventing of their side effects in normal cells. To date only a small number of DNA repair genes have been shown to be inducible in mammalian cells and *MGMT* is presumably one of the best studied ones. And the inducibility of *MARP* have not been studied yet. According to the literature data the *MGMT* gene expression may be affected by various factors: the alkylating agents, single-strand DNA breaks, transcription factors, activators of protein kinase C, *MGMT* gene promoter hypermethylation, etc. [12]. Regulation of expression can also be indirect through different intracellular signaling pathways [13]. Some

cytokines are known to be able to influence on the *MGMT* and *MARP* gene expression as well [1, 13–15].

Plant and animal lectines are recognized as regulating proteins due to their broad spectrum of biological activity in all living systems. Biological functions of these proteins are based on their carbohydrate specificity. Exogenous lectins can influence through glycosylated surface of the cell membrane, and can up- and downregulate adhesion, migration, apoptosis, proliferation etc in pro- and eukaryotic systems [16]. Previously for the first time we have studied the ability of such a lectins to influence the processes of mutagenesis and antimutagenesis in prokaryotic test systems [19] and mammalian cell cultures [18–20]. The elderberry bark lectins were shown to have both mutagenic and toxic activity (at high concentrations) and protective properties (at low concentrations) [18, 21]. In our studies it has also been shown that plant lectins are able to modify DNA damage repair process [22].

Thus, we have assumed that repair enzyme *MGMT* could also be a target of lectin regulatory impact on mutation process. The aim of our study was to examine the effect of panel of lectins on the *MGMT* and *MARP* expression levels in tumor and non-tumor mammalian cells *in vitro*.

Materials and methods

The following cell cultures were used in the experiments: 4BL – fibroblast-like cell line, received in our laboratory from blood of an adult donor; the standard line of Hep2 cells. The cells were cultivated in a standard DMEM growth medium with an addition of 10 % Fetal bovine serum (PAA) and antibiotics (penicillin and streptomycin) at 37°C with 4 % CO₂. As biological factors commercial preparations of elderberry (*Sambucus nigra*) bark lectins, perch eggs lectins, lentil seed lectins (Lectinotest, Lviv, Ukraine) were used and as a chemical mutagen – nickel chloride. Conditions of cell treatment with lectins and NiCl₂ were described previously [22]. Protein extracts were obtained according to a previously described method [15].

SDS electrophoresis of the proteins was performed in 12 % polyacrylamide gel by the Laemmli method [23]. The total protein

concentration was determined by the Bradford method [24] in every sample in order to an equal quantity of the protein was loaded into every lane. Monoclonal antibodies against human MGMT (clone 23.2, isotype IgG2b) were obtained from Novus Biologicals, USA. Secondary antibodies peroxidase conjugated with horseradish were from Sigma. The procedure of MGMT identification in the samples was performed according to the recommendation of the manufacturer of monoclonal antibodies [http://www.novusbio.com/]. For even loading control the densitometry of the stained hybridized membrane was used (Scion Image program) as there are some literature data that total protein stains is an acceptable alternative to single-protein loading controls [25].

Results and discussion

4BL cell culture was treated by panel of lectins including perch egg lectin (PEL), lentil seed lectin (LSL) and elderberry bark lectin (SNA-I) in concentrations 20 and 80 mkg/ml during 4h. With Western-blot analysis it was shown absence of MGMT expression both in control and in treated cells (fig. 1, a), but MARP protein was detected in all the samples. Under the SNA-I treatment MARP expression was increased in cells treated by 20 mkg/ml, while 80 mkg/ml concentration had no effect. The similar tendency was shown in the case of animal lectin (PEL) treated cells but MARP expression level was higher. The effect of LSL treatment has another dose dependence: 20 mkl/ml concentration have no affect MARP expression, but 80 mkg/ml extremely increased the amount of

protein. Thus, all lectins studied were shown to influence the MARP expression on protein level, depending on the origin of lectin.

Further we have performed the more detailed study of the dose dependence of PEL treatment effect in 4BL cells (fig. 1, b). PEL was shown to induce MARP expression with all treatment concentrations (0.2, 2 and 20 mkg/ml), but level of expression was the same in all treated samples. Thus, PEL active dose is rather low.

The ability of of SNA-I to induce MARP expression were the lowest in studied lectin panel, and the in some cases were undetectable (fig. 1, c). But, nevertheless, such small induction was observed even in samples treated by low 0.2 mkg/ml lectin concentration.

Though the low influence of SNA-I-induced MARP expression level changes in non-tumor intact cells, in our earlier studies we exhibited the DNA repair induction by SNA-I in nickel-damaged cells [21]. And this was the reason to study the joint effect of this lectin and NiCl₂ (fig. 2).

So, the moderate up-regulation of MARP expression level in cells treated by 0.2 mkg/ml of lectin, and downregulation of this level in nickel-treated cells was shown. But in cells treated both by nickel chloride and lectin the MARP expression level was the same as in untreated cells. Thus, we can conclude that in normal cell cultures SNA-I lectin modulates the MARP expression rather slightly but we suppose that it can cooperate with some components of repair system after mutagen action.

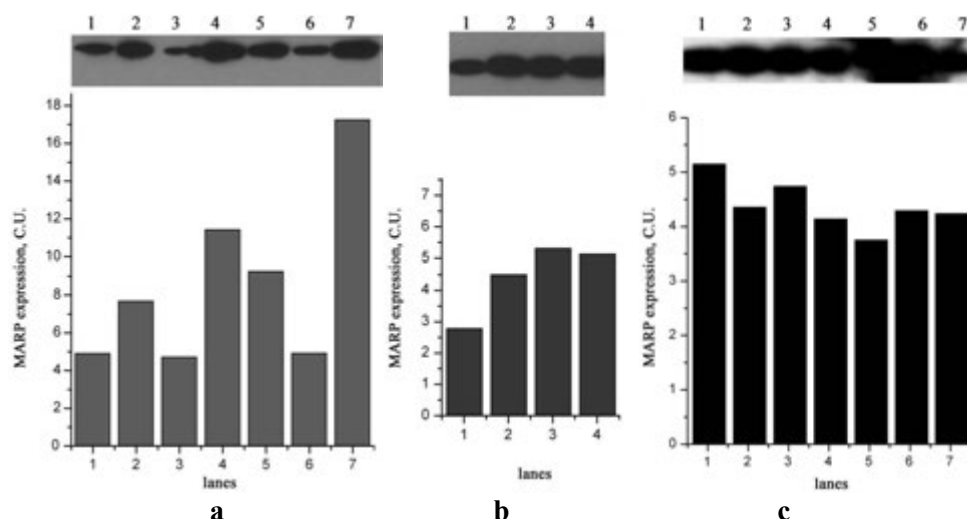


Fig. 1. The MARP expression in 4BL cells treated by perch eggs lectin (PEL), lentil seed lectin (LSL) and elderberry bark lectin (SNA-I). **a)** 1 – control, 2 – SNA-I, 20 mkg/ml, 3 – SNA-I, 80 mkg/ml, 4 – PEL, 20 mkg/ml, 5 – PEL, 80 mkg/ml, 6 – LSL, 20 mkg/ml, 7 – LSL, 80 mkg/ml. **b)** 1 – PEL, control, 2 – PEL, 20 mkg/ml, 3 – PEL, 2 mkg/ml, 4 – PEL, 0.2 mkg/ml. **c)** 1 – SNA-I, control, 2 – SNA-I, 20 mkg/ml, 3 – SNA-I, 2 mkg/ml, 4 – SNA-I, 0.2 mkg/ml, 5 – SNA-I, 20 mkg/ml 72h postincubation, 6 – SNA-I, 2 mkg/ml 72h postincubation, 7 – SNA-I, 0.2 mkg/ml 72h postincubation

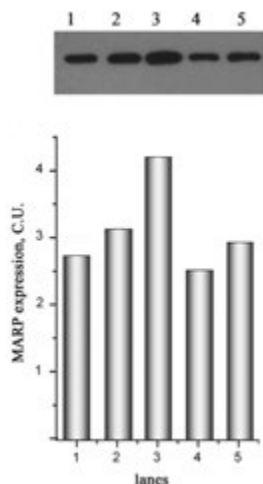


Fig. 2. The MARP expression in 4BL cells treated by elderberry bark lectin (SNA-I) and NiCl₂ (500 mkg/ml): 1 – control; 2 – SNA-I, 2 mkg/ml, 3 – SNA-I, 0,2 mkg/ml; 4 – NiCl₂; 5 – NiCl₂ + SNA-I, 0,2 mkg/ml

Moreover we were interested if SNA-I can change its action in other stress conditions. And in our further experiments we did demonstrate that in unstable cell culture the SNA-I effect is much more manifested. Cell culture destabilization was induced by cultural medium with high ionic strength, and was accompanied by lost of genomic stability [26]. Enhancing MARP expression in these conditions under the treatment with SNA-I was substantial and persisted at least up to 5 days (fig. 3, a).

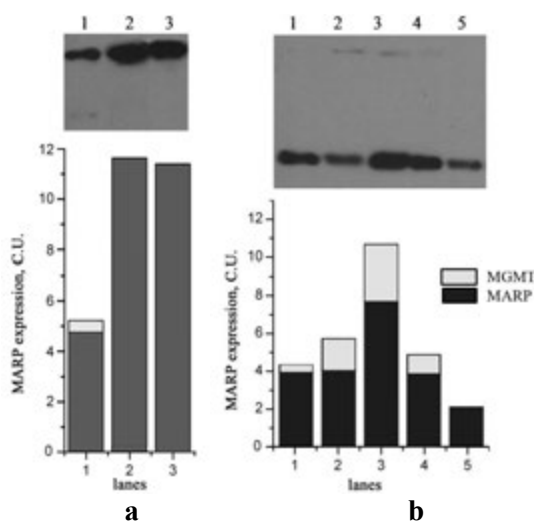


Fig. 3. The MARP expression in destabilized 4BL cells (a) and Hep-2 tumor cells (b) treated by elderberry bark lectin (SNA-I): a) 1 – control, 2 – SNA-I (20 mkg/ml), 3 – 5 days postincubation after SNA-I (20 mkg/ml) treatment; b) 1 – control, 2 – SNA-I (80 mkg/ml), 3 – SNA-I (20 mkg/ml), 4 – SNA-I (2 mkg/ml), 5 – SNA-I (0.2 mkg/ml)

Substantial influence of SNA-I both on MARP and MGMT expression was demonstrated in cells of tumor origin (Hep-2) (fig. 3, b). But the character of such influence was completely different from the one found in 4BL. The lowest concentration 0,2 mkg/ml which was shown to be genoprotective in non-malignant cell lines and primary human cells, causes near two-fold decreasing MGMT expression. MARP expression was not detected at all, whilst this enzyme is present in intact Hep-2 cells. In cell culture treated with 2 mkg/ml of lectin the expression levels of both MGMT and MARP are close to the control level, and in 20 mkg/ml treated cells are substantially enhanced. But further increasing lectin concentration leads to decrease of MGMT and MARP expression levels.

As result of this work SNA-I lectin was shown to discriminate non-tumor, destabilized non-tumor and tumor cells *in vitro* according to its influence on the MGMT and MARP expression levels. Elderberry bark lectin SNA-I had only slight effect on MARP expression in stable non-tumor cell line 4BL. But in cell line on the stage of induced secondary genomic instability SNA-I was shown to substantially increase MARP expression level. And in malignant cell line Hep-2 we demonstrated both suppress and enhance of MARP and MGMT expression levels under the SNA-I treatment.

In early works lectins were assumed to be only carbohydrate-binding proteins, but further they were shown to affect the different kinds of enzyme activities. For the first time we have shown that MARP and repair enzyme MGMT expression can be regulated by these biologically active substances as well.

Conclusions

Lectins of plant and animal origin (perk egg lectin, lentil seeds lectin and elderberry bark lectin) are able to modulate the expression of proteins recognized by anti-MGMT monoclonal antibodies (MGMT and MARP).

The influence of SNA-I on MARP and MGMT expression levels depends on origin and genomic stability of cell line. Destabilized 4BL cell line was shown to be more sensitive to SNA-I modulating action. In malignant cells both expression up- and downregulating effect of SNA-I lectin was described, so SNA-I is perspective for further study as potential drug in anti-tumor therapy optimization schemes.

References

1. Pegg A.E. Multifaceted Roles of Alkyltransferase and Related Proteins In DNA Repair, DNA Damage, Resistance to Chemotherapy and Research Tools // *Chem Res Toxicol.* – 2011. – 24 (5). – P. 618–639.
2. Gerson S.L. MGMT: its role in cancer aetiology and cancer therapeutics // *Nat Rev Cancer.* – 2004. – 4 (4). – P. 296–307.
3. Pegg, A.E. Repair of O6-Alkylguanine by Alkyltransferases // *Mutat. Res.* – 2000. – 462. – P. 83–100.
4. Lukash L.L., Man'ko V.G., Lylo V.V. Role of O6-Alkylguanine-DNA alkyltransferase in repairing lesions, induced by alkylating compounds // *Biopolym. Cell.* – 2001. – 17 (4). – P. 265–277.
5. Christmann M., Kaina B. Transcriptional regulation of human DNA repair genes following genotoxic stress: trigger mechanisms, inducible responses and genotoxic adaptation // *Nucl Acids Res.* – 2013. – 41 (18). – P. 1–18.
6. Gerson S.L. MGMT: its role in cancer aetiology and cancer therapeutics // *Nat. Rev. Cancer.* – 2004. – 4 (4). – P. 296–307.
7. Mitra S. MGMT: a personal perspective // *DNA Rep.* – 2007. – 6 (8). – P. 1064–1070.
8. Kyrtpoulos S.A. O6-Alkylguanine-DNA alkyltransferase: influence of susceptibility to the genetic effects of alkylating agents // *Toxic. Lett.* – 1998. – 102–103. – P. 53–57.
9. Lylo V.V., Matsevich L.L., Kotsarenko E.V., Babenko L.A., Kornelyuk A.I., Sukhorada E.M., Lukash L.L. Activation of gene expression of the O6-Methylguanine-DNA transferase repair enzyme upon the influence of EMAP II cytokine in human cells *in vitro* // *Cytology and Genetics.* – 2011. – 45 (6). – P. 373–378.
10. Kotsarenko K.V., Lylo V.V., Macewicz L.L., Babenko L.A., Kornelyuk A.I., Ruban T.A., Lukash L.L. Change in the MGMT Gene expression under the influence of exogenous cytokines in human cells *in vitro* // *Cytology and Genetics.* – 2013. – 47 (4). – P. 202–209.
11. Kotsarenko K.V., Lylo V.V., Macewicz L.L., Ruban T.A., Luchakivska Yu.S., Kuchuk M.V., Lukash L.L. Influence of some biologically active substances on the MGMT and MARP genes expression in human cells *in vitro* // *Cytology and Genetics.* – 2014, in press.
12. Kaina B., Christmann M., Naumann S., Roos W.P. MGMT: Key node in the battle against genotoxicity, carcinogenicity and apoptosis induced by alkylating agents // *DNA repair.* – 2007. – 6. – P. 1079–1099.
13. Natsume A., Ishii D., Wakabayashi T., Tsuno T., Hatano H., Mizuno M., Yoshida. J. IFN-B down-regulates the expression of DNA repair gene MGMT and sensitizes resistant glioma cells to temozolomide // *Cancer Res.* – 2005. – 65 (17). – P. 7573–7579.
14. Lavon I., Fuchs D., Zrihan D., Efroni G., Zelikovitch B., Fellig Y. Siegal T. Novel mechanism whereby nuclear factor kappaB mediates DNA damage repair through regulation of O(6)-methylguanine-DNA-methyltransferase // *Cancer Res.* – 2007. – 67 (18). – P. 8952–8959.
15. Lylo V.V., Macewicz L.L., Kotsarenko K.V., Babenko L.A., Kornelyuk A.I., Sukhorada E.M., Lukash L.L. Induction of repair enzyme O⁶methylguanine DNA methyltransferase gene expression under the influence of cytokine EMAP II in human cells *in vitro* // *Cytology and Genetics.* – 2011. – 45 (6). – P. 373–378.
16. Lis H., Sharon N.. Lectins: carbohydrate specific proteins that mediate cellular recognition // *Chem. Rev.* – 1998. – 98. – P. 637–674.
17. Karpova I.S., Koretskaya N.V. Study on modifying action of lectins on the toxic and mutagenic effects of Ni(II) ions in *Bacillus subtilis* culture // *Biopol Cell.* – 2003. – 19 (3). – P. 224–230.
18. Lukash L.L., Karpova I.S., Miroshnichenko O.S., Tikhonova T.N., Lylo V.V., Man'ko V.G., Sukhorada E.M., Golynskaia E.L. The effect of the lectin from *Sambucus nigra* inflorescences on spontaneous and alkylating agent-induced mutagenesis in mammalian somatic cells // *Cytol. Genet.* – 1997. – 31 (5). – P. 52–60.
19. Matsevych L.L., Kovalenko O.O., Sukhorada O.M., Lukash L.L. The influence of proteins on the genetic variability of cell populations *in vitro* // *Factors of experimental evolution of organisms (Collected works under the editor of Acad. M.V. Royik).* – Kyiv: Agricultural Sciences, 2003. – P. 91–97.
20. Kovalenko O.O., Kostetskaia K.V., Lukash L.L. The influence of proteins on the genetic variability of cell populations *in vitro* // *Biopolym. Cell.* – 2006. – 22 (1). – P. 33–38.
21. Macewicz L.L., Suchorada O.M., Lukash L.L. Influence of *Sambucus nigra* bark lectin on cell DNA under different *in vitro* conditions // *Cell Biology International.* – 2005. – 29. – P. 29–32.
22. Lylo V.V., Piven' O.O., Serebriakova K.V., Matsevich L.L., Lukash L.L. The influence of lectins on some repair processes in mammalian cells *in vitro* // *Ukr Biochem. J.* – 2008. – 80 (6). – P. 60–65.
23. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature.* – 1970. – 227. – P. 680–685.
24. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal. Biochem.* – 1976. – 72. – P. 248–254.
25. Aldridge G.M., Podrebarac D.M., Greenough W.T., Weiler I.J. The use of total protein stains as loading controls: An alternative to high-abundance single-protein controls in semi-quantitative immunoblotting // *Journal of Neuroscience Methods.* – 2008. – 172 (2). – P. 250–254.
26. Macewicz L.L., Kushniruk V.O., Iatsyshyna A.P., Kotsarenko K.V., Lylo V.V., Akopyan G.R., Huleuk N.L., Mykytenko D.M., Lukash L.L. Correlation the level of mutagenesis with expression of reparative enzyme O6-

MACEWICZ L.L., LYLO V.V., KARPOVA I.S., KOTSARENKO K.V., RUBAN T.A., LUKASH L.L.
Institute of Molecular Biology and Genetics of Natl. Acad. Sci. of Ukraine,
Ukraine, 03680, Kyiv, Akad. Zabolotnogo str., 150, e-mail: lukash@imbg.org.ua

PLANT AND ANIMAL LECTINES AS MODULATORS OF MGMT AND MARP GENE EXPRESSION *IN VITRO*

Aims. Previously for the first time we have studied the ability of lectins to influence the processes of mutagenesis and antimutagenesis in different test systems. The aim of present study was to examine the effect of panel of lectins on the MGMT and MARP expression levels in tumor and non-tumor mammalian cells *in vitro*. **Methods.** Standard cell cultivation methods and Western blot analysis were used. **Results.** The influence of plant and animal lectins (perk egg lectin, lentil seeds lectin and elderberry bark lectin) on expression of proteins recognized by anti-MGMT monoclonal antibodies (MGMT and MARP) on stable and destabilized human non-tumor and tumor-derived cell lines was studied. **Conclusions.** Studied lectins are able to modulate the expression of MGMT and MARP. The influence of SNA-I on MARP and MGMT expression levels depends on origin and genomic stability of cell line. SNA-I is perspective for further study as potential drug in anti-tumor therapy optimization schemes.

Key words: MGMT expression, MARP expression, lectins, NiCl₂, cell lines.

UDC 633.11:631.523:633.11

MOTSNY I.I.¹, SUDARCHUK L.V.¹, GALAEV A.V.¹, CHEBOTAR S.V.^{1,2}

¹ *Plant Breeding and Genetics Institute – National Center of Seed and Cultivar investigations,*
Ukraine, 65036, Odessa, Ovidiopolskaya dor., 3, e-mail: motsnyyii@gmail.com

² *Odessa National Mechnikov University, Department of Genetics and Molecular Biology,*
Ukraine, 65026, Odessa, Dvoryanskaya str., 2

APPLICATION OF PCR MARKERS FOR DETECTING 1B_L1R_S WHEAT-RYE CHROMOSOME TRANSLOCATIONS AND (1B)1R SUBSTITUTIONS

Nikolai Vavilov was the first to recognize the utilization of wheat relatives is a promising source for wheat improvement [1]. As an development of Vavilov's ideas a number of wheat introgression stocks with a high resistance to powdery mildew, leaf and stem rusts, frost tolerance, high protein content and some morphological characters has been obtained as a result of wide crosses [2, 3]. For a successful practical application the stocks require an identification of the alien introgressions. DNA markers become a useful tool for gene or chromosome identification, especially being valuable in respect of new for wheat an alien genetic material.

This paper deals with PCR marker assisted detection of (1B)1R wheat-rye chromosome substitution and 1B_L1R_S translocation, their meiotic behavior and genetic analysis of certain alien characters, incorporated into wheat. The investigation was carried out within a program for the development of a genetic collection of bread wheat lines with qualitative characters.

Material and methods

A set of original primitive introgression stocks ($2n = 42$): Erythrosperrum 200_97-2 (in further E200_97-2), Erythrosperrum 217_97 (E217_97), Hostianum 242_97-1 (H242_97-1), Hostianum 242_97-2 (H242_97-2), Hostianum 273_97 (H273_97), Hostianum 274_97 (H274_97) and OH232_03, collection sib-strains H74_90-245 and H74_90-258, winter bread wheat cv. Odesskaya 267 (Od267) and F₁ hybrids between Od267 and all the lines have been investigated. The majority of the stocks were developed from a cross: triticale (8x) cv. AD825/*T. durum* Desf. cv. Chernomor and spontaneous hybridization of the F₃ hybrids with the strain H74_90-245 or H74_90-258, or without it. Triticale AD825 is a primary amphidiploid (*T. aestivum* L. cv. Hostianum 237/*S. cereale* L. cv. Voronezhskaya SHI) [4]. The strains H74_90-245 and H74_90-258 were derived in Dobroudja Agricultural Institute (General Toshevo, Bulgaria) from the step cross: Dr. Savov's synthetic (*T. timopheevii* Zhuk./*Ae. tauschii* Coss.)/Tom Pouce

Blanc//Avrora/3/Rusalka and received from Dr. Ivan Panayotov. The stock OH232_03 was obtained from a cross Od267/H74_90-258.

All lines were analyzed by using DNA-markers. DNA was isolated from leaf material of adult plants and seedlings according to standard CTAB-methods. Because 1R_S chromosome presence, as well as some target gene location were supposed, the molecular markers: rye microsatellites: *Xrems1303*, *SR1R003* [5], a secalin-specific STS-marker – ω -*sec*-P3 + ω -*sec*-P4 [6] and wheat microsatellites: *Xgwm18*-1B_S, *Xgwm550*-1B_S, *Xgwm140*-1B_L, *Xgwm153*-1B_L, *Xgwm357*-1A_L [7], *Taglut*-1A_S [8] were chosen for the analysis. PCR amplification was carried out in a thermocycler ‘Tercik’ (Russia), and a standard electrophoresis procedure in 10 % poly acrylamide gel (PAAG) was applied for differentiation of PCR products [9]. Fragment sizes were calculated by comparison with molecular weight marker pUC19/MspI. 1R_S chromosome presence was detected with the rye microsatellites and the secalin-specific STS-marker. Substitution or translocation was identified by the absence of 1B chromosome corresponding arm via application of the wheat microsatellites.

Resistance to powdery mildew, leaf and stem rusts, hairiness of the glumes and leaves was evaluated within researched material to contain. Moreover, the stocks, cv. Od267 and the F₁s were studied cytologically with routine acetocarmine methods. The chromosome substitution or translocation presence in the stocks and the strains was confirmed cytologically for meiotic configurations at metaphase I (MI) in pollen mother cells (PMCs) of the F₁ hybrids.

Plant pathogen resistance was evaluated at the adult plant stage in field with use of an international universal scale. Furthermore, powdery mildew resistance was noted in field in later autumn at the seedling stage. Leaf and stem rust resistance were scored both at natural epiphytoty conditions and under an artificial infection pressure. Herewith, population mixtures of the most aggressive local races of both diseases were used. All phenotypical evaluations were conducted under field conditions at the heading and flowering stages. Hairiness (pubescence) was searched on the glumes, upper (adaxial) and lower surfaces of a leaf blade, as well as on the leaf margin at the culm node using a magnifying glass.

Results and discussion

The presence of 1R_S chromosome was detected in the introgression stocks and sib-strains by the presence of specific products of: *Xrems1303*, *SR1R003*, ω -*sec*-P3 + ω -*sec*-P4 markers. The absence of PCR products with the markers *Xgwm18* (1B_S), *Xgwm550* (1B_S), as well as *Xgwm140* (1B_L) and *Xgwm153* (1B_L) permitted to identify 1B chromosome translocation or substitution. The detection of PCR-products of the *Taglut* (1A_S) and *Xgwm357* (1A_L) markers proved the presence of intact 1A chromosome in the lines. The amplification products with the markers *Xgwm140* and *Xgwm153* were not detected for the stocks H273_97 and H274_97, but were obtained within collection sib-strains and for the stocks E200_97-2, H217_97, H242_97-1, H242_97-2 and OH232_03, as well (Table 1). Thus, the stocks H273_97 and H274_97 carry (1B)1R substitution, and all other lines carry 1B_L.1R_S translocation chromosome.

Table 1. Results of PCR-analysis of the lines studied for the marker loci alleles, bp

Marker locus	Od267	H74_90-245	H74_90-258	E200_97-2	E217_97	H242_97-1	H242_97-2	H273_97	H274_97	OH232_03
<i>Xrems1303</i> (1R _S)	-*	290	290	290	290	290	290	290	290	290
<i>SR1R003</i> (1R _S)	-	97	97	97	97	97	97	97	97	97
ω - <i>sec</i> -P3/P4 (1R _S)	-	400	400	400	+ [#] /-	400	400	400	400	400
<i>Xgwm18</i> (1B _S)	186	-	-	-	188	-	-	-	-	-
<i>Xgwm550</i> (1B _S)	195	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Xgwm140</i> (1B _L)	223	223, 233	223, 233	223, 233	223, 233	223	223	-	-	223, 233
<i>Xgwm153</i> (1B _L)	195	195	195	195	195	195	195	-	-	195
<i>Taglut</i> (1A _S)	126	137	134	135	131	128	128	128	128	131
<i>Xgwm357</i> (1A _L)	124	124	124	124	124	124	124	124	124	124

Notes: * – the primer product absence; [#] Size of DNA amplification fragment in PAAG is more than 400 bp at the stock E217_97.

In general there was no polymorphism of rye DNA markers among the lines with the introgressions. Only by using the secalin-specific ω -*sec*-P3 + ω -*sec*-P4 primers a genetic polymorphism has been detected supposing a new allele of *Sec1* locus in the stock E217_97. The presence of the product 188 bp with the *Xgwm18* marker simultaneously with rye DNA fragments (Table 1) has proved the translocation heterozygosity in that stock.

Meiotic observations have supported the molecular-genetic evidence and have revealed 20 closed bivalents (the maximum) plus an open bivalent ($20^{II}_C + 1^{II}_O$) at MI in the F_1 hybrids Od267/translocation stocks (fig. 1, a). Similarly 20 bivalents and 2 univalents ($19^{II}_C + 1^{II}_O + 2^I$) were observed in the F_1 s Od267/substitution

stocks (fig. 1, b). The translocation $1B_L.1R_S$ heterozygosity has also been confirmed in the stock E217_97: some F_1 plants Od267/E217_97 had $20^{II}_C + 1^{II}_O$ as the highest meiotic association and the others – 21^{II}_C (fig. 1, c).

The pairing between short arms of 1R and 1B chromosomes has not been well documented in literature. In this study there was no pairing between 1R and 1B chromosomes in any 322 PMCs studied in the H273_97/Od267 and H274_97/Od267 crosses. In the contrast, 21^{II}_C were observed in 3 meiotic PMCs of 894 (0.3 %) studied in the F_1 s between Od267 and the introgression stocks E200_97-2, E217_97 (plants with $1B_L.1R_S$ translocation), H242_97-1 and H242_97-2. Therefore, the $1B_L.1R_S$ translocation of the stocks might rarely pair with $1B_S$ chromosome.

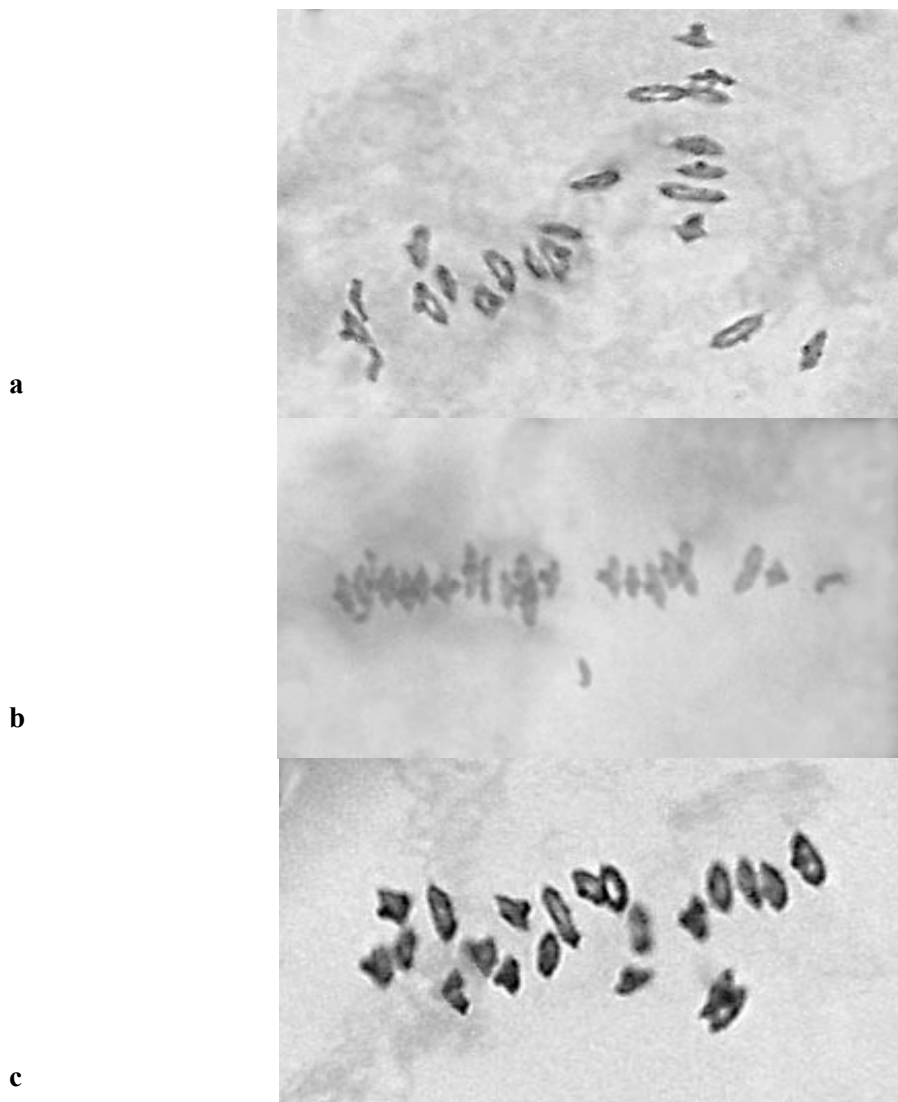


Fig. 1. The highest chromosome associations at meiotic MI of F_1 hybrids between cv. Od267 and (a) line E242_97-1: $20^{II}_C + 1^{II}_O$; (b) line H274_97: $19^{II}_C + 1^{II}_O + 2^I$; (c) line E217_97 (plants without $1B_L.1R_S$ translocation): 21^{II}_C (590 \times)

Thereby, investigated introgression stocks and the collection sib-strains have (1B)1R wheat-rye chromosome substitution or 1B_L.1R_S translocation. That was determined and identified with use of PCR-markers (Table 1) and confirmed cytologically (fig. 1). The translocation was contributed by the collection sib-strains H74_90-245 and H74_90-258 and derived from Russian wheat cv. *Avrora*. Therefore, the rye 1R_S chromosome is originated from Petkus rye. This chromosome arm transferred to bread wheat genetic background carries genes, important for the adaptation of wheat varieties, particularly closely linked the genes *Pm8*, *Yr9*, *Lr26* and *Sr31* [10]. The intact rye chromosome 1R for the substitution was contributed by triticale (8x) cv. AD825 and, therefore, originated from *S. cereale* L. cv. Voronezhskaya SHI. Evidently, such chromosome rearrangements are known to occur in wheat-rye or wheat-triticale crosses [11].

Due to their agronomic advantages translocations with 1R_S are usually widespread in cultivars from Forest-Steppe zone of Ukraine, but not from South. In South Ukraine 1R_S chromosome has not been used in wheat breeding, because of traditional to PBGI – NCSCI storage protein composition selection for the high technological quality [12]. However, nowadays a program for wheat-rye translocation use in wheat breeding has been started [13] and the cvs Zhitnitsa (with 1A_L.1R_S translocation, leaf and stem rust resistance and middle quality) and Schedrist' (with 1B_L.1R_S translocation and low quality) have been developed.

Depending on karyotype structure the stocks were considerably distinguished by powdery mildew, leaf and stem rust resistance and by the presence of morphological characters (hairy spike or leaf). The lines E200_97-2, H242_97-1, H242_97-2, H74_90-245 and H74_90-258, carrying the 1B_L.1R_S translocation from cv. *Avrora*, had high resistance to all the diseases. There were three and two genes for resistance, respectively, to leaf and stem rusts in the lines, and *Lr26* and *Sr31* among them [14]. Cv. Od267 was susceptible. The stocks H273_97 and H274_97 were moderately infected by powdery mildew and stem rust (MS) and did not have any leaf rust resistance (S-VS). E217_97 was somewhat resistant (MS-MR) to powdery mildew only at the adult plant stage, and OH232_03 was susceptible (MS) to stem rust.

As to a pubescence, the presence of typical wheat *Hg1* gene (short and weak glume hairiness like in cv. *Ulyanovka*) in the stocks of *Hostianum*

species (H242_97-1, H242_97-2, H273_97 and H274_97) is determined. The gene is located in 1A_S chromosome [10] and is originated from old cv. *Hostianum* 237 – a parental form for the octoploid triticale AD825. The *Hg1* gene coding hairiness of glumes Mendelian mode of inheritance was determined: 63 haired: 16 not haired ($\chi^2_{3:1} = 0.95$) F₂ hybrids in a test-cross with Od267.

As for leaf blade hairiness, the stocks E217_97, H273_97 and H274_97 were identified as glabrous ones, and cv. Od267 had a thin layer of hairs on the adaxial surface. In contrast, the stocks E200_97-2, H242_97-1 and H242_97-2, as well as the collection strains H74_90-245 and H74_90-258 were found to carry hairiness on upper and lower surfaces, as well as on leaf margin at leaf base. Three major linked genes determining hairiness of the leaf upper surface (*Hl^{up}*), lower surface (*Hl_{low}*) and leaf margin (*Hlm*) were revealed with location, supposedly, on the long arm of chromosome 4D. The genes were contributed by a synthetic (*T. timopheevii* Zhuk./*Ae. tauschii* Coss) and, therefore, were originated from *T. timopheevii* or *Ae. tauschii*. The *Hl^{up}*, *Hl_{low}* and *Hlm* loci are non-allelic to *Hl* gene. In wheat the alleles *Hg* and *Hl* determine hairiness of glumes or leaf pubescence which allows them to avoid drought and high temperatures during the vegetation or grain filling [10].

Conclusion

With use of molecular-genetic and cytological analyses (1B)1R wheat-rye chromosome substitution or 1B_L.1R_S translocation were detected in the original primitive introgression stocks. The pairing between 1R_S and 1B_S chromosomes was revealed with very low frequency. Three and two genes for resistance, respectively, to leaf and stem rusts were revealed, and *Lr26* and *Sr31* among them have been recognized and determined to be somewhat effective. The genes were identified with the molecular markers *Xrems1303*, *SR1R003*, ω -*sec*-P3 + ω -*sec*-P4, contributed by cv. *Avrora* and originated from Petkus rye.

The *Hg1* gene coding hairiness of glumes Mendelian mode of inheritance was determined. Three major linked genes determining hairiness of the leaf upper surface (*Hl^{up}*), lower surface (*Hl_{low}*) and leaf margin (*Hlm*) were revealed. The glume hairiness gene was contributed by the old cv. *Hostianum* 237. The leaf pubescence genes were contributed by a synthetic (*T. timopheevii* Zhuk./*Ae. tauschii* Coss) and, therefore, originated from *T. timopheevii* or *Ae. tauschii*. The *Hl^{up}*, *Hl_{low}* and *Hlm* loci are non-allelic to *Hl* gene.

References

1. Dzyubenko N.I. Genetic resources for plant breeding: past, present and future // Abstract book International Plant Breeding Congress, 10–14 November 2013. – Antalya, Turkey, 2013. – P. 77.
2. Motsnyy I.I., Liphenko S.F., Koval T.N. Inheritance of resistance to fungal diseases by wide hybrids between wheat and amphiploids // Cytology and Genetics (Kiev, Ukraine). 2000. – 34, N 2. – P. 46–56. (in Russian with English summary).
3. Motsnyy I.I., Koval T.N., Liphenko S.F. Inheritance of frost resistance and winter hardiness by distant hybrids of wheat and amphiploids // Cytology and Genetics (Kiev, Ukraine). 2000. – 34, N 6. – P. 9–20. (in Russian with English summary).
4. Badaev N.S., Badaeva E.D., Maximov N.G., Volkov D.K., Zelenin A.V. Differences in rye chromosome structure in the karyotype of triticale // Proc. Ac. Sci. USSR (Dokl. AN SSSR, Moscow: Nauka). – 1982. – 267, N 4. – P. 953–956. (in Russian).
5. Landjeva S., Korzun V., Tsanev V., Vladova R., Ganeva G. Distribution of the wheat-rye translocation 1BL.1RS among bread wheat varieties of Bulgaria // Plant Breeding. – 2006. – 125. – P. 102–104.
6. Chai J.F., Zhou R.H., Jia J.Z., Liu X. Development and application of a new codominant PCR marker for detecting 1BL.1RS wheat-rye chromosome translocations // Plant Breeding. – 2006. – 125. – P. 302–304.
7. Rder M.S., Korzun V., Wendehake K., Plaschke J., Tixier M.H., Leroy P., Ganal M.W. A microsatellite map of wheat // Genetics. – 1998. – 149. – P. 2007–2023.
8. Devos K.M., Bryan G.J., Collins A.J., Stephenson P., Gale M. D. Application of two microsatellite sequences in wheat storage proteins as molecular markers // Theoretical and Applied Genetics. – 1995. – 90. – P. 247–252.
9. Maniatis T., Fritsch E.E., Sambrook J. Molecular cloning. A laboratory manual. – Cold Spring Harbor Laboratory, 1982. – 480 p.
10. McIntosh R.A., Dubcovsky J., Rogers W.J., Morris C., Appels R., Xia X.C. Catalogue of gene symbols for wheat: 2012 Supplement [E-resource] // Komugi – Integrated wheat science database. – 2012. – Available online: <http://www.shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/genes/symbolClassList.jsp>
11. Bartoљ P. Chromosome 1R of rye in wheat breeding // Plant Breeding Abstracts. – 1993. – 63. – P. 1203–1211.
12. Chebotar S. Molecular-genetic analysis of Ukrainian bread wheat gene pool // Abstract book International Plant Breeding Congress, 10–14 November 2013. – Antalya, Turkey, 2013. – P. 624.
13. Topal N.N. Identification and agronomy characteristic of bread winter wheat varieties and lines with wheat-rye translocations // Abstracts international scientific conference “Breeding and genetics of agricultural crops: traditions and prospects”, 17–19 October 2012. – Odesa, Ukraine, 2012. – P. 199–200. (in Ukrainian with English summary).
14. Sudarchuk L.V., Chebotar S.V., Motsny I.I., Sivolap Yu.M. Hybridological and recombination analysis of alien characters in F₂ introgression hybrids of winter wheat using molecular markers // Coll. Sc. Papers V International conference “The genome of plants”, 13–16 October 2008 / South Plant Biotechnology Center UAAS (Ukraine). – Odessa, Ukraine, 2008. – P. 127–130. (in Russian with English summary).

MOTSNY I.I.¹, SUDARCHUK L.V.¹, GALAEV A.V.¹, CHEBOTAR S.V.^{1,2}

¹ Plant Breeding and Genetics Institute – National Center of Seed and Cultivar investigations, Ukraine, 65036, Odessa, Ovidiopol'skaya dor., 3, e-mail: motsnyyii@gmail.com

² Odessa National Mechnikov University, Department of Genetics and Molecular Biology, Ukraine, 65026, Odessa, Dvoryanskaya str., 2

APPLICATION OF PCR MARKERS FOR DETECTING 1B_L.1R_S WHEAT-RYE CHROMOSOME TRANSLOCATIONS AND (1B)1R SUBSTITUTIONS

Aims. Molecular-genetic and cytological analyses were carried out to detect the alien genes in original introgression stocks and to investigate their inheritance. **Methods.** Rye (*Xrems1303*, *SR1R003*) and wheat (*Xgwm18-1B_S*, *Xgwm550-1B_S*, *Xgwm140-1B_L*, *Xgwm153-1B_L*, *Xgwm357-1A_L*, *Taglut-1A_S*) microsatellites and secalin-specific STS-marker (ω -sec-P3+ ω -sec-P4) have been applied. **Results.** The (1B)1R wheat-rye chromosome substitution and 1B_L.1R_S translocation have been identified. The pairing between short arms of the 1B_L.1R_S translocation and of bread wheat chromosome 1B was observed with very low frequency (in 0.3 % PMCs). **Conclusions.** The stocks have (1B)1R wheat-rye chromosome substitution or 1B_L.1R_S translocation. The translocation was contributed by the collection strains, derived from wheat cv. Avrora and originated from Petkus rye. The intact rye chromosome 1R for the substitution was contributed by triticale (8x) cv. AD825 and originated from rye Voronezhskaya SHI. The substitution stocks were susceptible to leaf and stem rusts because of another origination of the 1R chromosome. Three major linked genes determining hairiness of the leaf upper surface (*Hl^{up}*), lower surface (*Hl_{low}*) and leaf margin (*Hlm*) were revealed. The genes were contributed by a synthetic (*T. timopheevii/Ae. tauschii*) and were non-allelic to *Hll* gene.

Key words: *Triticum aestivum*, (1B)1R substitution, 1B_L.1R_S translocation, hairy leaf, PCR-markers.

INCREASING GRAIN YIELD POTENTIAL AND STABILITY IN DURUM WINTER WHEAT IN UKRAINE

Invests into a soil and water unit will be decreasing during next century due to prognoses. Scientific investigations show that seed wheat production must grow up on 1.6 per cent a year next 20 years to satisfy wheat requirement in the world. This complete task to intensify theoretical and practical breeding and secure further rise in wheat seed production [1]. Durum wheat was spread on 15.5–18.3 mln ha and annual seed production – 30–35 mln ton. Average yield of it is 2.2 t/ha, that on 0.5 t/ha more than main yield of durum wheat in 1986 year [2]. This progress was possible because of significant increase of breeding work level in the world. During 27 years (1967–1994) harvest increasing of spring durum wheat was 1.7 per cent a year, and twice times more than progress of bread wheat breeding (0.9 per cent last 30 years) [3, 4]. In Ukraine we must to provide in production winter durum wheat varieties two-three times preyielded spring varieties of this culture because of more effective using of autumn-winter moisture of soil. We tested futures and peculiarities of the culture and as a result of breeding work in Plant Breeding and Genetics Institute (PBGI) the seed harvest of new varieties 3.41–4.36 t/ha more than the first var. Michurinka and Novomichurinka had.

Material and methods

The first varieties of typical winter durum wheat Michurinka and Novomichurinka were created by interspecies hybridization varieties of bread winter and durum spring wheat, following by saturated crosses with bread winter wheat. Systematic improving of durum winter wheat has been initiated on the 70th of the XX century. New initial material of winter durum wheat was created on introgression of dwarf-genes and alleles with low photoperiodic sensitiveness, improving of flower fertility and resistance to biotic and abiotic stress. Dwarfness donors in hybridization were the most frost and winter resistant varieties of durum winter wheat of extensive type: Novomichurinka, Rubizch, Odeska Jubileina, Kharkivska 1 and est.

Results and discussion

As a result of these researches the initial

material was created and potential of productivity raised up to 2.0–2.5 times. Development on this material of breeding program gave a possibility to breed the first varieties of shortness durum winter wheat in the Soviet Union. There were Parus and Koral Odesky registries in 1983 and 1985 years in the State varieties Register of the Ukraine and Russian Federation. Productivity of durum winter wheat have increased on 2.3 t/ha compare to Michurinka and Novomichurinka, and on 1.8 t/ha respectively to cultivated varieties [5, 6]. During this period 5 strain renovations have place in the Ukraine. Grain yields of durum winter wheat varieties increased on 4.36 t/ha, or 148.8 per cent (table 1), under comparative condition of tests. Absence of stabile yields of new varieties in years had shown low level of their adaptive to stress factors of environment. The main abiotic factors decreased stability of yield in the Sought Ukraine was low resistance to frost, winter and drought. As far as simple interspecies and top crosses did not give adapted to local conditions varieties of durum winter wheat, then this problem was solved by polystaged hybridization with adaptive to stress conditions initial material. Long term investigation of the PBGI and other institutes had demonstrated that all relatively frost and winter resistant varieties and forms of durum winter wheat included cytoplasm of winter resistant varieties of bread winter wheat. High winter resistant varieties of bread winter wheat and well adapted to local conditions varieties and forms of durum winter wheat of our own breeding have been included to breeding work to create winter and frost resistant initial material. On plants F₁ of species hybrids have been made following crosses by winter and frost resistant varieties and forms of durum winter wheat to confirm tetraploid genome stability and its winter resistance. After some years of selection hybrid material has been crossed with winter resistant varieties of bread and durum wheat from different agro ecological zones that allowed accumulating adaptive features in initial material.

Table 1. Grain yields of durum winter wheat in different strain renovation in comparison varieties test of PBGI in 2007–2010 years (background-black fallow)

Strain renovation	Variety	Years of cultivation	Average grain yield, t/ha	Over yield on strain renovation, t/ha	
				The first	The previous
I	Michurinka Novomichurinka	1960–1968 1963–1970	2.93	-	- 0.28
II	Rubizch Odeska Jubileina	1969–1975 1972–1980	3.43	0.50	0.50
III	Parus Koral Odesky	1983–2000 1985–2002	5.23	2.30	1.80
IV	Iceberg Odesky Aliy Parus Delfin Argonavt Perlina Odeska Zolote Runo Laguna	1990 1993 1999 2001 2001 2004 2005	6.34	3.42	1.11
V	Gardemarine Burshtyn Kontinent Tavrída Kreiser Lincor Bosfor Gavan	2006 2007 2008 2009 2010 2010 2011 2011	7.29	4.36	0.95

Breeding of durum winter wheat in the PBGI had carried from long straw extensive varieties with a number of negative features and indexes to semi dwarf and dwarf varieties with increasing productivity and improving their economic characteristics. Yield of modern varieties of durum winter wheat compare to the first of them – Michurinka and Novomichurinka increased on 2.5 times in steppe zone and on 2.8–3.0 times in forest-steppe zone. Plants height had decreased from the third to the fifth varieties exchange on 45.1; 36.0; 33.3 cm compared to the first one. Yield has in that groups gradually increased on 2.3; 3.4; 4.4 t/ha. At that time frost resistance had increased too. That is why frost resistance collection and breeding material were tested by freezing in climatizer at 17–19 °C of frost. Varieties Aliy Parus, Perlina Odeska, Gardemarine, Burshtyn, Tavrída and Bosfor had higher frost resistance compare to standard Iceberg Odesky, and Laguna and Kontinent had the same.

Level of frost resistance of durum winter wheat given on figure 1 was confirmed by unprecedented freezing under field conditions from 29 January to 15 February 2012 when temperature in tillering node was -8.5 – -11.3 °C without of any

snow cover. Living plants were counted per 1m² before harvest (table 2). Under hard winter conditions the next varieties: Iceberg Odesky, Aliy Parus, Perlina Odeska, Gardemarine, Burshtyn, Tavrída, Kontinent and Bosfor were characterized by high frost resistance. The best frost and winter resistance had demonstrated varieties which had necessity in long time vernalization and strong photoperiodic sensitivity. But more sustained yield of grain in the South of Ukraine gave varieties of durum winter wheat with long term vernalization necessity (30–35 days) and semi strong photoperiodic sensitivity. They earlier begin to vegetate and better used soil moisture in spring. Iceberg Odesky is one of such a variety; it occupies the main areal in the south part of winter wheat zone of SNG countries (28 regions and districts). Varieties Argonavt, Laguna, Gardemarine, Tavrída and Gavan are the same rate. Varieties characterized by middle necessity in vernalization and neutral reaction on photoperiodic sensitivity (Perlina Odeska, Burshtun, Kontinent) better then others used soil moisture after winter to form high productivity.

Table 2. Frost resistance of durum winter wheat varieties in the ecological varieties test 2011–2012 years (black fallow, planting rate 5 mln germinating seeds on hectare, date of sowing 7.10.2011)

NN	Variety	Frost resistance		NN	Variety	Frost resistance	
		plants	per sent			plants	per sent
1	Novomichurinka	194	38.8	12	Zolote Runo	186	37.2
2	Odeska Yantarna	166	33.2	13	Laguna	254	50.8
3	Rubizch	190	38.0	14	Gardemarine	258	51.6
4	Odeska Jubileina	189	37.8	15	Burshtyn	268	53.6
5	Parus	142	28.4	16	Kontinent	256	51.2
6	Koral Odesky	199	39.8	17	Tavrida	255	51.0
7	Iceberg Odesky	276	55.2	18	Kreiser	218	43.6
8	Aliy Parus	282	56.4	19	Lincor	193	38.6
9	Delfin	214	42.8	20	Bosfor	288	57.6
10	Argonavt	251	50.2	21	Gavan	229	45.8
11	Perlina Odeska	257	51.4	22	Kassiopeya	225	45.0

Microevolution of durum winter wheat breeding in Ukraine directed to decreasing straw height for improving varieties resistance to lodging and increasing of yield index (table 3). Reducing of straw height due to change of plant architectonics and different elements of yield structure. On the first stage of straw height reducing (var. Parus and Koral Odesky – the third renovation) significant yield increase was achieved by rise of grain mass in kernel on 0.35, grain mass from plant – 0.7, and seed size – 14.9 g. Productive tillering of the varieties increased on 0.15 pieces. Redistribution of plastic matters during ontogenesis for grain part of plant from common biological yield was confirmed by yield index.

Ratio of common plants biomass and grain part before harvest for taller varieties was 0.19–0.27, and for Parus and Koral Odesky 0.60 and 0.59, relatively Grain part increased in common biological yield on 2.2–3.1 times. The first semi dwarf varieties Parus and Koral Odesky had significantly increased productive potential of durum winter wheat, but they were quit sensibly to uncomfortable environments which were very typical for the North Black sea region. It was necessary to improve adaptive features of new varieties by breeding polystaged hybridization was used – created semi dwarf forms were crossed with adapted to local conditions varieties and forms of durum winter wheat. Var. Iceberg Odesky (1985) and Aliy Parus (1990) were the result of this breeding work.

The varieties were cultivated in the Steppe and Forest steppe zone of Ukraine and in the other countries more then 20 years. Into the Register were introduced var. Delfin, Argonavt, Perlina Odeska, Zolote Runo, Laguna, which were characterized by higher yield and grain quality, good reaction on

high fertilizing and complex resistance to spreaded diseases. Different elements of yield structure ensured rise of their productivity. Risen grain yield of these varieties was the result of growing biomass (+0.62 kg/m²). Decreasing of yield index (-13.9) did not affected their productivity because of increasing grain number in main spike (+6.2) and other productive spires of plant (+0.09 g). Although rate of grain fulling became better (varieties headed and matured later), raised seed volume weigh due to its uniform. In fact the yield of these varieties raised on 0.06 kg/m² compare to Parus and Koral Odesky. Varieties of durum winter wheat had included to the Register of plants (2006–2011), Gardemarine, Burshtyn, Kontinent, Tavrida, Kreiser, Lincor, Bosfor and Gavan, increased their yield by rising of biomass (+0.12 kg/m²) and number of grains in a spike (+0.05 kg/m²). Main spike had on 3.2 grain more (in average) and it's weight became more on 0.07g for this pike and 0.22g from other one. Yield index increased (+1.2) too, but 1000 grain weight had decreased (-2.8 g).

Conclusions

Introgression into genotype of extensive varieties of durum winter wheat genes of dwarfness and alleles of low photoperiodic sensitivity resulted by grain yield rising on 18.0 c/ha compare to previous varieties exchange. These modifications become possible because of redistribution of plastic matters during ontogenesis to grain part, as yield index showed. Yield index of extensive varieties was 0.19–0.27, varieties Parus and Koral Odesky had yield indexes – 0.60 and 0.59, respectively. Grain part had increased in total biological yield on 2.2–3.1 times. Productivity increasing of varieties of durum winter wheat was dependent on rising of biomass (+0,62 kg/m²), at first. Although yield index had decreased (-13.9), new varieties had more

grains in a main spike (+6.2) and in other productive spikes (+0.09 g) and total on one square meter.

Varieties of the last germination had yield increasing due to rising of biomass (+0.12 kg/m²), grain number in a spike on 1m² (+0.05 kg/m²). Grain number in a spike increased on 3.2 grains, and their weight from a spike – on 0.07 g, and from regrowthes – 0.22 g yield index had demonstrated

some increasing (+1.2) and decreasing of 1000 grain mass (-2.8 g). Modern varieties of durum winter wheat had more prolonged period of vegetation on 2–3 days.

Increasing of potential productivity and stability of grain yield of durum winter wheat can't be achieved without high adaptability to a biotical and biotical factors of stress environment.

Table 3. Index of yield structure of durum winter wheat varieties of PBGI, breeding which were introduce to the Register of plant varieties of Ukraine (average for 2008–2011 years)

Variety	Plant height, cm	Lodging resistance points	Yield, kg/m ²			Crop yield index
			straw	grain	biomass	
Novomichurinka	132.7	4.0	1.65	0.31	1.96	0.19
Rubizch	128.5	3.0	1.78	0.45	2.23	0.25
Odeska Yubileina	143.9	3.5	1.86	0.49	2.35	0.27
Parus	86.7	5.0	1.35	0.82	2.17	0.60
Koral Odesky	88.6	5.0	1.37	0.82	2.19	0.59
Iceberg Odesky	93.6	4.5	1.80	0.87	2.67	0.48
Aliy Parus	94.6	4.5	1.79	0.94	2.73	0.52
Delfin	99.1	4.5	1.95	0.82	2.77	0.42
Argonavt	97.7	4.5	1.98	0.93	2.91	0.47
Perlina Odeska	96.4	5.0	2.02	0.94	2.96	0.46
Zolote Runo	102.8	4.5	1.92	0.79	2.71	0.41
Laguna	93.0	5.0	2.02	0.87	2.89	0.43
Gardemarine	98.2	5.0	2.15	0.93	3.08	0.43
Burshtyn	101.6	4.5	1.96	1.03	2.99	0.52
Kontinent	94.4	5.0	1.86	0.90	2.76	0.48
Tavrída	95.1	5.0	1.90	0.93	2.83	0.49
Kreiser	101.1	4.5	2.05	0.94	2.99	0.46
Lincor	93.3	5.0	1.95	0.87	2.82	0.45
Bosfor	104.4	5.0	2.02	0.91	2.93	0.45
Gavan	106.8	4.5	2.02	0.93	2.95	0.46

References

1. Byerlee D., Traxler G. estimation of actual spillovers of national and international wheat improvement research. // In Marelda M.K. and Byerlee D. (ads) The Global Wheat Improvement System: Prospects for Enhancing Efficiency in the presence of Spillovers. CIMMIT Research Report. – CIMMYT, Mexico, 1999. – N 5. – P. 46–59.
2. World Wheat Statistics // International Wheat Council, 28 Haymarket. – London, SWLGm, 1986. – 4SS.
3. Calderini D.F., Reynolds M.P., Slafer G.A. Genetic gains in wheat yield and main physiological changes associated with them during the 20th century // In: Sattore E.H. Slafer G.A. (eds), Wheat: Ecology and Physiology of Yield Determination. Food Products Press. – New York, 1999. – P. 351–377.
4. Pfeiffer W.H. Enhancing genetic grain yield potential in durum wheat and triticale / W.H. Pfeiffer, K.D. Sayre, M. Mergoum // In *Increasins Yield Potential in Wheat: Breeding the Barrires*, eds. M.P. Reynolds, S. Rajaram and A. McNab. – Mexico City, Mexico DF: CIMMYT, 1996. – P. 208–213.
5. Kirichenko F.G. Methods and results of breeding durum wheat in the Steppe regions of Ukranian S.S.R. // *Genetics and Breeding of durum wheat: Proceedings of a Symposium organized by the Section Cereals of the European Association for Research of Plant Breeding (EUCARPIA) and by the Plant Breeding Institute of the University of Bari*, eds. G.T. Scarascia Mugnozza, held in Bari, 14–18 May, 1973. – P. 305–310.
6. Palamarchuk A.I. Breeding of Intensive Type Durum Winter Wheat Varieties to Increase Adaptation Potential // In *Wheat Breeding Prospects and Future Approaches: Proceedings of International Symposium by the Agricultural Academy Institute for Wheat and Sunflower "DOBRODJA"*, eds. I. Panayotov, S. Pavlova, June 4TH – 8TH 1990. – P. 71–75.

PALAMARCHUK A.I.

Plant Breeding & Genetics Institute – National Center of Seed and Cultivar Investigation, Ukraine, 65036, Odessa, Ovidiopolskaya road, 3, e-mail: a_palamarchuk@ukr.net

INCREASING GRAIN YIELD POTENTIAL AND STABILITY IN DURUM WINTER WHEAT IN UKRAINE

Aims. To test different features of yield structure and adaptive qualities of durum winter wheat varieties this influenced on significant rise of yield potential and stability. **Methods.** The first varieties of typical winter durum wheat were created by interspecies hybridization varieties of bread winter and durum spring wheat, following by saturated crosses with bread winter wheat. **Results.** Introgression into genotype of extensive varieties of durum winter wheat genes of dwarfness and alleles of low photoperiodic sensitivity resulted by grain yield rising on 1.8 t/ha compare to previous varieties exchange. These modifications become possible because of redistribution of plastic matters during ontogenesis to grain part, as yield index showed. Productivity increasing of varieties of durum winter wheat was dependent on rising of biomass (+0.62 kg/m²), at first. **Conclusions.** Increasing of potential productivity and stability of grain yield of durum winter wheat can't be achieved without high adaptability to a biotical and biotical factors of stress environment.

Key words: durum winter wheat, yield potential, varieties, adaptability.

НАУКОВЕ ВИДАННЯ

**ФАКТОРИ
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ
ЕВОЛЮЦІЇ ОРГАНІЗМІВ**

**ФАКТОРЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ
ЭВОЛЮЦИИ ОРГАНИЗМОВ**

**FACTORS IN EXPERIMENTAL
EVOLUTION OF ORGANISMS**

Збірник наукових праць
ТОМ 15

Технічний редактор: *М. З. Мосула*
Комп'ютерна верстка *О. В. Лохвицький*
Коректура автора
Художнє оформлення *Є. Ю. Музиченка*

Підписано до друку 25.07.2014. Формат 60×84¹/₈ Папір офс. № 1.
Гарнітура “Таймс”. Друк офс. Ум. друк. арк. 32,1 Обл.-вид. арк. 33,4
Наклад 300 прим. Зам. 501.

Віддруковано у видавництві “ЛОГОС” з оригіналів автора.
Свідоцтво суб’єкта видавничої справи ДК № 201 від 27.09.2000 р.
01030, Київ-30, вул. Богдана Хмельницького, 10, тел. 235-6003