

Національна академія наук України
Українська академія аграрних наук
Академія медичних наук України
Українське товариство генетиків і селекціонерів
ім. М.І. Вавилова

ФАКТОРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ЕВОЛЮЦІЇ ОРГАНІЗМІВ

Національна академія наук України
Українська академія аграрних наук
Академія медичних наук України
Українське товариство генетиків і селекціонерів
ім. М.І. Вавилова

ФАКТОРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ЕВОЛЮЦІЇ ОРГАНІЗМІВ

Збірник наукових праць

ТОМ 5

Присвячено:

90-річчю від часу заснування
Української академії наук

**Київ
ЛОГОС
2008**

РЕДАКЦІЙНА КОЛЕГІЯ

Барияк І.Р. – д - р мед. наук; Блюм Я.Б. – д-р біол. наук, академік НАНУ; Вагіна І.М. – канд. біол.наук; Дубровна О.В. – д-р біол. наук (заст.головного редактора); Кунах В.А. – д-р біол. наук, чл.- кор. НАНУ(головний редактор); Кучук М.В. – д-р біол. наук; Лялько І.І. – канд.біол.наук; Лукаш Л.Л. – д-р біол. наук; Малюта С.С. – д-р біол. наук, чл.-кор. НАНУ; Михайлов В.Г. - д-р с.-г. наук, чл.- кор. УААН; Моргун В.В. – д-р біол. наук, академік НАНУ; Сиволап Ю.М. – д-р біол. наук, академік УААН; Созінов О.О. – д-р біол. наук, академік НАНУ

*Затверджено до друку рішенням
вченої ради Інституту молекулярної біології
і генетики НАН України (протокол №7 від 30 травня)*

УДК 578.08.631.52

Фактори експериментальної еволюції організмів: Зб. наук. пр./Укр. т-во генетиків і селекціонерів ім. М.І.Вавилова

/К.: Логос, 2008.-

Т.5

У збірнику представлено наукові праці вітчизняних та зарубіжних спеціалістів, написані спеціально для даного видання, присвяченого 90-річчю від часу заснування Української академії наук. В оглядових і експериментальних статтях наведено дані з основних напрямів генетико - біотехнологічного розширення генетичної мінливості живих організмів, генетики господарсько - цінних ознак рослин і тварин, сучасних методів біотехнології і генетичної інженерії при створенні нового покоління сортів і гібридів культурних рослин, ДНК-технологій і молекулярних маркерів у селекції рослин і тварин, генетики людини та медичної генетики; результати аналізу та оцінки генетичних ресурсів, висвітлено актуальні питання викладання генетики, селекції та біотехнології.

Для спеціалістів у галузі генетики, селекції, біотехнології, екології, а також викладачів і студентів вищих навчальних закладів III-IV рівнів акредитації.

АНАЛІЗ І ОЦІНКА ГЕНЕТИЧНИХ РЕСУРСІВ

АДАМОВСКАЯ В.Г., МОЛОДЧЕНКОВА О.О., САГАЙДАК Т.В., ВОЛЧЕВСКАЯ А.В. ТИХОНОВА О.В.

*Селекционно-генетический институт - Национальный центр семеноведения и сортоизучения УААН,
Украина, 65036, Одесса, Овидиопольская дорога 3, e-mail: adam@paco.net*

НЕКОТОРЫЕ БИОХИМИЧЕСКИЕ КОМПОНЕНТЫ ФОРМИРОВАНИЯ ПРИОБРЕТЕННОГО ИММУНИТЕТА В ОТВЕТЕ ЗЛАКОВЫХ КУЛЬТУР ПРИ ГРИБНЫХ БОЛЕЗНЯХ

Обострившаяся в последние годы проблема отсутствия у зерновых культур устойчивости к фузариозу, выдвигает необходимость углубленного изучения механизмов приобретенного иммунитета растений. Связано это с несколькими причинами. Во-первых, несмотря на достижения селекции, очень часто устойчивость сортов оказывается недолговечной. Во-вторых, при химической защите в грибных популяциях накапливаются толерантные к системным фунгицидам штаммы. В третьих, изучение механизмов фитоиммунитета показало, что существует общая интегрированная система защиты растений от биотических и абиотических факторов. Поэтому препараты, с механизмом действия, отличным от пестицидов, стимулирующие защитные механизмы растений и их устойчивость, привлекают все большее внимание ученых и практиков.

Известно, что защитные реакции растений, направленные против патогенов различной природы, для своего эффективного функционирования и запуска должны располагать определенными системами узнавания. К сожалению, фитопатология располагает крайне небольшим запасом достоверных экспериментальных данных о молекулярных механизмах подобного узнавания. В целом, механизм и метаболизм защитных реакций растений изучен явно недостаточно. Физиолого-биохимические аспекты иммунизации растений заслуживают особого внимания. Поиск биохимических факторов, ответственных за запуск и усиление защитных реакций с помощью тех или иных биохимических адаптивных реакций, лежащих в основе формирования устойчивости растений, позволит выявить природные биостимуляторы, обладающие высоким иммуностимулирующим эффектом к стрессовым факторам [1]. Считается, что одной из наиболее ранних реакций растений на действие стрессовых факторов является активация целого ряда ферментативных систем (белкового, углеводного, липидного и фенольного метаболизма), а также лектинов, входящих в различного рода клеточные структуры. Наряду с функциями узнавания патогенов лектины, согласно современным представлениям, могут выполнять также и прямые защитные функции с помощью агглютинации клеток патогена. Практически у всех изученных растений обнаружены ингибиторы протеиназ, которые образуют одну из наиболее общих защитных систем, направленных против действия биотических и абиотических факторов среды. Существуют убедительные доказательства того, что в пораженных патогенными микроорганизмами растительных клетках отмечается усиление синтеза фенольных соединений, в метаболизме которых принимает участие фенилаланинаммиаклиаза (ФАЛ) – ключевой фермент фенольного метаболизма. Многие авторы отмечают более высокую концентрацию приведенных выше биологически активных веществ в тканях устойчивых к патогенам растений, либо увеличение их концентрации после начала инфекционного процесса [2,3,4]. В исследованиях, проведенных в нашей лаборатории, показано, что при введении лектина сои в суспензию патогена происходит угнетение развития колоний грибов рода *Fusarium graminearum* и *Fusarium culmorum*, в то же время наблюдается положительное влияние на ростовые процессы растений. Высказано предположение об активации неспецифических защитных реакций растений под действием лектина сои [5]. Эта статья является логическим продолжением наших

предыдущих исследований с целью подтвердить или опровергнуть это предположение на биохимическом уровне. Исходя из этого в задачу исследования входило изучение влияния экзогенного лектина, введенного в среду прорастания растений, на активность ингибитора трипсина (ИТ), ФАЛ и эндогенных лектинов, участвующих в формировании неспецифических защитных реакций растений.

Объектом исследования служили надземная часть проростков и корни 4 суточных проростков озимой пшеницы и ярового ячменя с разным уровнем устойчивости к фузариозу на разных фонах проращивания (вода, патогенные штаммы *F.graminearum* и *F.culmorum*, лектин, выделенный из семян сои (50 и 100 мкг/мл), смесь лектин+патоген).

Лектин из семян сои выделяли по методу Ригаса и Осгуди [6]. Активность ФАЛ определяли по методу Цукера [7] в нашей модификации. Активность ИТ определяли с помощью синтетического субстрата БАПНА (N-а-бензоил-L-аргинин-4-нитроанилид). Активность лектинов (ЛА) определяли по реакции гемагглютинации трипсинизированных эритроцитов крови белых крыс по методу Луцка [8].

Учитывая исключительное своеобразие физиологических функций, в том числе защитных, выполняемых эндогенными лектинами в клетках растений [9], нами была предпринята попытка использовать экзогенный лектин сои как возможный природный биостимулятор защитных реакций в ответ на действие фузариозной инфекции у генотипов злаковых культур с разным уровнем устойчивости к данному заболеванию. Прежде всего мы исследовали влияние разных концентраций лектина сои на активность ФАЛ, ИТ и эндогенных лектинов в тканях проростков у изучаемых генотипов злаковых культур.

Введение в среду прорастания экзогенного лектина оказывало заметное и неоднозначное влияние на активность ИТ, ФАЛ и ЛА в тканях проростков у изучаемых генотипов злаковых культур. Установлено, что различия по изменению активности этих биологически активных веществ, участвующих в формировании защитных реакций при стрессовых воздействиях, у генотипов злаковых культур с разным уровнем устойчивости к фузариозу при введении в среду прорастания экзогенного лектина, зависило от его концентрации, рода культуры и органа, в котором определялась активность.

В нашу задачу также входило выяснить стимулирует или индуцирует лектин сои изменение активности изучаемых биохимических факторов при действии патогена.

При совместном действии патогена и лектина сои в тканях проростков у изучаемых злаковых культур, также регистрировалось изменение активности ИТ, ФАЛ и эндогенных лектинов. Как показали наши исследования, в этом варианте эксперимента, уровень индукции этих биологически активных веществ, прежде всего, определялся родоспецифичностью изучаемых генотипов. Так, у устойчивых генотипов озимой пшеницы в тканях корней активность ИТ, ФАЛ и эндогенных лектинов возрастала по сравнению контрольным вариантом в интервале от 300% (ФАЛ) до 350% (ИТ). У устойчивых генотипов ярового ячменя активность изучаемых биохимических факторов при действии патогена и лектина находилась на уровне контроля (ИТ, ЛА) или незначительно ниже (ФАЛ – 96,4%). У восприимчивых генотипов озимой пшеницы уровень активности ИТ и эндогенных лектинов в проростках находится на уровне значительно ниже, чем у устойчивых генотипов (113 и 91,8% соответственно), а активность ФАЛ составляла 150% относительно контроля. В то время как у восприимчивых генотипов ярового ячменя характер изменения активности этих показателей имел противоположную направленность (ИТ -120 %, ЛА -131,2%, ФАЛ – 56,7% относительно контроля).

Неодинаковая направленность изменений активности ИТ, ФАЛ и эндогенных лектинов в присутствии лектина сои и патогена в тканях корней у генотипов разных родов злаковых культур, различающихся по устойчивости к фузариозу, указывает, во

первых, на неодинаковый вклад этих веществ в формирование ответных реакций растений, а во вторых, о существовании сложной системы взаимодействия и взаимовлияния между этими биохимическими показателями в цепи событий, приводящих к формированию защитных реакций, в регуляции которых они играют важную роль. Практическим выходом из этих исследований после детализации полученных данных может быть возможность использования эндогенного лектина сои для стимуляции защитных механизмов растения и повышения устойчивости злаковых культур к фузариозной инфекции.

Литература

1. *Тарчевский И.А., Чернов В.М.* Молекулярные аспекты фитоиммунитета// Микология и фитопатология. – 2000. – Т. 34, вып.3. – С. 3-10.
2. *Запрометов М.Н.* Фенольные соединения –М.: Наука,1993. - 272 с.
3. *Адамовская В.Г., Ключковская Е.А., Молодченкова О.О., Вовчук С.В.* Изменение протеиназно-ингибиторной системы озимой пшеницы под действием салициловой кислоты и *Fusarium*// Физиология растений. – 2000. – Т. 47, № 2. – С. 210-215.
4. *Адамовская В.Г., Литвиненко Н.А., Молодченкова О.О., Цисельская Л.Й., Бирюков С.В.* Лектины клеточных стенок озимой пшеницы при поражении *Fusarium spp.* и действии салициловой кислоты// Сб. научных трудов СГИ. – 2003. – Вып.4/44. – С.27-31.
5. *Молодченкова О.О., Адамовская В.Г., Цисельская Л.Й., Захарова О.А., Тихонов П.С., Тихонова О.В.* Вплив лектину на розвиток грибів роду *Fusarium* на ростові процеси злакових культур при зараженні фузаріозом// Матеріали науково-практичної конференції “Актуальні проблеми імунітету із захисту сільськогосподарських культур від болезней і шкідників. – 2007. – Одеса. – С. 39.
6. *Луцук Л.В.* Методи дослідження углеквонної специфічності лектинів (метод. указання). – Львов.: Вища школа, 1983. -156 с.
7. *Rigas N., Osgood E.* Purification and properties of the PHAL of *Phaseolus vulgaris*// Biol.chem. – 1955. – V. 212. - № 2. – P. 607-615.
8. *Zucker M.* Induction of phenylalanineammonia-lyase in Xantin leaf disk Photosintetic requirement and effect of day-legth// Plant Physiol. - 1969. - № 44. – P. 91-112.
9. *Марков Е.Ю., Хавкин Э.Е.* Лектины растений:предполагаемые функции// Физиология растений. – Т. 30. – Вып. 5. – С.852-868.

Резюме

Неодинаковый характер изменения активности ингибитора трипсина, фенилаланинаммиаклиазы и лекинов растений в зависимости от фона проращивания у генотипов различных родов злаковых культур с разным уровнем устойчивости, можно рассматривать как биохимическую адаптивную реакцию на действием сигнальных компонентов экзогенного лектина и патогена.

Неоднаковий характер зміни активності інгібітора трипсину, фенілаланінаміакліази та лектинів рослин в залежності від фону пророщування у генотипів різних родів злакових культур з неоднаковим рівнем стійкості, можна розглядати як біохімічну адаптивну реакцію на дію сигнальних компонентів екзогенного лектина та патогена.

Different character of change of activity of trypsin inhibitor, phenylalanineammonialyase and lectins of plants depending on the background of germination at the genotypes of different genus of cereal crops with the different level of resistance, it is possible to examine as a biochemical adaptive reaction on by the action of alarm components of ekzogenous lectin and pathogen.

АЛЕКСЕЙЧЕНКО Н. А.

*Национальный аграрный университет НАН Украины
Украина, 03041, ул. Героев обороны, 19, e-mail: noolex@bigmir.net*

ПОЛИМОРФИЗМ ГРУШИ ЛОХОЛИСТНОЙ В РАЗЛИЧНЫХ ЧАСТЯХ ЕСТЕСТВЕННОГО АРЕАЛА

Важнейшим элементом экологической оптимизации ландшафтов, их биологическом обогащении, является сохранение и восстановление естественной растительности. С этой точки зрения дубравы из дуба пушистого в Молдове, произрастающие в заповедном участке «Гырбовецкий лес», представляют для науки большой интерес. Особое внимание при этом заслуживают различные виды древесных и кустарниковых пород, такие как груша лохолистная, скумпия кожевенная, боярышник однопестичный и др.

В Молдове груша лохолистная внесена в Красную книгу и охраняется как редкий вид с 1962 года. В условиях этой страны популяция груши лохолистной малочисленна и ограничена территориально. Область естественного ареала груши лохолистной невелика и ограничена странами, прилегающими к Черному морю, встречается в Малой Азии и в Северо-Восточной части Балканского полуострова (Добруджа). Массовое распространение ее отмечено в Горном Крыму, где она также стоит в списке нуждающихся в охране растений.

По данным многим авторов груша лохолистная обладает большим полиморфизмом, причем наиболее изменчивы по форме и величине листья (Косых, 1973; Андреев, 1964; Николаева, 1987; Петрова, 1987). Среди особей груши лохолистной крымской популяции по форме листовой пластинки В. М. Косых выделено три группы: с ланцетными и широколанцетными листьями, с эллиптическими листьями, с обратно-яйцевидными листьями.

Целью наших исследований было изучение внутривидовой изменчивости груши лохолистной молдавской популяции по форме и величине листьев и плодов, крымской популяции по форме и величине плодов, проведение сравнительной характеристики двух популяций по этим признакам.

Материалы и методы

Про изучении формового разнообразия груши лохолистной исследовали такие биометрические показатели: размеры плодов и листьев (длину и ширину), длину плодоножек и черешков, а также индексы (отношение длины к ширине). Вариационные ряды состояли из случайных выборок (100-200 образцов), взятых с разных частей крон модельных деревьев, которые отбирались в условиях Горного Крыма в разных частях ареала. В Молдове при определении форм исследовались все деревья.

Результаты и обсуждение

Для определения формового разнообразия груши лохолистной молдавской популяции нами был проведен биометрический анализ листьев со всех деревьев груши, произрастающих в Молдове (Бендерский опытный лесхоз, Гырбовецкое л-во), который показал, что в этой популяции присутствуют две формы: с эллиптическими и обратнояйцевидными листьями.

Оценивая абсолютные значения средних данных (длины и ширины листовой пластинки) следует подчеркнуть, что в пределах выделяемых нами двух форм существенной разницы по длине не установлено. При этом необходимо отметить, что значение средней длины листовой пластинки обеих форм колеблется в пределах от 49,6 до 52,1 мм, при варьировании этого признака в пределах 14,3 - 16,2% (табл.1).

Оценивая абсолютные значения средних данных (длины и ширины листовой пластинки) следует подчеркнуть, что в пределах выделяемых нами двух форм существенной разницы по длине не установлено. При этом необходимо отметить, что

значение средней длины листовой пластинки обеих форм колеблется в пределах от 49,6 до 52,1 мм, при варьировании этого признака в пределах 14,3 - 16,2%.

Таблица 1

Характеристика листьев груши лохолистной молдавской популяции

Форма	Признак, мм	Статистические показатели				Индекс
		M ± m	σ	V, %	P, %	
С эллиптическими листьями	Листовая пластинка					1,6
	Длина	50,3±0,63	7,10	14,3	1,3	
	Ширина	29,3±0,42	4,84	16,5	1,5	
	Черешок					
	Длина	23,9±0,86	9,80	41,5	3,7	
С обратнойцевидными листьями	Листовая пластинка					1,7
	Длина	51,3±0,73	8,32	16,2	1,4	
	Ширина	32,4±0,43	4,90	15,1	1,3	
	Черешок					
	Длина	25,2±0,86	9,83	39,1	3,4	

Наиболее изменчивыми по своим размерам у обеих выделенных форм оказались черешки – коэффициент вариации колеблется в пределах 39-42%. Длина черешков бывает разной даже в пределах одного побега – от коротких у нижних листьев до длинных у верхних. На цветущих побегах также прослеживается изменчивость по этому признаку, встречаются листья с черешками длиной от 3-4 мм до 50-60 мм.

Сопоставляя формы груши, выделенные нами в условиях Гырбовецкого леса, с формами выделенными в Крыму, следует отметить, что в целом первые характеризуются более крупными листьями на более длинных черешках (табл.2).

Таблица 2

Сравнительная характеристика форм груши лохолистной по величине листовой пластинки

	Амплитуда изменчивости листовой пластинки, мм	
	Государственный заповедный участок «Гырбовецкий лес» (Молдова)	Крым (Косых, 1967)
Форма с эллиптическими листьями		
Листовая пластинка		
• Длина, мм	23-76	16-85
• Ширина, мм	17-50	9-32
Черешок		
• Длина, мм	4-60	1-48
Форма с обратнойцевидными листьями		
Листовая пластинка		
• Длина, мм	32-80	22-65
• Ширина, мм	7-49	11-31
Черешок		
• Длина, мм	3-54	2-28

Так, средние значения длины и ширины листовой пластинки у форм груши лохолистной молдавской популяции в 1,3-1,6 раза больше, чем у крымских форм, а крайние границы этих признаков в 1,2 – 1,9 раза превышают те же границы у форм, выделенных в Крыму. Длина черешков в отмеченных нами формах, как по средним величинам, так и по крайним пределам этого признака намного (в 1,3 – 4,0 раза) превышает эти параметры у форм, выделенных в Крыму.

Плоды груши лохолистной, как было отмечено выше, также очень разнообразны по форме и по размерам. Так Ю.Л. Меницкий (1986) и Л.П. Николаева (1963) указывают на произрастание в Молдове и в Крыму деревьев с плодами от грушевидной до сплюснуто-округлой формы.

По данным наших исследований в Крыму в местах массового произрастания груши лохолистной (Алуштинский лесхоззаг, Солнечногорское л-во; Куйбышевский лесхоззаг, Соколинское л-во; Севастопольский лесхоззаг, Орлиновское и Чернореченское л-ва; Белогорский лесхоззаг, Подгорненское и Новокленовское л-ва) наибольшее распространение имеет форма со сплюснутыми с полюсов плодами. Установлено, что эта форма наиболее изменчивая по размерам плодов, средний вес ее плода колеблется от 3,3 до 12,2 г, максимальный вес равен 20,0 г, минимальный – 1,0 г. В пределах этой формы, на основании биометрического анализа плодов, нами выделено три группы, различающиеся по величине плодов (табл.3)

Таблица 3

Характеристика плодов груши лохолистной

Форма	Признак	Статистические показатели				Индексы	X _{max} мм	X _{min} мм
		M ± m	σ	V, %	P, %			
Крупноплодная	Плоды							
	Длина, мм	24,0±0,02	0,17	7,3	0,7	0,84	28	21
	Ширина, мм	28,6±0,02	0,24	8,5	0,9		32	25
	Вес, г	12,2±0,31	3,1	25,6	2,6		20	6
	Плодоножки							
Длина, мм	16,8±0,03	0,31	20,0	2,0	-	23	13	
Среднеплодная	Плоды							
	Длина, мм	20,3±0,02	0,19	10,7	1,1	0,85	26	18
	Ширина, мм	24,0±0,02	0,20	8,3	0,8		29	26
	Вес, г	7,4±0,18	1,83	25,0	2,5		12	5
	Плодоножки							
Длина, мм	14,0±0,03	0,31	21,5	2,2	-	22	9	
Мелкоплодная	Плоды							
	Длина, мм	15,1±0,01	0,15	9,7	1,0	0,86	19	12
	Ширина, мм	17,5±0,02	0,16	9,4	0,9		21	14
	Вес, г	3,3±0,10	1,01	30,2	3,0		6	1
	Плодоножки							
Длина, мм	16,4±	0,44	26,2	2,6	-	27	8	

Сопоставляя данные, приведенные в таблице, следует отметить, что размеры всех трех групп варьируют в различных интервалах. При высокой точности исследований (p=0,7-1,0%) длина и ширина плода варьирует в достаточно небольших интервалах (V=7,3 – 10,7%). Наиболее варибельными оказались длина плодоножки и вес плодов, где коэффициент вариации колеблется в пределах 20,0 – 30,2%. Индексы у форм (отношение длины плода к его ширине) практически одинаковы, что говорит об одинаковой форме плода всех трех форм: крупноплодной, средне- и мелкоплодной.

В условиях Гырбовецкого леса (Молдова) среди 16 произрастающих экземпляров груши лохолистной выделяются деревья с тремя формами плодов - (кв. 27, в. 2), округлой - (кв. 17, в. 13) и сплюснутой – наиболее часто встречаемой - (кв. 6, 25, 31, 33, 35). Плоды в основном средних размеров, очень сочные, кисло-сладковатого вкуса с резким специфическим грушевым ароматом.

Выводы

На основании изучения внутривидовой изменчивости груши лохолистной в разных частях естественного ареала (в Горном Крыму и Молдове) впервые в условиях Молдовы выделены две формы этого вида по морфологическим признакам листьев (с эллиптическими и обратнойцевидными листьями) и дана их сравнительная характеристика с формами, произрастающими в Крыму. Изучая изменчивость груши лохолистной в горных лесах Крыма по морфологическим признакам плодов, выявлено,

что наибольшее распространение имеют деревья с плодами сплюснуто-округлой формы и значительной вариабельностью размеров.

Литература

1. Андреев В. Н. Деревья и кустарники Молдавии. – Кишинев. – 1964. – 276с.
2. Косых В. М. Дикорастущие плодовые породы Крыма. – Симферополь.- .1967. – 171с.
3. Меницкий Ю. Л. Род *Pyrus L.*// Флора СССР. – Ленинград.- -Т.9. – с.346-347.
4. Николаева Л. П. Дубравы из дуба пушистого Молдавской ССР. – Кишинев. - .1963.– 168 с.
1. Петрова В. П. Дикорастущие плоды иягоды. – Москва .- 1987.-.248 с.

Резюме

В статье приводятся результаты изучения внутривидовой изменчивости груши лохолистной (*Pyrus elaeagrifolia* Pall.) в разных частях естественного ареала (в условиях Горного Крыма и Молдовы). Приведена сравнительная характеристика полиморфизма молдавской и крымской популяций этого вида по морфологическим признакам листьев и плодов.

В статті надаються результати вивчення внутрішньовидової мінливості груші лохолистої (*Pyrus elaeagrifolia* Pall.) в різних частинах природного ареалу (в умовах Горного Криму та Молдови). Приведена порівняльна характеристика поліморфізму молдавської та кримської популяцій цього виду за морфологічними ознаками листя та плодів.

In the article the results of study of intraspecific changeability of pear of loholistoi (*Pyrus elaeagrifolia* Pall.) in different parts of natural habitat given. The conducted comparative description of polymorphism of this type of moldavian and crimean by the po(*Pyrus elaeagrifolia* Pall.) poulusiy signs of listya and garden-stuffs.

АНТОНОВА С.П., КІРКОВСЬКА О.П., КОРНЄЄВА М.О., ФАЛАТЮК Л.В.

Інститут цукрових буряків УААН

Україна, 03141, Київ, вул.Клінічна,25, E-mail:isb@isb kiev.ua

КОМБІНАЦІЙНА ЗДАТНІСТЬ СЕЛЕКЦІЙНИХ МАТЕРІАЛІВ ЦУКРОВИХ БУРЯКІВА ЗА ТЕХНОЛОГІЧНИМИ ЯКОСТЯМИ

Технологічні якості цукрових буряків як селекційна ознака за своєю суттю є полігенною, хоча на її формування переважний вплив здійснюють "зовнішні" фактори. За даними М. Бурби [1], вплив довкілля і агротехнічних факторів (густота насаджень, мінеральне живлення, рік і місце вирощування) оцінюється на 84 %, генотип впливає лише на 16 %. На перший погляд, це невисокий показник. Але якщо зважити на те, що змінюються ті фактори, на які можна впливати, а дані для порівняння генотипів за інших рівних умов встановити не викликає труднощів [2], то генотипові особливості ЧС гібридів і їх компонентів можуть слугувати об'єктом покращання технологічних якостей і визначатися як селекційна мета.

Одним із шляхів генетично обумовленого покращання технологічних якостей є селекційні методи. Вони спрямовані на зниження вмісту шкідливих компонентів: лужних іонів K^+ , Na^+ , L-амінного азоту, амінокислот тощо, які, підвищуючи розчинність сахарози у меласі та зв'язуючи цукор, негативно позначаються на переробці і безпосередньо впливають на вихід білого цукру у виробництві. Для цих компонентів характерна генетично обумовлена вариабельність, тому можна очікувати,

що інтенсивними доборами серед не тільки цукристих, а і врожайних форм, можна досягти покращання технологічних якостей.

Матеріали та методи

У польовому досліді брали участь дві групи запилювачів, схрещені з двома ЧС тестерами зарубіжного і вітчизняного походження (KWS MOS і м.к. ІВП ЧС 84). І групу відносно гомозиготних запилювачів з коефіцієнтом інбридинга 0,50 - 0,93 склали лінії I₁ - I₄, виділені з популяцій В 1002 і ЛР 14759. Другу групу запилювачів, більш гетерозиготних по відношенню до І групи, склали синтетики врожайного і цукристого напрямів добору, сформовані на основі рекурентної селекції компонента-запилювача гібриду Іванівський ЧС 33 і продуктів одно- і дворазового доборів популяції ВП 0102. Комбінаційну здатність за вмістом шкідливих іонів K⁺ і Na⁺ вивчали на основі топкросних ЧС гібридів, розраховану за методом В.К. Савченка [3].

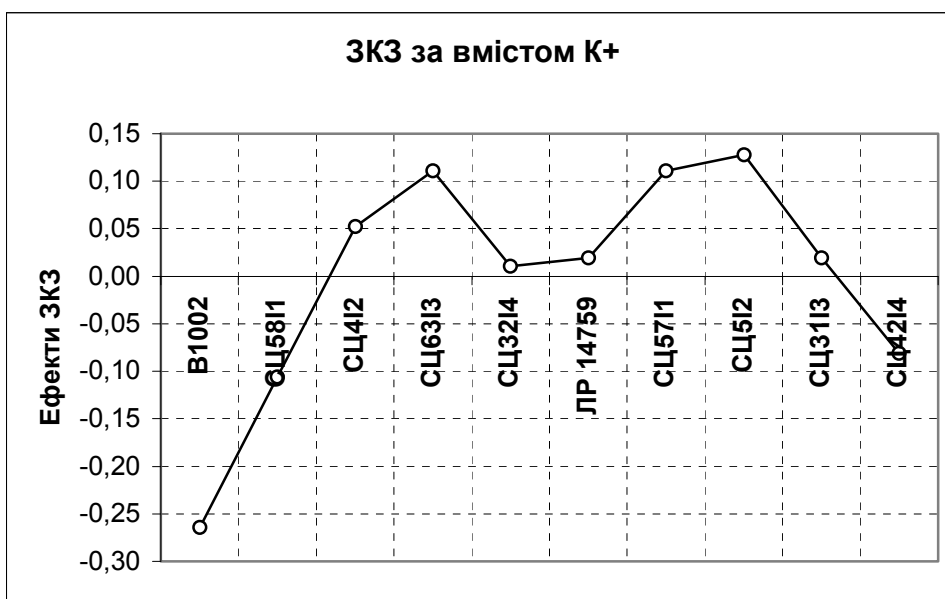
Результати та обговорення

Вивчення структури генотипової мінливості ознаки "вміст іонів K⁺", що ґрунтувалося на основі аналізу варіанс комбінаційної здатності, показало, що як в першій, так і в другій групі запилювачів ЗКЗ-дисперсії батьківської форми були переважаючими і склали 82 і 52 %). За ознакою "вміст Na⁺" такий показник був майже однаковий (84 і 83 %).

Ефекти ЗКЗ запилювачів, очікувані на основі F - тесту, за обома ознаками у двох групах запилювачів наведено на рис. 1 і 2.

Найкращими за вмістом K⁺ виявилися матеріали, які характеризувалися від'ємними значеннями ефектів ЗКЗ (рис. 3). Це - популяція В 1002 ($\hat{g}_j = -0,26$) і лінія першого покоління інбридинга з цієї популяції, подальший інбридинг яких призвів до розпаду добросприятливих щодо цієї ознаки генів. Серед групи більш гетерозиготних запилювачів перевагу мали синтетики I і II циклів рекурентного добору і продукти одно- і дворазових індивідуальних доборів врожайного напрямку. Це свідчить про те, що позитивна кореляція між врожайністю і вмістом компонентів, які впливають на якість, в результаті відповідних суворих доборів, які проводилися з цими запилювачами впродовж тривалого часу, може бути не абсолютно, тобто селекційно привабливі лінії можна знаходити не тільки серед цукристих, але і урожайних матеріалів, хоча і з меншою ймовірністю. Серед ліній львівської генплазми виділилася лінія СЦ 42 четвертого інбредного покоління.

а)



б)

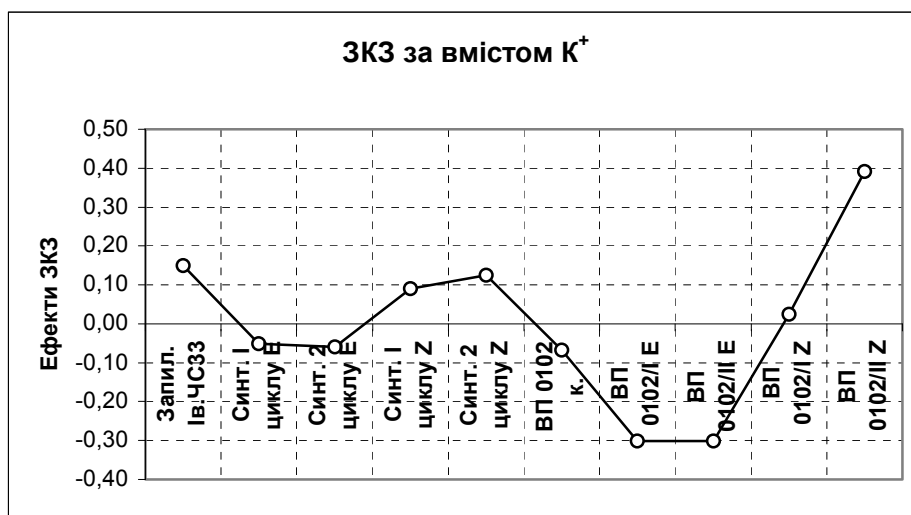
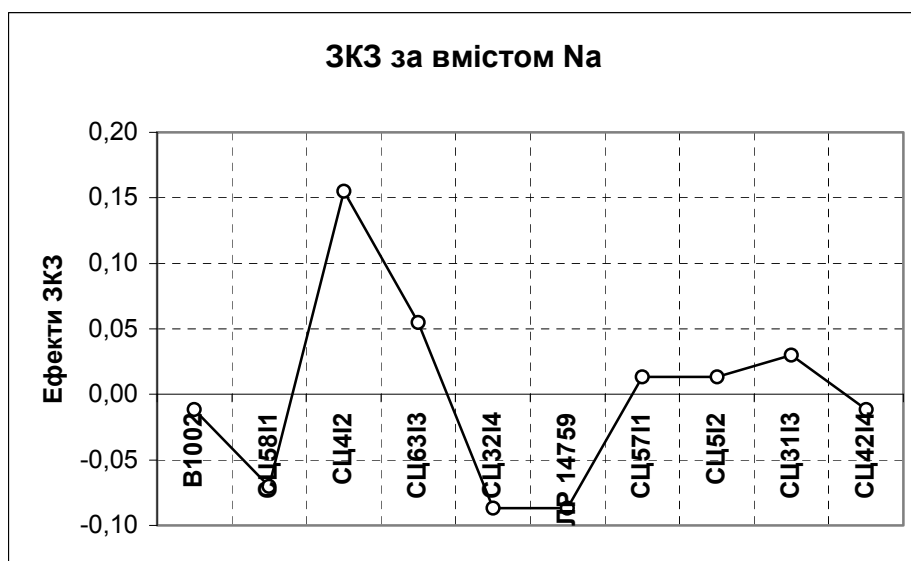


Рис.1. Ефекти ЗКЗ за вмістом іонів K⁺ у I наборі гомозиготних (а) і гетерозиготних (б) запилювачів

Низька комбінаційна здатність, що слугує критерієм добору за вмістом іонів Na⁺, була характерна для двох запилювачів (СЦ 58 I₁ і СЦ 32 I₄) верхняцької і двох запилювачів (ЛР 14759 і СЦ 42 I₄) львівської генплазми з першого набору. У групі більш гетерозиготних запилювачів синтетик II циклу цукристого напрямку добору характеризувався найнижчим значенням ЗКЗ ($\hat{g}_j = -0,14$), близьким за оцінкою вмісту Na⁺ до нього був номер ВП 0102/Е, який піддавався дворазовому добору за врожайністю. СКЗ- ефекти, хоча були і менш значущими, все ж впливали на кінцеве значення ознаки, особливо це було характерне для вмісту іонів Na⁺ у лінійних матеріалів. Відносно високі специфічні ефекти показала лінія СЦ 58 I₁ та СЦ 31 I₃ (з ЧС тестером 1 німецького походження KWS MOS) і лінії СЦ 63 I₃ і СЦ 42 I₄ (з ЧС тестером 2 м.к. ІВП ЧС 84 вітчизняного походження).

а)



б)

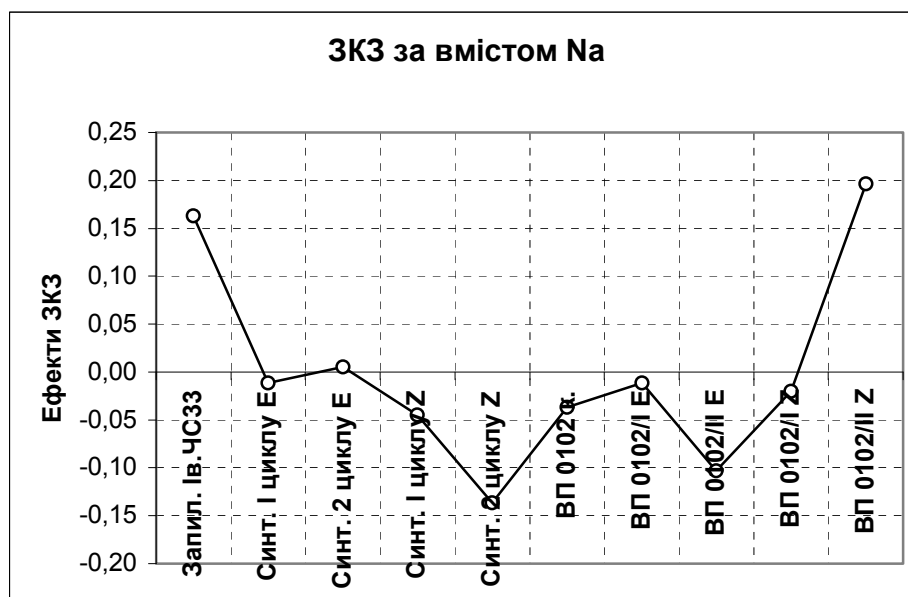


Рис. 2. Ефекти ЗКЗ за вмістом іонів Na^+ у І наборі гомозиготних (а) і гетерозиготних (б) запилювачів

Доброю специфічною взаємодією за ознакою "вміст іонів K^+ " з зарубіжним ЧС тестером 1 відзначився номер ВП 0102/І Z і синтетик II циклу (E). Ефект СКЗ (S_{ij}) для них склав - 0,32 і - 0,15 відповідно. Синтетик I циклу (E) добре взаємодіяв і з вітчизняним тестером 2 ($S_{ij} = -0,17$).

Відносну цінність топкросних ЧС гібридів за вмістом іонів K^+ і Na^+ визначали порівнянням в обох наборах з груповим стандартом (табл. 1, 2).

Таблиця 1

Вміст іонів K^+ і Na^+ у топкросних ЧС гібридів I набору, % до стандарту

№ п/п	Гібридна комбінація		Вміст іонів	
	ЧС тестер	Запилювач	K^+	Na^+
1	ЧС тестер 1	В 1002	93,9*	104,2
2	- " -	СЦ 58 I ₁	98,9	92,3*
3	- " -	СЦ 4 I ₂	106,3	105,7
4	- " -	СЦ 63 I ₃	101,6	97,3
5	- " -	СЦ 32 I ₄	105,9	103,2
6	- " -	ЛР 14759	100,8	104,2
7	- " -	СЦ 57 I ₁	100,1	92,3*
8	- " -	СЦ 5 I ₂	101,9	105,7
9	- " -	СЦ 31 I ₃	101,6	97,3
10	- " -	СЦ 42 I ₄	96,9	103,2
11	ЧС тестер 2	В 1002	98,5	96,3
12	- " -	СЦ 58 I ₁	99,3	104,7
13	- " -	СЦ 4 I ₂	102,0	98,8
14	- " -	СЦ 63 I ₃	102,7	98,8
15	- " -	СЦ 32 I ₄	103,2	98,8
16	- " -	ЛР 14759	98,5	96,3
17	- " -	СЦ 57 I ₁	100,4	104,7
18	- " -	СЦ 5 I ₂	98,9	98,8
19	- " -	СЦ 31 I ₃	97,3	98,8
20	- " -	СЦ 42 I ₄	97,0	98,8
	НІР ₀₅		4,7	4,0

* - істотно нижчі показники порівняно з груповим стандартом

Таблиця 2

Вміст іонів K^+ і Na^+ у топкросних ЧС гібридів II набору, % до стандарту

№ п/п	Гібридна комбінація		Вміст іонів	
	ЧС тестер	Запилювач	K^+	Na^+
1	ЧС тестер 1	Запилювач ІвЧС 33	104,1	104,9
2	- " -	Синт. I циклу E	100,7	100,2
3	- " -	Синт. II циклу E	100,3	101,2
4	- " -	Синт. I циклу Z	101,8	96,0*
5	- " -	Синт. II циклу Z	91,4*	97,4
6	- " -	ВП 0102 к	105,9	102,1
7	- " -	ВП 0102/I E	106,7	101,6
8	- " -	ВП 0102/II E	98,8	103,5
9	- " -	ВП 0102/I Z	99,6	93,6*
10	- " -	ВП 01102/II Z	95,3*	95,5*
11	ЧС тестер 2	Запилювач ІвЧС 33	98,8	102,6
12	- " -	Синт. I циклу E	93,2	97,4
13	- " -	Синт. II циклу E	100,0	94,5*
14	- " -	Синт. I циклу Z	91,4*	100,2
15	- " -	Синт. II циклу Z	91,4*	95,0*
16	- " -	ВП 0102 к	107,8	107,3
17	- " -	ВП 0102/I E	104,8	102,6
18	- " -	ВП 0102/II E	105,2	103,5
19	- " -	ВП 0102/I Z	105,2	101,6
20	- " -	ВП 0102/II Z	97,0	99,3
	НІР ₀₅		4,7	4,0

* - істотно нижчі показники порівняно з груповим стандартом

Аналізуючи дані таблиці 1 і 2, можна стверджувати, що істотно нижчими від групового стандарту показниками вмісту іонів K^+ з ЧС тестером 1 характеризувалися п'ять гібридних комбінацій з обох наборів, що складає 12,5 %. За вмістом іонів Na^+ кращими виявилися сім або 17,5 %, від всіх гібридів, що вивчали за даними показниками.

Висновки

Кращими гібридними комбінаціями, у яких відмічено істотно понижений вміст двох типів шкідливих іонів одночасно, є гібриди, утворені ЧС тестером 2 і запилювачами цукристого напрямку синт. II циклу Z і ВП 0102/II Z, що були піддані достатній селекційній проробці: у першому випадку - дворазовому індивідуально-родинному, у другому - рекурентному на два цикли - доборам.

Із 12 гібридів, що виділилися за низьким вмістом іонів K^+ або Na^+ , у дев'яти відмічено істотно доведену низьку ЗКЗ батьківської форми. Це свідчить про те, що ці ознаки у гібриді в основному детермінуються ефектами генів, успадкованими від запилювачів. Переважна більшість кращих гібридів (75 %) створено за участю запилювачів, які пройшли попередню селекційну проробку за цукристістю. Кращою материнською формою для формування ЧС гібридів з покращеними технологічними якостями є пилкостерильний ЧС компонент німецького походження.

Література

1. *Burba M.* Die N-Assimilation der pflanze unter besonderer Berücksichtigung der Zuckrrube (Beta vulgaris L.). I. J. R. B. - Symposium, Brussel, 1983, 27-52 sowie Zuckerind 108.- s. 114-116.
2. *В. Ольтманн, М. Бурба, Г. Больц.* Селекция сахарной свеклы на улучшение качественных признаков.- М.: Агропромиздат, 1986, - 175 с.

3. Савченко В.К. Генетический анализ в сетевых пробных скрещиваниях.- Мн:Наука и техника, 1984.-223 с.

Резюме

На основі топкросних схрещувань на тлі двох пилкостерильних тестерів вивчена комбінаційна здатність за вмістом іонів K^+ і Na^+ 20 запилювачів різного ступеня інбредності. Виділено дві гібридні комбінації, у яких істотно доведений низький вміст одночасно двох типів іонів K^+ і Na^+ .

На основе топкроссных скрещиваний на фоне двух пыльцестерильных тестеров изучена комбинационная способность по содержанию ионов K^+ и Na^+ 20 опылителей различной степени инбредности. Выделено две гибридные комбинации, у которых доказано существенно низкое содержание одновременно двух типов ионов K^+ и Na^+ .

On the basis cyclic crosses, on the background of two pollen sterile testers, the combining ability for the content of K^+ and Na^+ ions of 20 pollinators with different levels of hibreding was studied. Two hybrid combinations were found in which essentially proved.

БАЗАЛІЙ В.В., БАЗАЛІЙ Г.Г., ЛАРЧЕНКО О.В.

*Херсонський державний аграрний університет Мінагрополітики України
Україна, 73006, Херсон, вул.. Рози Люксембург, 23, e-mail: office @ ksau, Kherson. ua*

ЕКОЛОГІЧНА ПЛАСТИЧНІСТЬ І СТАБІЛЬНІСТЬ УРОЖАЙНОСТІ СОРТІВ ПШЕНИЦІ З РІЗНИМ ТИПОМ РОЗВИТКУ

Головною цілю при вирощуванні будь-якої сільськогосподарської культури є збільшення урожайності, підвищення якості продукції, ріст її конкурентної здатності у виробництві. Управління цими процесами ведеться в двох напрямках [1]. По-перше, за рахунок інтенсифікації технологій вирощування, що є ефективним, але і більш затратним для підвищення урожайності і якості зерна. По-друге, створення сортів, які володіють високим потенціалом продуктивності і адаптивності. Проблема адаптивності сортів озимої пшениці, їх здатності забезпечувати високу і стійку продуктивність в різних умовах довкілля завжди було на першому плані.

Відомо, що успіх „зеленої революції” пов’язаний зі створенням високопродуктивних сортів озимої пшениці з слабковираженою фотоперіодичною чутливістю і короткою стадією яровізації. В південному Степу України це біологічне явище сприяє активному весняному відростанню рослин при скороченому дні, що своєю чергою забезпечує добре використання вологи і інтенсивне формування біологічного урожаю [2]. Деякі сорти озимої пшениці, які характеризуються цими ознаками в окремі роки при відповідних умовах зовнішнього середовища ведуть себе як „умовні дворучки”, це дає можливість їх з успіхом використовувати при пізніх строках сівби де „типово” озимі сорти пшениці значно знижують свою потенційну продуктивність

Використання позитивного ефекту цієї взаємодії у виробничих умовах, шляхом приведення наявного сортового складу пшениці до конкретних агротехнічних умов і створення та впровадження у виробництво сортів дворучок пшениці, безумовно буде слугувати підвищенню конкурентної здатності культури озимої пшениці.

Цілю нашої роботи було провести порівняльну оцінку сортів пшениці з різним типом розвитку за рівнем пластичності, стабільності та екологічної стійкості і конкретизувати деякі критерії адаптивної системи селекційного процесу

Матеріали і методи

Вихідним матеріалом для аналізу були сім сортів пшениці з різним типом розвитку: сорт озимої пшениці Одеська 267, „умовні” дворучки і дворучки – Pesma, NS 446, NS 471, Nevesinjka, Соломія і яра пшениця – Харківська 30. Вони вивчались при зрошенні за різних строків сівби восени: 10.09, 20.09, 30.09, 10.10, 20.10, 30.10; лютневі „вікна” – 15.02, 25.02; весною – 10.03, 20.03, 30.03, 10.04. Загальна площа ділянки 2,5 м², облікова – 1 м². Повторність п’яти кратна. Така кількість агроваріантів створює умови достатньо точного ранжирування показників екологічної пластичності і стабільності урожайності сортів пшениці. Ці параметри визначались за методикою Еберхарта і Рассела [3], суттєвість якої заключається в регресивному аналізі залежності урожайності сортів від індексу середовища. Коефіцієнт регресії (b_i) використовується для оцінки екологічної пластичності сорту, для визначення екологічної стабільності (S_{di}) використовували середнє квадратичне відхилення від лінії регресії.

Екологічну стійкість сортів ($Y_2 - Y_1$), де Y_1 – максимальна урожайність, Y_2 – мінімальна урожайність, середню урожайність ($(Y_1 + Y_2)/2$) в контрастних умовах зовнішнього середовища визначали за рівняннями Россілі і Хембліна {4}.

Результати та обговорення

Вивчення сортів пшениці протягом календарного року при різних строках сівби і контрастних умов довкілля, які перевищують за розмахом мінливості урожайності у виробничих умовах, дозволяє підвищити надійність розроблених в дослідженнях рекомендацій.

В таблиці 1 приведені статистичні параметри, які характеризують адаптивний потенціал сортів пшениці за урожайністю.

Таблиця 1.

Параметри пластичності, стабільності і екологічної стійкості за урожайністю сортів пшениці різного типу розвитку

Сорт	Статистичні параметри				
	$Y_2 - Y_1$ г/м ²	$(Y_1 + Y_2)/2$ г/м ²	V, %	b_i	S^2_{di}
Оптимальні строки сівби (10.09, 20.09, 30.09)					
Одеська 267	-80	680	18,8	1,098	40,4
Pesma	-90	520	20,5	1,114	48,2
Соломія	-110	575	24,8	1,108	56,4
Nevesinjka	-120	520	25,0	1,050	58,2
NS 471	-150	485	29,0	1,614	64,1
NS 446	-135	473	26,0	1,214	60,8
Пізнi строки сівби (10.10, 20.10, 30.,10)					
Одеська 267	-260	450	36,0	1,614	70,6
Pesma	-250	435	32,0	1,940	72,4
Соломія	-70	615	18,4	0,990	36,1
Nevesinjka	-170	485	29,5	1,114	58,4
NS 471	-40	540	12,4	0,740	28,2
NS 446	-120	460	23,1	1,120	60,1
Строки сівби в лютневі „вікна” (20.02,30.02)					
Одеська 267	не виколосилась				
Pesma	-40	240	14,1	1,514	28,6
Соломія	-30	565	12,8	0,980	20,8
Nevesinjka	-70	425	16,7	0,990	24,4
NS 471	--40	430	16,0	1,090	19,1
NS 446	-15	435	10,8	1,098	10,1
Харківська 30	-200	220	36,4	1,960	78,4
Строки сівби весною (10.03, 20.03, 30.03, 10.04)					
Pesma*	-45	238	-	-	-
Соломія	-130	430	24,8	0,914	58,1

Nevesinjka	-130	330	29,4	1,216	64,2
NS 471	-175	367	34,5	1,066	72,1
N 446	-129	335	24,1	1,205	64,5
Харківська 30	-150	315	132,1	1,314	71,6

Примітка: * дані за два строки сівби (10.03,20.,03), а за строками сівби (30.03 і 10.04) рослини сорту Pesma не викалошились

Різниця $Y_2 - Y_1$ має від'ємний знак і визначає рівень стійкості сортів до стресових умов вирощування. Чим менше розрив між максимальною і мінімальною урожайністю, тим вище адаптивність сорту. В межах оптимальних строків сівби (10.09, 20.09, 30.09) озимий сорт Одеська 267 і сорт „умовної” дворучки Pesma мали вищу стійкість до мінливих умов зовнішнього середовища порівняно з іншими сортами. Сівба в пізні строки і лютневі „вікна” виявила значну перевагу сортів дворучок до умов довкілля. Аналогічне підвищення стійкості до несприятливих умов у цих сортів спостерігалось при сівбі весною порівняно з ярою пшеницею Харківська 30. Створений нами новий сорт дворучки Соломія мав показники коефіцієнта регресії (b_i) за цих умов менше одиниці, особливо у 2007 році ($b_i = 0,641$). Цей показник був абсолютним мінімумом серед інших сортів, що було слідством пошкодження добре розвинутих, дещо перерослих рослин березневими морозами. Тому сорт Соломія рекомендується для вирощування при ранній весняній сівбі, або в пізні строки восени, за можливістю в лютневі „вікна”

Показник $(Y_1 + Y_2)/2$ показує середню урожайність сорту в мінливих умовах довкілля і характеризує генетичну гнучкість сорту, його компенсаційну здатність. Чим вища ступінь відповідності між генотипом сорту і різними чинниками середовища, тим вище цей показник. В наших дослідженнях за оптимальних умов вирощування безумовно цей показник був найвищим у типово озимого сорту Одеська 267, але пізні строки сівби виявили значну перевагу над ним сортів-дворучок (NS 446, NS 471), особливо нового сорту Соломія (перевага на 165 г/м^2) (табл..1). Показники екологічної стабільності (S_{di}^2) мали значну залежність від строків сівби і погодних умов року. Найбільш високу стабільність прояву урожайності за пізніх строків сівби восени і ранньовесняних мали сорти Соломія, NS 471, NS 446.

Перевага сортів дворучок в пізні строки сівби восени над типово озимими сортами і умовних дворучок за урожайністю, в основному, спостерігалось у сприятливі за погодними умовами роки, а в несприятливі – знижувалась, а в деяких випадках повністю невеліровалась, що приводило до збільшення розриву між максимальною і мінімальною урожайністю.

У ряду випадків збільшення пластичності сортів-дворучок приводило до зменшення їх пристосованості до умов довкілля і стабільності прояву урожайності. Тому не слід збільшувати фенотипову пластичність, так як це підвищує реакцію сорту не лише до сприятливих умов, але і до несприятливих. Причина такої залежності вірогідно знаходиться в генетичній детермінації норми реакції, фенотиповий прояв якої залежить від дії чинників довкілля і їх напруги.

Відомо, що за типом розвитку пшениці поділяються на озимі, дворучки і ярі. Вивчення закономірностей успадкування типу розвитку у пшениці на основі гібридизації дозволяє створити необхідні сполучення ознак у рослин, той або інший тип розвитку і спрямовано одержувати нові форми пшениць. В наших дослідженнях в F_1 при прямому і зворотньому схрещуваннях озимого сорту Одеська 267 з сортом дворучкою Nevesinjke рослини розвивались за типом ярих або дворучок, їх колосіння відставало у порівнянні з ярими посівами на 8-9 днів. В наступних поколіннях ($F_2 - F_4$) спостерігалось досить характерне розщеплення гібридів за типом розвитку (табл..2).

Таблиця 2.

Характер розщеплення гібридів на форми різного типу розвитку

Покоління	Всього форм	У тому числі					
		озимих		дворучок		ярих	
	кількість	кількість	%	кількість	%	кількість	%
Одеська 267 x Nevesinjke (сівба восени)							
F ₂	54	8	14,8	22	40,7	24	44,5
F ₃	98	14	14,3	51	52,0	33	33,7
F ₄	128	15	11,7	68	53,1	45	35,2
Nevesinjke x Одеська 267 (сівба восени)							
F ₂	25	-	-	10	40,0	15	60,0
F ₃	48	-	-	18	37,5	30	62,5
F ₄	69	-	-	28	40,6	41	59,4
Одеська 267 x Nevesinjke (сівба весною)							
F ₂	24	6	25,0	8	33,3	10	41,7
F ₃	51	9	17,6	18	35,3	24	47,1
F ₄	78	18	23,1	24	30,8	36	46,1
Nevesinjke x Одеська 267 (сівба весною)							
F ₂	28	2	7,1	12	42,9	14	50,0
F ₃	44	2	4,5	18	40,9	24	54,6
F ₄	62	4	6,5	22	35,5	36	58,0

Дослідження показали, що гібридизація типово озимого сорту і дворучки в прямих і зворотніх схрещуваннях при сівбі восени і весною значно вплинуло на формування гібридних форм з різним типом розвитку.

При прямому схрещуванні, де в якості материнської форми використовувався озимий сорт пшениці Одеська 267 при сівбі як восени, так і весною спостерігалось формування значно більшої кількості форм ярого типу і дворучок. Так, ярих форм і дворучок при сівбі восени, залежно від поколінь, коливалось відповідно у межах 40,7-53,1% і 33,7-44,5%, а озимих форм – 11,7-14,8%. При весняній сівбі озимих форм вищеплялось дещо більше (17,6-25,0%), можливо за рахунок „умовних” дворучок, які при відповідних умовах не формували колос, що потребує допоміжних досліджень з цього питання. Пріоритет і при сівбі весною також залишався за ярими біотипами (30,8-35,3%) та дворучками (41,7-47,1%).

При зворотньому схрещуванні форм озимого типу в різних поколіннях за сівбою восени не виявлено, дворучок було дещо менше (37,5-40,6%), ніж ярих форм (59,4-62,5%). Сівба весною гібридів F₂ – F₄ від зворотнього схрещування виявило не значну кількість озимих форм (4,5 – 7,1%), а ярі біотиби і дворучки практично були на такому рівні, як при сівбі їх восени (табл.2).

Таким чином, дослідження виявили, що гібридизація типово озимої пшениці з дворучкою при реципрокному схрещуванні дозволяє не лише створювати нові біотиби пшениці з різним типом розвитку, але і регулювати процеси їх створення. При прямому схрещуванні (озима пшениця x дворучка) формуються дворучки, ярі і озимі біотиби, а при зворотньому схрещуванні серед гібридних форм пшениці формуються лише дворучки, ярі форми і практично повністю відсутні типово озимі біотиби.

Література

1. Кудряшов И.Н., Беспалова Л.А., Пучков Ю.М. и др. Экологическая пластичность и стабильность новых сортов-потомков Безостой 1 по урожайности // В сб. межд. конференции Безостая 1 – 50 лет триумфа. – Краснодар, 2005. – С.169-177
2. Мусіч В.М., Пильнев В.М., Нефедов А.В., Рабинович С.В. Фотоперіодична чутливість та адаптивність різних сортів озимої пшениці на Півдні України// Реалізація потенційних можливостей різних сортів та гібридів Селекційно-генетичного інституту в умовах України. –Одеса, 1996.-С. 76-83.

3. *Eberhart S.A., Russell W.A.* Stability parameters for comparing varieties// Crop Sci.-1966 V.6.-№1.-P.36-40.
4. *Rossielle A.A., Hamblin J.* Theoretical aspects of selection for yield in stress and non-stress environments// Crop Sci.-1981.-21/-№6.

Резюме

Впровадження адаптивних систем використання сортів-дворучок пшениці за пізніх строків сівби восени і в „лютневі вікна” в південному Степу України, засновано на використанні позитивних генотип-середовищних ефектів, що дозволяє підвищити перевагу нового типу сортів за цих умов і зробити виробництво зерна пшениці більш ефективним та конкурентоздатним.

Внедрение адаптивных систем использования сортов - дворучек пшеницы при поздних сроках посева и в „ февральские окна” в южной Степи Украины, основанное на использовании положительных генотип-средовых эффектов, что позволяет увеличить преимущество нового типа сортов при этих условиях и сделать производство зерна пшеницы более эффективным и конкурентоспособным.

Introduction of adaptive systems of use grades of wheat winter-summer type, at late terms of crops and in „February windows” in southern Steppe of Ukraine, founded on use positive a genotype - the environment of effects that allows to increase advantage new type of grades under these conditions and to make manufacture of grain wheat more effective and competitive.

ВАКУЛЕНКО П.І.¹, КОРНЄЄВА М.О.²

¹*Верхняцька дослідно-селекційна станція*

Україна, 20022, Черкаська область, Христиніський район, с.Верхнячка

²*Інститут цукрових буряків УААН*

Україна, 03141, Київ, вул.Клінічна,25, E-mail:isb@isb kiev.ua

ХАРАКТЕРИСТИКА КРАЩИХ МАТЕРИНСЬКИХ КОМПОНЕНТІВ ЦУКРОВИХ БУРЯКІВ ЗА КОМПЛЕКСОМ ГОСПОДАРСЬКО-ЦІННИХ ОЗНАК

Успішне створення і добір материнських форм в селекційному процесі великою мірою залежить від генетичного різноманіття вихідних матеріалів, від їх селекційної цінності, від методів оцінки їх за комбінаційною здатністю і базовою продуктивністю [1].

Серед 50 одержаних на Верхняцькій дослідно-селекційній станції у 2003-2005 рр. експериментальних пробних гібридів цукрових буряків за врожайністю істотно перевищували груповий стандарт 14 гібридів, із них 10 гібридів були створені за участю материнських компонентів, одержаних на основі простих стерильних гібридів (табл.1). За цукристістю найкращі оцінки мали 28 пробних гібридів, із них у 23 материнськими компонентами були прості стерильні гібриди (табл.1), у інших – пилкостерильні лінії – аналоги вихідних О типів. Відповідно 19 пробних гібридів, в склад материнського компоненту яких входили прості стерильні гібриди, перевищували груповий стандарт за збором цукру.

Таблиця 1

Частота кращих модельних гібридів, одержаних на основі простих стерильних гібридів 2003-2005 рр.

Показник продуктивності	Кількість гібридів, що перевищували гр.St		З них на основі простих гібридів	
	шт.	%	шт.	%
Врожайність	14	28	10	71
вміст цукру	28	56	23	82
Збір цукру	28	56	19	68

Формування простих стерильних гібридів від схрещування ЧС аналогів з неспорідненими закріплювачами стерильності, які використовують як материнську форму гетерозисних гібридів на основі ЦЧС, дозволяє зняти інбредну депресію, що незмінно супроводжує створення ліній - ЧС аналогів у процесі тривалого насичуючого бекросування [2]. Внаслідок цього підвищується продуктивність гібридів на чоловічостерильній основі.

Продуктивність кращих пробних ЧС гібридів, створених за участю простих стерильних гібридів наведено в таблиці .2.

З урахуванням показників комплексу господарсько-корисних ознак прості стерильні гібриди ЧС₁х От₂ та ЧС₅х От₃ передано в 2005 році для подальшого вивчення до системи випробування „Бетаінтеркрос”, а прості гібриди ЧС₃ Бц одн.45хОт₂УЛ56 і ЧС₅ В8524 х От₂УЛ56 передано для вивчення до Національного центру генетичних ресурсів рослин України.

Таблиця 2

Продуктивність кращих пробних гібридів, середнє 2003-2005 рр.

№ п/п	Походження ЧС-гібридів	Врожайність, т/га	Вміст цукру, %	Збір цукру, т/га	% до стандарту		
					Врожайність, %	Вміст цукру %	Збір цукру %
1	(ЧС ₁ ВП29хОт ₄ В635/73)хБЗ ₁	43,5	14,67	6,5	111	105	116
2	(ЧС ₃ Бц одн.45хОт ₂ УЛ56)хБЗ ₁	42,7	14,76	6,3	105	106	111
3	(ЧС ₅ В8524хОт ₃ Бц одн.45)хБЗ ₁	42,0	14,79	6,9	115	105	120
4	(ЧС ₁ ВП29 х От ₂ УЛ56) х БЗ ₂	42,0	15,06	7,0	113	107	121
5	(ЧС ₂ УЛ56 х От ₅ В8524) х БЗ ₂	41,4	14,71	6,5	108	105	113
6	(ЧС ₃ Бц одн.45хОт ₅ В8524)хБЗ ₂	40,0	14,92	6,7	110	106	117
7	(ЧС ₄ В635/73 х От ₅ В8524)х БЗ ₂	40,2	15,09	6,5	105	107	113
8	(ЧС ₅ В8524 х От ₂ УЛ56)х БЗ ₂	42,0	14,74	6,6	109	105	115

Як видно із табл.2, кращою гібридною комбінацією виявилися гібриди (ЧС₁ВП29 х От₂УЛ56) х БЗ₂ та (ЧС₅В8524хОт₃Бц одн.45)хБЗ₁ , що перевищили груповий стандарт відповідно на 21 та 20 %. Перший із них – гібрид, що сформований від схрещування материнського компонента у формі простого гібриду пилкостерильної лінії веселоподільського походження з неспорідненим О типом уладівської генплазми, і багатонасінного запилювача (гілка 2) верхняцької селекції. Другий гібрид материнською формою мав також простий стерильний гібрид на основі ЧС аналога В8524 і закріплювача стерильності білоцерківського походження, що був схрещений з багатонасінним компонентом-запилювачем (гілка 1) верхняцької генплазми. Вони були передані до екологічного сортовипробування Бетаінтеркрос у 2006р.

Загальна характеристика цих гібридів за комплексом господарсько-цінних ознак наведена у таблиці .3.

Характеристика кращих простих стерильних гібридів, переданих до системи випробування „Бетаінтеркрос” та до Національного центру генетичних ресурсів рослин України

Ознаки	Прості стерильні гібриди			
	ЧС ₁ х От ₂	ЧС ₅ х От ₃	ЧС ₃ х От ₂	ЧС ₅ х От ₂
Базова продуктивність в % до груп. St:				
–врожайність	99	102	95	101
–цукристість	103	103	102	104,5
–збір цукру	102	105	98	106,5
Загальна комбінаційна здатність, ефекти за:				
–врожайністю	+1,15	+1,22	-0,08	+0,71
–цукристістю	+0,12	+0,19	+0,19	+0,06
–збором цукру	+0,25	+0,26	+0,01	+0,11
Стерильність, %	90	91	95	92
Однонасінність, %	98	98	98	99
Енергія проростання насіння, %	45	56	55	72
Схожість, %	80	75	77	90
Маса 1000 насінин, г	14,5	12,7	13,2	12,4

За оцінками загальної комбінаційної здатності в селекційні програми Верхняцької ДСС також включено 6 простих стерильних гібридів ЧС₁ВП29 х От₄В635/73; ЧС₃Бц одн.45 х От₂УЛ56; ЧС₅В8524 х От₂УЛ56; ЧС₃Бц одн.45 х От₅В8524; ЧС₃Бц одн.45 х От₅В8524; ЧС₂УЛ56 х От₅В8524 для подальшого покращення інших господарсько-корисних ознак.

Література

1. *Роїк М.В., Корнєєва М.О.* Оцінка генетичного потенціалу вітчизняних цукрових буряків // Збірник наукових праць, вип.8. Київ: ПоліграфКонсалтинг.- 2005.-С.11-27.
2. *Роїк М.В., Вакуленко П.І., Корнєєва М.О.* Комбінаційна здатність материнського компоненту гібридів цукрових буряків за збором цукру. // Зб. наук. праць "Фактори експериментальної еволюції організмів. К.: Логос, - 2006.- С.289-293.

Резюме

На основі аналізу 50 експериментальних гібридів, одержаних і вивчених на Верхняцькій дослідно-селекційній станції упродовж 2003-2005 рр., встановлено, що частота гетерозисних гібридів на основі ЦЧС вища у тому випадку, коли за материнську форму беруть прості стерильні гібриди, отримані гібридизацією пилкостерильних ліній з неспорідненими закріплювачами стерильності. Кращі гібриди перевищують груповий стандарт на 13...21 % .

На основе анализа 50 экспериментальных гибридов, полученных и изученных на Верхнячской опытно-селекционной станции в течение 2003-2005 гг. , установлено, что частота гетерозисных гибридов на основе ЦМС выше в том случае, если материнской формой служат простые стерильные гибриды, полученные гибридизацией пыльцестерильных линий с неродственными закрепителями стерильности. Лучшие гибриды превышают групповой стандарт на 13...21 % .

On the basis of analysis of 50 experimental hybrids, developed at the Verkhnyachka Experiment-Breeding Station in 2003-2005, it was established that the frequency of heterotic

CMS hybrids was higher when as a female component simple sterile hybrids obtained through hybridization of pollen sterile lines with unrelated maintainers were used. The best hybrids were superior to the group standard by 13...21 %.

ВЛАСЕНКО В.А., КОЧМАРСЬКИЙ В.С., КОЛОМІЄЦЬ Л.А., МАРИНКА С.М.

Миронівський інститут пшениці імені В.М.Ремесла УААН

Україна, 08853, Київська обл., Миронівський р-н, с.Центральне; e-mail: mwheats@ukr.net

ПІДВИЩЕННЯ ПРОДУКТИВНОГО І АДАПТИВНОГО ПОТЕНЦІАЛІВ ПШЕНИЦІ М'ЯКОЇ ОЗИМОЇ

Одним із найважливіших завдань аграрної політики України є суттєве збільшення і стабілізація виробництва зерна. Найвагоміший приріст урожаю сільськогосподарських культур у цілому, і пшениці зокрема, досягається шляхом впровадження у виробництво нових сортів [1, 2]. Наукою і передовою практикою доведено, що новий сорт упродовж перших 5-ти років використання дає приріст урожаю у 2,5 рази більший, ніж сорти, які перебувають у виробництві 10-12 років [3]. Збільшення врожайності пшениці озимої за рахунок нових сортів визначає і нові етапи сортозмін.

Матеріали та методи

Матеріалом для досліджень слугували статистичні дані врожайності сортів пшениці озимої селекції Миронівського інституту пшениці імені В.М. Ремесла УААН (МІП) та створених спільно з Інститутом фізіології рослин і генетики НАН України (ІФРiГ), які вирощувалися в насінницьких посівах Державного підприємства дослідного господарства „Еліта” МІП (ДП ДГ „Еліта”).

Результати та обговорення

Стан виробництва озимої пшениці в Україні характеризується значними коливаннями врожайності по роках, причиною яких є стресові чинники довкілля [4]. Найвища врожайність її (40,2 ц/га) зафіксована в 1990 р., що забезпечила максимальний валовий збір зерна цієї культури (30,3 млн т) за всю історію України [5]. Після 1990 р. валове виробництво зерна різко скоротилося, зокрема, в останні 4 роки до 17,7-12,9 млн т. У 2007 р. валовий збір склав 12,9 млн т, що в 2,3 рази менше, ніж у 1990 р. [6].

Проте щорічні недобори зерна пшениці в Україні недоречно відносити тільки на рахунок дії негативних екологічних чинників. Сорти пшениці м'якої озимої, що допущені до виробництва, в практиці не завжди реалізують свої потенційні можливості із-за пониженого їх рівня адаптивних властивостей. Тобто ступінь гомеостазу генотипу (на рівні організації організму) ще потребує подальшого селекційного поліпшення. Проте необхідно враховувати також наступні рівні організації рослинних адаптивних макросистем – популяційний і екосистемний (біоценологічний).

Рівень урожайності сортименту пшениці озимої в Україні в порівнянні з такими в Угорщині (20 ц/га та 50 ц/га, відповідно) понижений. Проте це не тому, що сорти української селекції мають нижчий генетичний потенціал продуктивності, а також загальної адаптивності. Причини в тому, що кожний сорт при зміні екологічного градієнта чи стресового чинника володіє тільки для нього властивими компенсаторними ефектами. Саме компенсаторні ефекти у окремих генотипів забезпечують пружність і сталість її біоценологічного гомеостазу.

Колівання в біоценозі, що створюється за рахунок абіотичних та агротехнічних чинників, вносять адекватні зміни в напрямках і характері проходження етапів продукційного процесу. При цьому в межах реакції генотипів, різних за довжиною міжфазних періодів, відбуваються певні зміни при формуванні врожайності зерна. Здатність сорту компенсувати нанесену рослинам шкоду під дією лімітуючих чинників довкілля на ранніх етапах вегетації шляхом збільшення значень елементів структури

врожаю, які формуються на пізніших фазах розвитку, є важливою їх характеристикою. Отже більша кількість різних генотипів охоплюють ширше коло адаптивних реакцій на стресори і цим нівелюють недоліки окремих сортів у протистоянні лімітуючим чинникам інтенсивності продукційного процесу. Кількісною характеристикою протидії комплексу екологічних загроз у даному випадку може слугувати показник площі посіву, яка припадає на один сорт. В Україні цей показник у 2000 р. був у 10 разів вищим, ніж в Угорщині. Отож і уразливість виробничих посівів в Україні була вищою. У підсумку біоценотичний гомеостаз складають нижчі структурні ступені адаптивних систем – на рівні розвитку організму, представленого окремим біотипом, і популяції, яку наповнюють усі біотики однорідного морфотипу. Кожний новий сорт має переваги над своїми попередніми за адаптивним і продуктивним потенціалами.

Роль сорту у збільшенні виробництва зерна нами вже показана на прикладі сортозміни МПП [7,8]. Так, з приходом сорту Українка 0246 в окружній місцевості, де його створено, середня врожайність озимої пшениці збільшилася з 12 до 20 ц/га [9], що суттєво збільшило валові збори зерна.

У ДП ДГ „Еліта” урожайність цього сорту за 1947 -1967рр. мали дещо вищу, ніж 20-40 років тому, що є результатом виконання в господарстві кращих агротехнічних прийомів вирощування. Сам же сорт Українка 0246 є представником першої сортозміни серед сортів, які створені в МПП.

Зміна системи землеробства та застосування нових технологій вирощування вимагали впровадження нових сортів пшениці озимої. Такими стали перші сорти В.М.Ремесла – спочатку Миронівська 264, яку невдовзі витіснила Миронівська 808. Вони сформували II сортозміну, що забезпечила до першої приріст 9,4 ц/га урожайності зерна. Основу III сортозміни склали сорти Миронівська ювілейна, Іллічівка та Миронівська 25. Їхнє впровадження в насінницьких посівах ДПДГ „Еліта” в 1968-1987рр. забезпечило приріст урожайності 7,8 ц/га до II сівозміни та 17,2 ц/га – до першої [8]. Запровадження інтенсивної технології вирощування озимої пшениці затребувало низькорослих сортів. Нову (четверту) сортозміну започаткував сорт Миронівська 61, насій пшенично-житньої транслокації (ПЖТ), 1BL/1RS. Ця сортозміна забезпечила зростання врожайності на 11,7 ц/га.

Сортозміни представляють різні покоління сортів (I-IV), в основі яких генетичні відмінності. Кожне наступне покоління сортів має вищий генетичний потенціал над попереднім, що реалізується через кращу адаптивність її елементів у загальній урожайності на рівні 7,3-9,1 ц/га (табл.).

Таблиця.

Врожайність сортів пшениці озимої в станційному випробуванні залежно від поколінь селекції (МПП, середнє за 1985-1993рр.).

Покоління – сорти	Урожайність, ц/га		
	сортів	+ до покоління	
		I	попереднього
I – Українка	38,7	–	–
II – Миронівська 264, Миронівська 808	46,3	7,6	7,6
III – Миронівська ювілейна, Миронівська 25, Іллічівка	53,6	14,9	7,3
IV – Миронівська 61, Миронівська 27, Миронівська 28, Мирлебен, Миронівська остиста,	62,7	24,0	9,1
$F_{\text{факт.}} = 2,99; F_{\text{табл.}} = 2,90; P = 0,05$			

Четверте покоління сортів, порівняно до першого має прибавку врожайності 24,0 ц/га, або це складає 62%, що є показником селекційного зрушення через поліпшення генетичного потенціалу. За рахунок поліпшення генетичного потенціалу шляхом

введення в геноплазму сортів нових коадаптивних блоків генів відбувалося щорічне зростання врожайності з середнім показником 0,58 ц/га.

Введення в геноплазму ПЖТ IAL/IRS започатковано у МПП зі створенням сорту Експромт [10]. На його основі виведені нові сорти Колумбія, Смуглянка, Веснянка, Золотоколоса та інші, основними характерними ознаками яких є висока продуктивність та стійкість до хвороб. Переваги сорту Експромт над Миронівською 61 по рівню продуктивності достовірно високі [8]. Оскільки Миронівська 61 представляє четверте покоління сортів, то можна вважати, що Експромт та його похідні – Колумбія, Смуглянка, Веснянка і Золотоколоса започаткували наступне, тобто п'яте покоління. Створення ряду сортів із IAL/IRS траслокацією свідчить про формування нових коадаптивних асоціацій генів з участю житнього матеріалу, що забезпечує високий продуктивний та адаптивний потенціали нових сортів.

Еволюційно-аналоговий принцип у селекції формує агрофітоценоз, зорієнтований на збільшення числа генетично різноманітних сортів і створення з їх участю такої агроекологічної спеціалізованої системи, яка значно збільшує і розширює адаптивний потенціал культури [11]. Для підвищення адаптивного потенціалу культури пшениці озимої в протистояння різким відхиленням гідротермічних умов від норми необхідно формувати урізноманітнений набір сортів за довжиною вегетаційного періоду, реакцією до абіотичних чинників, різними генетичними чинниками стійкості до фітопатогенів тощо [12]. Для стабілізації урожайності зерна з хорошою його якістю необхідно культивувати стійкі до осипання та проростання зерна при перестой зрілих хлібів групи сортів з різними міжфазними періодами та загальною довжиною вегетації.

Довжина вегетаційного періоду та його міжфазні етапи відіграють суттєву регуляційну функцію в формуванні елементів зернової продуктивності. Тому створення сортів пшениці озимої з різною довжиною періоду яровизації, датами колосіння і дозрівання забезпечить підвищення адаптивного потенціалу культури в цілому за рахунок саморегуляції рослин на стресори впродовж онтогенезу. Дані наших досліджень [12] урожайності сортів різних груп стиглості за ряд років підтверджують не істотну (на рівні $HP_{05} = 7,24$ ц/га) різницю між ними. Кожній групі сортів властива своя реакція на зміну лімітуючих факторів довкілля. В окремі роки вони або проявляють суттєві переваги за врожайністю, або можуть поступитися (помінятися рангами), що свідчить про їхню належність до однієї спільної сортозміни. Так, переваги сортів певної групи стиглості помітно в 1990 р., коли кращими за врожайністю є ранньостиглі, 1992 р. – пізньостиглі, 1996р. – середньостиглі, 2002р. – ранньо- та середньостиглі.

Урожайність пшениці озимої 100-120 ц/га є цілком реальною [14]. Так, за даними Державного сорто випробування України рекордні урожаї сформували такі сорти: Золотоколоса – 117,3 ц/га, Смуглянка – 115,2 ц/га, Ремеслівна – 110,5ц/га, Володарка – 106,3 ц/га. Вони, а також Мирхад, входять до групи сортів високоінтенсивного типу, які найбільш придатні для вирощування по кращих попередниках, при високому забезпеченні добривами та з доброю природньою родючістю ґрунтів. Сорти універсального типу за інтенсивністю мають більш широкі можливості для вирощування по різних попередниках за звичайною чи інтенсивною технологією. До цієї групи належать Богдана, Веснянка, Добірна, Переяславка, Подолянка, Крижинка, Фаворитка, Деметра. Вони формують стабільну врожайність та добру і високу якість зерна.

Як вже відзначалось, фактор нового сорту забезпечує щорічне зростання врожайності в середньому 0,58 ц/га за рахунок введення нових коадаптивних блоків генів. У той же час сорти, що продовжують знаходитись у виробництві понад 5 років, постійно накопичують шкідливі мутації та негативні модифікації, наприклад під тиском радіонуклідного забруднення. В результаті цього процесу поступово знижується потенціал продуктивності, а інколи й адаптивності в частині протистояння,

в першу чергу, абіотичним стресорам. Тому варто підкреслити необхідність проведення постійних сортозамін через 5-7 років використання сорту у виробництві. В зв'язку з цим первинне насінництво необхідно проводити тільки оригінаторам сортів, власне – самим селекціонерам.

На 2008 рік до Реєстру сортів рослин України внесено нові сорти пшениці озимої м'якої, створені сумісно МПП та ІФРiГ. Сорт Колос Миронівщини створений методом гібридизації Донецька 39 / Еритроспермум 26561. Сорт Калинова створений методом індивідуальних доборів колосу в F₄M₄ та в потомстві F₅M₅ індивідуальним добром елітної рослини з популяції, отриманої схрещуванням Київська 7 / Альбатрос одеський, гібридне насіння якої оброблене мутагеном ДАБ-0,1%. Нові сорти вдало поєднують ряд адаптивних властивостей і ознак, серед яких: високий рівень продуктивності, зимо-, морозо- і посухостійкість та толерантність до фітопатогенів.

Висновки

Підвищення і розширення адаптивного потенціалу сортів пшениці м'якої озимої в протистоянні дії абіотичних і біотичних чинників забезпечуються еволюційно-аналоговим принципом селекції, який формує агрофітоценоз генетично урізноманітненого набору сортів за довжиною вегетаційного періоду, різними генетичними чинниками стійкості до фітопатогенів та нетипових відхилень гідротермічних умов. Формування нових коадаптивних асоціацій генів з участю пшенично-житніх транслокацій 1BL/IRS та 1AL/IRS забезпечує високий потенціал продуктивності нових сортів озимої пшениці, а також підвищену стійкість до біотичних стресорів. Впровадження нових сортів дозволяє щорічно мати приріст 0,58 ц/га урожайності зерна, тому сортозаміну необхідно проводити через 5-7 років.

Література

1. *Литвиненко М.А.* За доброго господарювання пшениця в нас виросте не гірша, ніж в Канаді // *Зерно і хліб.* – 2005. – №4. – С. 39-41.
2. *Ситник В.П.* Наукове забезпечення виробництва конкурентноспроможного зерна в Україні // *Зб. наук. праць ІЗ УААН.* – К., 2004. – С.5-9.
3. *Чайка В.Г., Маматов М.О.* Організаційне та наукове забезпечення поліпшення стану насінництва в Україні // *Зб. наук. праць СГІ.* – 2005. – Вип. 5(45). – С. 225-231.
4. *Лузан Ю.* Состояние и перспективы аграрного страхования // *Агро Вісник України.* – 2007. – №6 (18). – С.15-18.
5. *Адаменко Т.* Зміна агрокліматичних умов та їх вплив на зернове господарство // *Агроном.* – 2006. – №3. – С. 12-15.
6. *Статистичний бюлетень.* – К., 2007.– 20с.
7. *Животков Л.А., Власенко В.А., Борсук Г.Е.* Селекционный прогресс на примере смены поколений мироновских сортов озимой пшеницы // *Tezela conferinte jubiliare consacrate celor 50 ani de activitate a ICCS.* – Balti, 1994. – P. 6-7.
8. *Сортозміна та селекційний прогрес* продуктивності рослин пшениці м'якої озимої на прикладі сортів Миронівського інституту пшениці / *Власенко В.А., Молоцький М.Я., Кочмарський В.С. і ін.* // *Вісник Білоцерківського держ. аграрн. ін-ту.* – Біла Церква, 2006. – Вип. 37. – С.16-30.
9. *Кузьменко П.* Озимі хліба та способи підвищення їх врожайності // *Видання Миронівської дослідної станції.* – Черкаси: Раддумка, 1929.– 33с.
10. *Власенко В.А.* Підбір компонентів схрещувань у пшениці // *Адаптивна селекція. Теорія і практика: Сб. тез. междунар. конф.;* Харків, ІР ім. В.Я. Юрьєва, 11-14 листопада 2002. – Харків, 2002. – С. 14-15.
11. *Романенко А.А., Беспалова Л.А., Кудряшов И.Н., Аблова И.Б.* Новая сортовая политика и сортовая агротехника озимой пшеницы. – Краснодар, 2005. – 224 с.
12. *Власенко В.А., Коломієць Л.А., Басанець Г.С., Маринка С.М.* Характер впливу гідротермічного режиму на продукційний процес пшениці озимої та шляхи

- підвищення адаптивного потенціалу // Селекція і насінництво. – Харків, 2006. – С.198-207.
13. Улич Л.І. Вдосконалення дослідження сортів озимої пшениці // Сортовивчення та охорона прав на сорти рослин. – К.:Алефа, 2006. – № . –С.83-90.

Резюме

Підвищення адаптивного потенціалу пшениці озимої забезпечується еволюційно-аналоговим принципом селекції та формуванням нових коадаптивних асоціацій генів з участю пшенично-житніх траслокацій 1BL/IRS та 1AL/IRS. Сортозміну необхідно проводити через 5-7 років. Первинне насінництво ведеться оригінаторами сортів (селекціонерами).

Повышение адаптивного потенциала пшеницы озимой обеспечивается эволюционно-аналоговым принципом селекции и формированием новых коадаптивных ассоциаций генов с участием пшенично-ржаных транслокаций 1BL/IRS и 1AL/IRS. Сортосмену необходимо проводить через 5-7 лет. Первичное семеноводство ведется только оригинаторами сортов (селекционерами).

Increase of winter wheat adaptive potential is ensured with evolutionary-analogous principle of breeding and formation of new coadaptive associations of genes involving wheat-rye translocations 1BL/IRS and 1AL/IRS. Cultivars should be changed every 5-7 years. Original seed growing is carried out only by originators of the cultivars (plant breeders).

ГОЛИК Л.М.

*Миронівський інститут пшениці імені В.М.Ремесла УААН,
Україна, 08853, Київська обл., Миронівський р-н, с. Центральне ,
E-mail: mwheats@ukr.net mironovka@mail.ru*

ВИСОКОАДАПТИВНІ СОРТИ ОЗИМОЇ ПШЕНИЦІ, СТВОРЕНІ З ВИКОРИСТАННЯМ ТЕРМІЧНОГО МУТАГЕНЕЗУ

Створення озимих сортів пшениці, тритикале за допомогою впливу низьких температур (термічний мутагенез) на рослини пшениці і тритикале ярого при осінній сівбі дедалі набуває поширення. На 2005 р. в Реєстр сортів рослин України занесено сорт озимого тритикале Благодатний, створений у Луганському інституті АПВ УААН шляхом трансформації в озиму форму мексиканського ярого зразка ВІР k-347015 [1]. На 2007 р. створено і занесено до Державного реєстру сорт пшениці озимої Зимоярка, отриманого з німецького ярого сорту під впливом осінньої сівби в Інституті ФРiГ НАН України [2]. У Сибірському НДІ рослинництва і селекції СВ РАСГН отримана велика колекція спонтанних ярих мутантів пшениці, жита та тритикале шляхом сівби озимих культур весною [3].

Лавриненко Ю. [4], вивчаючи сортозразки пшениці високогірного Афганістану, де тип розвитку визначається технологічними строками сівби – в залежності від випадіння дощів (початок у листопаді і кінець у березні), виявив значну кількість сортозразків, які добре зимували в умовах півдня України (м. Херсон). Зміну типу розвитку Лавриненко Ю. пояснив адаптивністю рослин до нових агрокліматичних умов вирощування.

Метою наших досліджень є створення високоадаптивних сортів озимої м'якої пшениці з використанням термічного мутагенезу.

Матеріали і методи

Для пошуку вихідних форм у селекції озимої пшениці нами вивчено більше 1000 сортозразків колекції ярої пшениці різного еколого-географічного походження. За результатами сівби в місцевих умовах і вивчення їх за певними ознаками (висота рослин, стійкість до хвороб і вилягання) кращі з них використовувалися в селекційній роботі. В основу методики покладена довгострокова дія понижених температур на насіння ярої пшениці за попередньої яровизації 70-120 днів при температурі 0°C у холодильних камерах. Нами удосконалено методику попередньої яровизації сортозразків пшениці ярої шляхом заміни марлевих торбинок алюмінієвими бюксами з бічними отворами, це дозволило підвищити польову схожість яровизованого насіння, отримувати більшу кількість насіння M_1 та встановити оптимальний термін яровизації в 80 діб [5]. Використання довгострокової яровизації і сівби ярої пшениці (M_1) весною, а M_2 - M_7 під зиму дала можливість відібрати новий зимостійкий вихідний матеріал та на цій основі створити високоадаптивні, продуктивні сорти озимої пшениці.

Результати та обговорення

Основні вимоги до нових сортів озимої пшениці – висока зимостійкість, стабільно високий рівень урожайності та відмінні показники якості зерна. Цим вимогам відповідають районовані сорти Миронівська ранньостигла, Ремеслівна, Волошкова та передані на ДСВ – Вдячна, Святкова.

Сорт **Миронівська ранньостигла** створено методом багаторазового індивідуального добору з популяції рослин, отриманих шляхом зміни типу розвитку ярої пшениці сорту *BT-2288* (Туніс) в озиму. Різновидність лютеценс.

У весняний період розвиток рослин уповільнений і лише через 7-10 днів від початку відновлення вегетації відмічається його прискорення. Висівати його краще в ранні або оптимальні строки сівби для кожної зони. Кращі попередники – горох на зерно, одно- та багаторічні трави, кукурудза на зелений корм та ранній силос, ріпак. Ранньостиглий, дозріває одночасно з Донською напівкарликовою. Потенціал урожайності 9,5 т/га отримано у посушливому 2007 р на Волинському опорному пункті МПП. Високостійкий до вилягання, зимостійкий, посухостійкий. Стійкість до хвороб (у балах): борошнистої роси – 7, бурої іржі – 7, септоріозу листя – 4.

Урожайність (2004-2005 р.) у конкурсному сортовипробуванні МПП імені В.М.Ремесла 6,4-6,6 т/га. Вміст білка – 14,2-14,4%, „сирої” клейковини – 29,5-32,0%, „сила” борошна – 276-391 о. а. об'єм хліба – 720-820 см³. Цінна пшениця. Сорт рекомендований з 2002 року для зони Лісостепу та Полісся.

Сорт **Ремеслівна** створено методом багаторазового індивідуального добору з популяції рослин, отриманих шляхом зміни ярої пшениці сорту *KVZ/CUT-75* (Мексика) в озиму. Різновидність лютеценс.

У ранньовесняний період рослини на 7-10 днів затримують свій ріст і розвиток, згодом їх ріст покращується внаслідок інтенсивного відростання рослин. Кращими попередниками, що забезпечують високий стабільний урожай високоякісного насіння є горох на зерно, одно- та багаторічні трави після першого укусу, кукурудза на зелений корм та силос МВС, гречка, соя ранньостиглих сортів, ріпак. Виділяється високою пластичністю, знижує рівень урожаю при пізніх строках сівби та при недостатчі добрив в ґрунті. Кращою системою удобрення є високі агрофони для високоінтенсивного сорту та гное-мінеральні з внесенням на 1 га 80 т гною. Норма мінерального живлення по кращих попередниках – $N_{60}P_{40-60}K_{40-60}$; після гірших – $N_{80}P_{60-80}K_{60-80}$. Ремеслівна є сортом нової генерації з укороченим стеблом (73-80 см) більшого діаметру і товстішою соломиною, що сприяє підвищенню стійкості до вилягання і засвоєнню більшої кількості азоту (до 150-200 кг д. р.). Тому необхідно до основного живлення проводити дві підкормки по N_{30} д. р. – ранньовесняне та у фазу колосіння. Має потенціал урожайності 11,1 т/га. Середньостиглий. Високостійкий до вилягання. Зимостійкість на рівні сорту Миронівська 61. Стійкий до осипання та посухи. Стійкий проти основних грибних хвороб (бал): борошнистої роси – 6, бурої іржі – 6, септоріозу – 5.

Високоврожайний, середня врожайність в конкурсному сортовипробуванні 7.4 т/га (2004-2007 рр.). Натура зерна 783 г/л, вміст „сирої” клейковини 26,0-29,6%, білка 14,3%, „сила” борошна 330 о. а. Сильна пшениця. Сорт в Реєстрі сортів України з 2004 р., рекомендований для зони Лісостепу та Полісся.

Новий сорт **Волошкова** створено методом багаторазового індивідуального добору з популяції рослин, отриманих шляхом зміни ярої пшениці сорту *FLAMBARD* (Франція) в озиму. Різновидність лютеценс.

Насіння пшениці ярої сорту *FLAMBARD* (Франція) у 1992 р. яровизували протягом 82 дні, після чого (M_1) було висаджено весною в ґрунт, а восени (M_2) на початку оптимальних строків сівби висіяно під зиму. Після перезимівлі в 1993 р. залишилось 64,17% живих рослин. У суворий за умовами перезимівлі 1997 р., коли температура на вузлі кущіння знижувалась до -16°C , у селекційному розсаднику відібрали сім'ю за номером Лютеценс 31012, яка вирізнялась високим рівнем зимостійкості (9 балів) і продуктивністю 430 г/м².

Висока зимостійкість сорту Волошкова підтвердилась в сувору зиму 2003 р., коли в Україні загинуло майже 70% посівів озимої пшениці [6]. Приріст урожаю лінії Лютеценс 31012 до стандартного сорту Миронівська 61 склав 2,8 т/га. На підставі високої зимостійкості і врожайності за ряд років (2002 р. – 7,1 т/га, 2004 – 7,3 т/га) лінія Лютеценс 31012 під назвою сорт Волошкова в 2004 р. була передана до державного сортовипробування. У 2005 р. на Волинському опорному пункті МІП урожайність становила 8,9 т/га. Сорт добре реагує на внесення мінеральних добрив та формує урожайність до 10,0 т/га і більше з високою його якістю.

Маса 1000 зерен 40,3-42,8 г. Висота рослин 83-110 см, середньостиглий, високо зимостійкий, посухостійкий. Стійкість проти ураження (бал): борошнистою россою 7, бурою іржею 5, септоріозом листя 5. Стійкий до осипання зерна. Вміст білка – 13,9-14,3%, „сирої” клейковини – 29,4-31,4%, „сила” борошна – 245-371 о. а., об'ємний вихід хліба – 890-1090 см³. Цінна пшениця.

За результатами випробування сорт пшениці озимої Волошкова внесено до Реєстру сортів рослин придатних для поширення в Україні на 2008 рік.

Сорт **Вдячна** створено методом групового добору із лінії Еритроспермум 13908, отриманої шляхом зміни ярого сорту *BT-2288* (Туніс) в озимий. Різновидність еритроспермум.

Висота рослин 85-100 см. Ультраскоростиглий, посухостійкий, стійкий до осипання. Стійкість проти хвороб (бал): борошнистої роси – 6, бурої іржі – 6, септоріозу листя 5. Потенціал продуктивності – 7,5-8,0 т/га. Формує максимальний урожай при посіві в першу половину оптимальних дат сівби.

Урожайність у конкурсному сортовипробуванні 7,5 т/га. Сильна пшениця. Натура зерна – 840 г/л, вміст білка – 14,4%, клейковини – 36,2%, об'єм хліба – 820 см³. Сорт Вдячна на державному сортовипробуванні з 2005 р.

Сорт **Святкова** створено методом багаторазового індивідуального добору з популяції рослин, отриманих шляхом зміни ярої пшениці сорту *BAW „S”-7* (Мексика) в озиму. Різновидність лютеценс.

Висота рослин 91-105 см. Середньостиглий, зимостійкий, високостійкий до вилягання, посухостійкий, стійкий до осипання. Середньостійкий проти хвороб (бал): борошнистої роси 6, бурої іржі 6, септоріозу листя 4. За оптимального строку сівби і внесенні високих доз добрив потенціал врожайності становить 9,0 т/га.

Середня врожайність у конкурсному сортовипробуванні за роки вивчення 7,4 т/га. Вміст „сирої” клейковини – 28,0-29,3%, „сила борошна” 228-265 о.а., об'єм хліба – 790-840 см³. Сорт Святкова на державному сортовипробуванні з 2006 року.

Висновки

Метод термічного мутагенезу (низькі температури) є ефективним для створення нового вихідного матеріалу в селекції озимої пшениці. Сорти Миронівська

ранньостигла, Ремеслівна, Волошкова, Вдячна, Святкова вдало доповнюють один одного за господарсько-біологічними ознаками в системі спільного використання, виділяються високою адаптивністю формують стабільно високий урожай і якість зерна, тому їх ми рекомендуємо для широкого використання у виробництві.

Література

1. Шевченко А.М., Шевченко Н.А. Высокоадаптивные отличные по качеству продукции сорта озимых культур // Достижения і проблеми генетики, селекції та біотехнології. – К.: Логос, 2007. – Т. 2. – С. 204-208.
2. Державний Реєстр сортів рослин придатних для поширення в Україні / За ред. Волкодава В.В. – К., 2007. – 232 с.
3. Стёпочкин П.И., Артёмов Г.В. Создание и изучение коллекции спонтанных яровых мутантов пшеницы, ржи и тритикале в СИБНИИРС // Генетические ресурсы культурных растений в XXI веке. Состояние, проблемы, перспективы / Тез. докл. II Вавиловской межд. конф. 26-30 сентября 2007 г – СПб, 2007 – С. 350-352.
4. Лавриненко Ю.А. Селекционно-генетические ресурсы пшениц Афганистана // Фактори експериментальної еволюції організмів. – Зб. наук. праць, присвячених 100-річчю від дня народження Гершензона С.М. і Шкварнікова П.К. – К.: Логос, 2006. – Т. 3. – С. 254-259.
5. Голик Л.М. Використання творчої спадщини академіка В.М. Ремесла у сучасних дослідженнях з селекції пшениці. – Наук.-техн. бюлетень МІП імені В.М. Ремесла. – К.: Аграрна наука, 2007. – Вип. № 6–7. С. 125–137.
6. Шелепов В.В., Гаврилюк М.М. та ін. Селекція, насінництво та сортовивчення пшениці. – Миронівка, 2007. – 410 с.

Резюме

Показані напрямки і результати використання селекціонерами Миронівського інституту пшениці імені В.М. Ремесла методу термічного мутагенезу (дії низьких температур на ярі сортозразки). На цій основі створені нові високоадаптивні сорти озимої пшениці Миронівська ранньостигла, Ремеслівна, Волошкова, Вдячна, Святкова.

Показаны направления и результаты использования селекционерами Мироновского института имени В.Н. Ремесло метода термического мутагенеза (действие низких температур на яровые образцы). На этой основе созданы новые высокоадаптивные сорта озимой пшеницы Мироновская раннеспелая, Ремесливна, Волошкова, Вдячна, Святкова.

The paper presents some approaches and results of using thermal mutagenesis method (effect of low temperatures on spring variety samples) by breeders at The V.M. Remeslo Myronivka Institute of Wheat. New high-adaptive winter wheat cultivars Myroniv'ska rannyostyhlа, Remeslivna, Voloshkova, Vdyachna, Svyatkova have been developed by this method.

ГОЛУБ Ю.В.¹, СЕЧНЯК А.Л.¹, ВАСИЛЬБЕВ А.А.²

¹Одесский национальный университет им. И.И. Мечникова, кафедра генетики и молекулярной биологии, Шампанский пер. 2, Одесса, Украина, 65058, e-mail: sechnyak@ukr.net

²Селекционно-генетический институт – Национальный центр семеноведения и сортоизучения, отдел фитопатологии и энтомологии, Овидиопольская дор., 3, Одесса, Украина, 65036, e-mail: almarys@te.net.ua

РЕАКЦИЯ НА МУЧНИСТУЮ РОСУ И БУРУЮ РЖАВЧИНУ У ГИБРИДОВ АЛЛОПЛАЗМАТИЧЕСКИХ ПШЕНИЦ

Отдаленная гибридизация широко используется в селекции пшеницы. Применяются как непосредственные скрещивания с видами – потенциальными донорами полезных признаков, так и гибридизация с мостовыми формами, использование чужеродных цитоплазм [1-3]. В результате такой гибридизации нередко нарушается генетическая коадаптация и необходимы меры по ее восстановлению. Оценка степени генетической коадаптации получаемых форм может осуществляться путем сравнительного изучения у них различных параметров: проведения морфо-биологического анализа, изучения их цитогенетической стабильности, устойчивости к неблагоприятным абиотическим и биотическим факторам.

Представленная работа посвящена оценке устойчивости взрослых растений аллоплазматических пшениц и их гибридов к бурой ржавчине (*Puccinia recondita f. sp. tritici* Erikss. et Henn.) и мучнистой росе (*Blumeria graminis* (D.C.) Speer *f. sp. tritici* (*Erysiphe graminis* D.C.)) как одного из параметров адаптивности форм, получаемых в результате отдаленной гибридизации.

Материалы и методы

Материалом для исследований служили аллоплазматические линии мягкой пшеницы с ядерным геномом сортов Донская полуинтенсивная (ДПИ) и Мироновская 808 (М808) с цитоплазмами от диплоидных (*Aegilops speltoides*, *Ae. squarrosa var. typica*), тетраплоидных (*Ae. cylindrica*, *Ae. variabilis*, *Ae. ventricosa*) и гексаплоидного (*Ae. vavilovii*) сородичей пшеницы, от двух видов пшеницы и оригинальные сорта (табл. 1), а также пшенично-чужеродные амфиплоиды *Elitricum fertile* и *AD* (*Ae. ventricosa* x *T. dicoccum*) и короткостебельный аналог сорта Степняк 2 – Степняк 2К, которые использовали для гибридизации с аллоплазматическими пшеницами.

Устойчивость изучаемых форм оценивали в полевом инфекционном питомнике в 2006 и 2007 годах при искусственном заражении растений популяцией бурой ржавчины. Степень устойчивости оценивали по девятибалльной шкале. Баллы 9-6 характеризовали различную степень устойчивости, баллы 5-1 – различную степень восприимчивости. Они соответствовали следующему количеству пораженных растений в процентах: 1-100%, 2-90%, 3-65%, 4-40%, 5-25%, 6-15%, 7-10%, 8-5%, 9-0% [4]. Статистическую обработку выполняли методом двухфакторного дисперсионного анализа без повторений [5] после предварительного преобразования процентной оценки по формуле: $\varphi = 2 \arcsin \sqrt{p}$ [6]. Оценивали отдельно комплексы форм, созданных на основе пшениц Мироновская 808 и Донская полуинтенсивная. В каждый из комплексов были включены родительские формы и учитывалось влияние погодных условий года.

Результаты и обсуждение

Анализ устойчивости к мучнистой росе показал, в первую очередь, влияние на этот признак погодных условий. Воздушная засуха, наблюдавшаяся в 2007 году, оказала неблагоприятное воздействие не только на растения, но и на возбудителя заболевания, в результате чего степень поражения растений в 2007 году оказалась меньше, чем в предыдущий год. Анализ устойчивости в среднем за два года в группе ДПИ показал, что рассматриваемые формы были на грани устойчивости и восприимчивости (табл. 1). Линии с цитоплазмой от *Ae. variabilis*, *Ae. ventricosa* и *Ae. vavilovii* были устойчивее сорта и его эуплазматической линии. Гибридизация с *E. fertile*, имевшим такую же степень устойчивости, как и ДПИ, на фоне цитоплазм *Ae. variabilis* и *Ae. ventricosa* и эуплазмы привела к улучшению устойчивости. Последующая гибридизация с пшеницей Степняк2К, которая превосходила по устойчивости ДПИ, в большинстве случаев улучшила устойчивость форм, за исключением гибридов на основе цитоплазм *Ae. variabilis* и *Ae. ventricosa*. В этом

случае устойчивость уменьшалась, но все же была достоверно ($P < 0,05$) выше, чем у ДПИ. При гибридизации с *AD* (*Ae. ventricosa* x *T. dicoccum*), который был гораздо устойчивее, чем ДПИ и ДПИ (*Ae. ventricosa*) устойчивость гибридов достоверно не отличалась от устойчивости амфилоида, но гибрид на основе ДПИ (*Ae. ventricosa*) был достоверно устойчивее ($P < 0,05$), чем гибрид на основе ДПИ. Положительное влияние цитоплазмы *Ae. ventricosa* на устойчивость к мучнистой росе отмечалось и в других исследованиях [7].

Таблица 1

Устойчивость (в баллах) к мучнистой росе и бурой ржавчине аллоплазматических пшениц, их гибридов и родительских форм в 2006 и 2007 гг.

Источник цитоплазмы	Донская полуинтенсивная				Мироновская 808			
	Мучнистая роса		Бурая Ржавчина		Мучнистая роса		Бурая Ржавчина	
	2006	2007	2006	2007	2006	2007	2006	2007
Собственная цитоплазма	4	5	6	8	5	5	5	8-5
<i>Aegilops speltoides</i>	–	–	–	–	5	5	5	5
<i>Ae. squarrosa</i> var. <i>typica</i>	5	5	7	8	5	5	7	8
<i>Ae. cylindrica</i>	4	5	5	5	5	5	6	6
<i>Ae. variabilis</i>	5	5	5	5-3	6	5	5	5
<i>Ae. ventricosa</i>	5	5	5	5	7	6	6	7
<i>Ae. vavilovi</i>	6	5	5	4	6	5	6	6-3
<i>Triticum dicoccoides</i>	5	7	3	3	5	5	3	4
<i>T. aestivum</i>	5	4	3	3	5	6	4	4
алло/эуплазматическая пшеница × <i>Elitricum fertile</i> , F ₇								
<i>Ae. cylindrica</i>	5-3	5	2	2	5	6	5	4
<i>Ae. variabilis</i>	5	5	3	2	5	6	6	5
<i>Ae. ventricosa</i>	5	6	3	3	5	7	4	3
<i>T. dicoccoides</i>	5	4	5	6	5	5	4	3
<i>T. aestivum</i>	5	5	3	4	5	6	4	4
(алло/эуплазматическая пшеница × <i>Elitricum fertile</i>) × Степняк 2К, F ₅								
<i>Ae. cylindrica</i>	5	5	3	3	7-5	7	5	5
<i>Ae. variabilis</i>	5	4	3	4	5	5	5	5
<i>Ae. ventricosa</i>	5-4	5	4	4	5	6	4	5-3
<i>T. dicoccoides</i>	5-4	6	5	5	5	7	3	3
<i>T. aestivum</i>	6	6	3	3	5	5	4	4
алло/эуплазматическая пшеница × <i>AD</i> (<i>Ae. ventricosa</i> x <i>T. dicoccum</i>)								
<i>Ae. ventricosa</i>	7-5	7	5	5	5	6-7	3	3
<i>T. aestivum</i>	7-4	7	5	5	–	–	–	–
Родительские формы								
	Мучнистая роса				Бурая ржавчина			
	2006		2007		2006		2007	
<i>Elitricum fertile</i>	4		5		7		8	
Степняк 2К	4-5		7-6		6		8-3	
<i>AD</i> (<i>Ae. ventricosa</i> x <i>T. dicoccum</i>)	7-4		7		5		5	

Анализ устойчивости за 2 года М808 показал, что данная группа была устойчивее, чем группа ДПИ. Сорт М808 превосходил по устойчивости *E. fertile*, значительно уступал амфилоиду *AD* (*Ae. ventricosa* x *T. dicoccum*) и был на уровне сорта Степняк 2К и аллоплазматических линий, за исключением линии М808 (*Ae. ventricosa*), которая была устойчивой к мучнистой росе. Гибридизация с *E. fertile* в большинстве случаев улучшала устойчивость к заболеванию, особенно четко это

проявилось на фоне цитоплазмы *Ae. ventricosa*. Последующая гибридизация с пшеницей Степняк 2К как улучшала, так и ухудшала устойчивость к заболеванию. Гибридизация с AD (*Ae. ventricosa* x *T. dicoccum*) улучшала устойчивость гибрида (табл. 1).

Возбудитель бурой ржавчины на климатические условия года реагировал гораздо слабее. Видимо, это связано с тем, что критические стадии его развития завершились до наступления воздушной засухи. В целом, несмотря на то, что сорт ДПИ был устойчивее Мироновской 808, формы на основе ДПИ оказались более чувствительными к бурой ржавчине, чем формы на основе М808.

Анализ устойчивости за два года в группе ДПИ показал, что сорт превосходит по устойчивости как созданные на его основе аллоплазматические и эуплазматическую линии (за исключением линии с цитоплазмой от *Ae. squarrosa* var. *typica*), так и гибриды указанных форм с пшенично-чужеродными амфиплоидами и с мягкой пшеницей Степняк 2К. Гибридизация с *E. fertile* и, особенно, с пшеницей Степняк 2К, резко усиливала чувствительность гибридов к бурой ржавчине. Гибридизация с AD (*Ae. ventricosa* x *T. dicoccum*) в меньшей степени снижала устойчивость к заболеванию. При этом *E. fertile* был наиболее устойчивой к бурой ржавчине формой за период испытаний, а AD (*Ae. ventricosa* x *T. dicoccum*) уступал по этому показателю ДПИ.

У аллоплазматических линий сорта М808 устойчивость была ниже, чем у сорта. Отмечается также снижение устойчивости при гибридизации с *E. fertile* и с пшеницей Степняк 2К, хотя и в меньшей степени, чем у соответствующих гибридов на основе ДПИ. При гибридизации М808 (*Ae. ventricosa*) с AD (*Ae. ventricosa* x *T. dicoccum*) устойчивость снижалась гораздо сильнее, чем при гибридизации ДПИ (*Ae. ventricosa*) с данным амфиплоидом.

Выводы

1. Установлено положительное влияние аллоплазмы от *Ae. ventricosa* на устойчивость к мучнистой росе. Гибридизация с пшенично-чужеродными амфиплоидами, особенно на фоне аллоплазмы от *Ae. ventricosa* улучшает устойчивость растений к заболеванию. Выявлено существенное влияние погодных условий на устойчивость к мучнистой росе.

2. Аллоплазмы от *Ae. squarrosa* var. *typica* положительно влияют на устойчивость к бурой ржавчине, другие аллоплазмы обладали негативным эффектом. Гибридизация с пшенично-чужеродными амфиплоидами резко усиливала чувствительность растений к заболеванию.

3. Повторное опыление гибридов аллопшениц и амфиплоидов пшеницей для улучшения морфо-биологических характеристик как улучшало, так и (чаще) ухудшало устойчивость к заболеваниям.

Литература

1. Голік О.В., Пархоменко Р.Г., Долгова О.М., Роголіна Л.В., Богуславський Р.Л. Амфідиплоїди рідких видів пшениці та її диких співродичів як джерело цінних ознак для селекції // Селекція і насінництво. – 1997. – № 77. – С. 26-31.

2. Бабаянц Л.Т., Рыбалка А.И., Бушулян М.А., Васильев А.А. и др. Новый исходный материал для селекции на устойчивость к болезням // Матер. науч.-практ. конф. «Зеленая революция Лукьяненко» – Краснодар. – 2001. – С. 329-331.

3. Силкова Т.А. Уплыў чужародных цытаплазм на прояўленне гаспадарча важных прыкмет у алаплазматычных ліній мяккай пшаніцы // Весці АН БССР. Сер. біял. н. – 1984. - №3. – С. 39-43.

4. Бабаянц Л. Т., Дубинина Л.А., Ющенко Г. М. Выявление неаллельных известным генов устойчивости к *Tilletia caries* (DC) Tul. у линий пшеницы от межвидовой гибридизации (*Triticum aestivum* x *Aegilops cylindrica*) // Цитология и генетика. – 2000. – Т.34, №4. – С. 32-40.

5. Седловский А.И., Мартынов С.П., Мамонов Л.К. Генетико-статистические подходы к теории селекции самоопыляющихся культур. -Алма-Ата: Наука, 1982,-200 с.
6. Рокицкий П.Ф. Биологическая статистика. – Минск: Высшэйшая школа, 1973. – 320 с.
7. Волуевич Е.А., Булойчик А.А. Ядерно-цитоплазматические взаимодействия в устойчивости пшеницы к грибным патогенам. Сообщ. IV. Влияние ядерного генома аллоплазматических линий на проростковую количественную устойчивость к клонам мучнистой росы // Генетика. – 1992. – Т. 28, №11. – С. 68-74.

Резюме

Алоплазма від *Ae. ventricosa* та гібридизація з амфіплоїдами підвищували стійкість до борошнистої роси, яка також залежала від погодних умов. Заміщення цитоплазми та гібридизація з амфіплоїдами сильно знижували стійкість до бурої іржи, однак цитоплазма від *Ae. squarrosa var. typica* підвищувала стійкість. Запилення гібридів пшеницею частіше погіршувало стійкість до захворювань.

Аллоплазма от *Ae. ventricosa* и гибридизация с амфиплоидами повышали устойчивость к мучнистой росе, которая также зависела от погодных условий. Замещение цитоплазмы и гибридизация с амфиплоидами сильно снижали устойчивость к бурой ржавчине, хотя цитоплазма от *Ae. squarrosa var. typica* повышала устойчивость. Опыление гибридов пшеницей чаще ухудшало устойчивость к заболеваниям.

The alloplasm from *Ae. ventricosa* and hybridization with amphiploids raised resistance to powdery mildew, which also depended on weather conditions. Substitution of cytoplasm and hybridization with amphiploids strongly reduced resistance to leaf rust, although cytoplasm from *Ae. squarrosa var. typica* raised resistance. Pollination of hybrids by wheat more often decreased resistance to diseases.

ГОРОВА Т.К., СЕРГІЄНКО О.Ф., БАРСУКОВА В.Є.

*Інститут овочівництва і багданництва УААН
п/в Селекційне Харківського р-ну Харківської обл., 62578
e-mail: ovojch @ intercomplekt. kharkov ua*

СТЕРИЛЬНІ ЛІНІЇ – ДЖЕРЕЛА ДЛЯ СОРТОВОЇ СЕЛЕКЦІЇ МОРКВИ

Морква є однією з цінних овочевих дворічних рослин, завдяки лікарському потенціалу якої можливо поліпшення стану людини як свіжою так і переробленою продукцією. Ринкове сьогодення потребує від науки створення конкурентноздатних сортів і гібридів F₁ з комплексом господарсько-корисних ознак та стійкістю проти абіо- і біотичних факторів. Вирішення такого завдання залежить від розробки способів, які здатні скоротити 25-річний період селекції створення лінійного та гібридного матеріалу. Сучасний розвиток гетерозисної селекції моркви забезпечив деяке накопичення цінного лінійного матеріалу, як фертильного, так і з чоловічою стерильністю, який є надзвичайно корисним для подальшої селекційної роботи.

Мета роботи полягала у розробці методичних підходів до залучення стерильних ліній у сортову селекцію моркви.

Матеріали і методи

Дослідження щодо вирішення методичних питань прискорення селекції проводиться в Інституті протягом 20 років. В основу селекційного процесу покладено гетерозисний ефект від явища цитоплазматичної чоловічої стерильності, яка контролюється ядерними та цитоплазматичними генами. Нами визначено фактори, які

впливають на прояв цитоплазматичної чоловічої стерильності у стерильної лінії 1238П типу петалоїд селекції відомого вченого, доктора сільськогосподарських наук Н.Л. Жидкової (НДІОГ, Росія), а також селекційну цінність цієї лінії.

Дослідження проводили згідно методичних рекомендацій з питань селекції і насінництва моркви [1-6]. Площа облікової ділянки рослин I і II року життя - 10 м², повторність чотирикратна. Рослини першого року вирощували при висіві насіння рано навесні (3 декада квітня – 1 травня), норма 5 кг/га, відстань між рядками 70 см. Маточні рослини після зберігання у плівкових мішках з пересипанням полікарбом висаджували за схемою 70 x 30 см. Догляд за рослинами полягав у знищенні бур'янів, розпушенні міжрядь.

Результати та обговорення

При вивченні стерильних ліній російської селекції в колекційних розсадниках Інституту овочівництва та баштанництва і його мережі була виділена лінія моркви 1238П. Вона була створена на основі багаторазового інбридингу рослин сорту російської селекції, у яких було відмічено наявність цитоплазматичної чоловічої стерильності (деформовані тичинки – тип петалоїд). Аналіз оцінки стерильної лінії на адаптивність в умовах Лісостепової зони України показав стабільність корисних селекційних ознак та збереження стерильності.

За результатами досліджень 1990-1991 років у колекційному розсаднику лінія моркви 1238П виявила ряд переваг над фертильним сортом Нантська харківська. Так, загальна урожайність лінії істотно перевищувала сорт-стандарт на 2 т/га (табл. 1).

Зниження товарної врожайності відбулося за рахунок збільшення тріснутих коренеплодів та дії погодно-кліматичних умов. Отже, за продуктивністю лінія 1238П не поступалась стандарту - сорту Нантська харківська, хоча за способом створення вона була інбредною. Інша картина спостерігалась за вмістом корисних речовин (табл. 2). Для селекції лінія 1238П становила значний інтерес у плані перевищення над стандартом сухої речовини на 1% , суми цукрів на 0,75 % та каротину на 3 мг/100 г. Крім того, лінія майже у 4 рази менше накопичувала нітратів.

Таблиця 1

Характеристика господарсько-цінних ознак стерильної лінії моркви 1238П у колекційному розсаднику (середнє за 1990-1991 рр.).

Зразок	Урожайність, т/га		Вміст в загальному урожаї, %			Товарність, %	Коренеплід, см		Діаметр серцевини, см	Стерильність, %
	загальна	товарна	недогонів	тріснутих	виродливих		довжина	діаметр		
Лінія 1238П	35	12	1,6	56,0	6,7	33,6	14,5	4,0	1,9	91,3
St - сорт Нантська харківська.	33	12	1,4	57,6	4,3	36,7	17,5	6,0	1,7	0

НІР_{0,05} 1,0

Таблиця 2

Вміст хімічних речовин в коренеплодах моркви стерильної лінії 1238П (середнє за 1990-1991 рр.)

Зразок	Суша речовина, %	Розчинна суха речовина, %	Моноцукри, %	Сахароза, %	Сума цукрів, %	Аскорбінова кислота, мг/100 г	Каротин, мг/100 г	NO ₃ , мг/кг
1238П	13,25	9,73	4,02	2,62	6,64	5,07	18,56	138
Нантська харківська, St	12,13	8,68	3,83	2,01	5,89	6,38	14,16	566

Протягом ряду років лінія 1238П на природному інфекційному фоні виявила відносну стійкість до чорної і гнилі та фомозу. До білої та сірої гнилей – стабільну сприйнятливості (табл. 3).

Таблиця 3

Стійкість проти хвороб лінії 1238П (середнє за 1996-1999рр.)

Показники	Чорна гниль	Біла гниль	Сіра гниль	Фомоз
Lim min-max	(25,0-33,3) ⁹	(63,7-75,0) ⁹	(40,0-50,0) ⁹	(15,0-25,0) ⁷
X±S _m	27,9±1,9	69,8±3,3	47,3±2,8	17,6±1,9
AS	85,6	91,8	86,7	76,1

Отже, для нас лінія мала цінність, як похідний матеріал, тому була здійснена її оцінка на комбінаційну здатність при схрещуванні з сортами селекції Інституту. Результати досліджень довели, що участь лінії 1238П в гібриді забезпечувала ефект гетерозису за товарною врожайністю 122 %, тоді як сорт-запилувач – 104 % (табл. 4).

Таблиця 4

Ефект гетерозису за врожайністю і товарністю коренеплодів гібриду моркви з участю лінії 1238П (середнє за 1992-1993 рр.)

№ каталога	Зразок	Товарна урожайність		Товарність коренеплодів, %	Ефект гетерозису за урожайністю, %	
		т/га	% до контролю		відносно материнської лінії	відносно сорту-запилувача
774	♀ 1238 П	23	110	52,2	100	-
127	F ₁ (1238 П х Нантська харківська)	28	133	63,2	122	104
	♂ Нантська харківська, St	27	128	86,7	-	100

HP_{0,05}

1,5

Характер успадкування структури врожайності довів, що у гібриду F₁(1238П х Нантська харківська) наслідування загальної урожайності відзначалось домінуванням (2,7), а товарної - наддомінуванням (13,0). Нетоварні фракції характеризувались проміжним наслідуванням (табл. 5).

За аналізом ступеню домінування хімічного складу коренеплодів моркви гібриду F₁ (1238 х Нантська харківська) визначено, що проміжне успадкування характерне було для сухої речовини, сахарози, суми цукрів та каротину. Домінуванням відзначались розчинна суха речовина та моноцукри. Наддомінування відмічено для аскорбінової кислоти (*hp* = 4,15) (табл. 6).

Таблиця 5

Характер успадкування структури урожайності у гетерозисного гібриду F₁ Моркви, *hp* (середнє за 1992-1993 рр.)

Гібрид	Урожайність, т/га		Структура урожайності, %			
	загальна	товарна	недогонів	тріснутих	виродливих	товарність
F ₁ (1238П х Нантська харківська)	27,0	13,0	0,3	-0,4	0,1	0,5

Таблиця 6

Ступінь домінування вмісту хімічних речовин в коренеплодах моркви гібриду стерильної лінії 1238П, *hp*, (середнє за 1990-1991 рр.)

Гібрид	Суша речовина	Розчинна суха речовина	Моноцукри	Сахароза	Сума цукрів	Аскорбінова кислота	Каротин	NO ₃
F ₁ (1238П х Нантська харківська)	- 0,48	0,71	0,62	- 0,32	- 0,40	4,15	- 0,43	- 1,65

Зважаючи на високі показники хімічного складу, які успадковувались в поколінні, нами було проведено оцінку лінії 1238П на адаптивну здатність при її репродукуванні в умовах Лісостепу без закріплювача чоловічої стерильності.

При цьому встановлено, що коефіцієнти варіації товарної і загальної врожайності становили 27,7 і 29,3 % відповідно. Оцінка екологічної мінливості врожайності лінії 1238 в умовах право- і лівобережного Лісостепу показала, що

параметри загальної врожайності коливались від 23 до 25 т/га, а агрономічна стабільність складала 70,7 %. Таким чином нами було встановлено, що лінія 1238П може значною мірою зберігати свої якості у різних зонах репродукування.

Проте, вміст стерильних насінневих рослин у лінії 1238П при розмноженні без фертильного аналога, що закріплює стерильність, знижувався до 40 %. Це означало, що лінія містила ген відновлення фертильності.

Була розроблена схема створення фертильного сорту зі стерильної лінії і застосована щодо лінії 1238П. Схема передбачала використання генів відновлення фертильності, що присутні в популяції лінії і тривала 4 роки. За цією схемою створено новий конкурентноздатний сорт Вереснева, який 2008 року внесений до Державного Реєстру сортів рослин України .

Сорт моркви Вереснева характеризується середнім строком досягання коренеплодів. Листкова розетка зеленого кольору, напівстояча, висотою 39-45 см, діаметром 25-30 см, кількістю листків від 12-19 шт., ширина перисторозсіченого листка 12-15 см, довжина 15-18 см. Коренеплід сорто типу Валерія має темно-оранжеве забарвлення, як серцевини, так і м'якуша, що не втрачається при переробці. Довжина коренеплоду 18-25 см, діаметр 3,0-4,0 см, маса 150-200 г. Урожайність коренеплодів - 38-45 т/га. Сорт відносно стійкий до хвороб, придатний до механізованого збирання урожаю.

Висновки

Аналіз вмісту корисних речовин, господарських та адаптивних властивостей лінії моркви 1238П виявив її придатність для сортової селекції. Шляхом застосування розробленого авторами способу, що дозволяє створювати фертильні сорти моркви зі стерильних ліній за 4 роки, створено сорт Вереснева, який має високі технологічні та споживчі якості.

Література

1. *Жидкова Н.И. , Квасников Б.В.* Методические указания по селекции овощных культур на пригодность к механизированной уборке. - М.: ВНИИССОК, 1977.
2. Сучасні методи селекції овочевих і баштанних культур. За ред. Горової Т.К., Яковенка К.І. – Харків: ІОБ УААН, 2001. – С. 465-499.
3. Методические указания по селекции сортов и гетерозисных гибридов корнеплодных растений . - М.: ВАСХНИЛ, 1987. – 60 с.
4. Методические указания по ускоренной селекции. - Л.: ВИР, 1972. - 28 с.
5. Методика полевого опыта в овощеводстве и бахчеводстве. - М.: НИИОХ, УНИИОБ, 1979. - 210 с.
6. *Доспехов Б.А.* Методика полевого опыта . - М.: Агропромиздат, 1985. - 35 с.

Резюме

Здійснено аналіз адаптивної і комбінаційної здатностей лінії моркви 1238П з чоловічою стерильністю за господарськими показниками, визначено ступінь успадкування вмісту в коренеплодах важливих хімічних речовин. Розроблено спосіб переведення стерильної лінії на фертильну основу і з його допомогою створено сорт моркви Вереснева, який має високі технологічні та споживчі якості.

Осуществлен анализ адаптивной и комбинационной способностей линии моркови 1238П с мужской стерильностью, определена степень наследования содержания в корнеплодах важных химических веществ. Разработан способ переведения стерильной линии на фертильную основу и с его помощью создан сорт моркови Вэрэснэва, который имеет высокие технологические и потребительские качества.

The analysis of adaptive and combinative abilities of the carrot male sterile line 1238P has been carried out and the heritability of important chemical matters content in roots has been determined. The method of a male sterile line transferring to the fertile status has been developed. By means of it the carrot cultivar Veresneva with high technological and consumer properties has been created.

ЗВЯГІН А.Ф. ЄЛЬНІКОВ М.І. ГРІДІН М.М.

Інститут рослинництва ім. В.Я. Юр'єва УААН України,

Україна, 61060, Харків, пр. Московський, 142, E-mail: ppi@kharkov.ukrtel.net

СЕЛЕКЦІЙНА ЦІННІСТЬ ВИХІДНОГО МАТЕРІАЛУ М'ЯКОЇ ОЗИМОЇ ПШЕНИЦІ ВІД СХРЕЩУВАННЯ СОРТІВ РІЗНОГО АДАПТИВНОГО ПОТЕНЦІАЛУ

Відомо, що вимоги до сорту який створюється багатогранні і постійно зростають. Особливу актуальність в отриманні високих врожаїв має стійкість сорту до несприятливих чинників середовища. В наших дослідженнях вивчена селекційна цінність 13 сортів озимої пшениці різного адаптивного та продуктивного потенціалу, різного еколого – географічного та генетичного походження створених в різні періоди. Встановлена їх стабільність, екологічна пластичність, стійкість до біотичних та абіотичних чинників середовища [1].

Досліди проводились в селекційному, контрольному розсадниках, в попередньому і конкурсному сортовипробуваннях за методикою державного сортовипробування сільськогосподарських культур [2].

Зимостійкість вивчали при штучному проморожуванні в холодильних камерах КНТ – 1 в секторі фізіології рослин Інституту рослинництва ім. В.Я. Юр'єва УААН а також шляхом підрахунку кількості рослин восени і навесні на заздалегідь закріплених ділянках, цінність селекційного матеріалу за продуктивністю та якістю зерна методом електрофорезу запасних білків озимої пшениці [3].

Аналіз перезимівлі сортів і гібридного матеріалу показав їх суттєву різницю за зимостійкістю. (табл. 1).

Таблиця 1

Стійкість проти вилягання та зимостійкість сортів і гібридів озимої пшениці, (2004–2005 рр.)

Гібридна комбінація	Стійкість проти вилягання, в балах					Зимостійкість, % рослин, що перезимували				
	♀	♂	F ₃	F ₄	F ₅	♀	♂	F ₃	F ₄	F ₅
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Юр'євка / Харус	1,0	9,0	6,0	6,0	6,0	97,2	94,3	93,6	94,2	94,5
Харус / Юр'євка	9,0	1,0	7,0	7,0	7,0	94,3	97,2	93,7	94,5	95,0
Ферругінеум 1239 / Українка Одеська	2,0	9,0	6,0	6,0	6,0	98,5	80,3	93,1	92,3	93,2
Українка Одеська / Ферругінеум 1239	9,0	2,0	7,0	7,0	7,0	80,3	98,5	88,3	90,5	90,2
Миронівська 808 / Одеська 267	4,0	7,0	7,0	7,0	7,0	94,1	89,5	93,3	92,5	90,4
Одеська 267 / Миронівська 808	7,0	4,0	7,0	7,0	7,0	89,5	94,1	90,7	89,3	87,9
Донецька 48 / Харківська 96	9,0	3,0	7,0	7,0	7,0	92,1	92,7	93,5	92,4	92,1
Харківська 96 /	3,0	9,0	7,0	6,0	6,0	92,7	92,1	90,8	93,7	92,3

Донецька 48										
Волжская 23 / Лузанівка Одеська	7,0	9,0	7,0	8,0	7,0	93,6	81,2	90,5	91,8	92,4
Лузанівка Одеська / Волжская 23	9,0	7,0	8,0	8,0	7,0	81,2	93,6	85,7	89,3	89,2
Харківська 105 /Українка Одеська	3,0	9,0	7,0	6,0	6,0	94,5	80,3	90,8	89,5	91,3
Українка Одеська / Харківська 105	9,0	3,0	7,5	7,5	6,5	80,3	94,5	85,6	88,4	90,1
Миронівська 808 / Харус	2,0	9,0	5,0	5,0	6,0	94,1	94,3	93,7	95,6	94,3
Харус / Миронівська- 808	9,0	2,0	6,0	6,0	5,0	94,3	94,1	94,4	92,1	95,8
Сонячна / Ехо	8,0	7,0	7,0	7,0	7,0	81,3	93,4	83,3	86,5	86,7
Ехо / Сонячна	7,0	8,0	7,0	7,0	7,0	93,4	81,3	89,3	90,5	91,3

Було визначено, що чим вищі за зимостійкістю батьківські форми, тим більш зимостійке потомство. Так, весняні підрахунки 2004–2005 рр., показали, що в комбінаціях схрещувань, де в якості батьківських форм, були використані місцеві високозимостійкі сорти Ферругінеум 1239, Юр'євка, підвищеної зимостійкості Харківська 96, Харківська 105, Харус кількість рослин, що перезимували в порівнянні з середньозимостійкими Ехо, Лузанівка Одеська, Українка Одеська була значно вищою. Особливо це помітно коли високозимостійкий сорт був материнською формою. Тобто чітко простежується залежність рівня зимостійкості гібридного потомства від рівня батьківських форм. Це повністю підтвержують дані наших дослідів, які були отримані в жорстких умовах на природньому фоні в період перезимівлі рослин у 2003 році.

Дія низьких температур на оголені рослини, перепади температури, вкрай пізні відновлення весняної вегетації (11 квітня), льодова кірка, застій талої води, призвели до практично повної загибелі рослин озимої пшениці. Але в наших дослідях, навіть в таких екстремальних умовах екстенсивні сорти Ферругінеум 1239, Юр'євка, перезимували на 80 і 70% відповідно. В гібридному і селекційному розсадниках гібридні комбінації і лінії однією з батьківських форм яких були ці сорти також перезимували на 70 і 60% відповідно, що на фоні загибелі інших сортів і гібридів свідчить про їх потужний адаптивний потенціал.

Також виділені джерела стійкості проти вилягання: Харус, Лузанівка Одеська, Українка Одеська, Донецька 48. Ці сорти при схрещуванні з високорослими зимостійкими екстенсивними та напівінтенсивними дозволяють отримувати невисокорослі форми зі значним продуктивним і адаптивним потенціалами (табл.1).

При вивченні гібридів від схрещування сортів з різним рівнем прояву ознак продуктивності, адаптивності та якості зерна виявлено значний формоутворюючий процес в F_2 - F_5 поколіннях реціпрокних гібридів, одержаних від схрещування високозимостійких сортів зі значним адаптивним потенціалом стійкості проти несприятливих чинників середовища (Ферругінеум 1239, Юр'євка, Миронівська 808, Харківська 105) з високоврожайними сортами (Українка Одеська, Лузанівка Одеська, а також з сортом Харус, який поєднує в своєму генотипі високу урожайність і високу стійкість до несприятливих умов вирощування. Нами отримані високопродуктивні лінії з підвищеною та високою зимостійкістю. Вони мають значну селекційну цінність для адаптивної селекції.

Для отримання гібридного потомства озимої пшениці з високим рівнем ознак продуктивності і зимостійкості бажано при підборі батьківських пар за материнську

форму брати сорт місцевого походження, з високими адаптивними властивостями, а за батьківську інші зі значним урожайним потенціалом.

При схрещування інтенсивних сучасних сортів з високоадаптивними екстенсивними рівень урожайності перших дозволяє отримувати зимостійкі гібриди з ознаками продуктивності на рівні та вище кращої батьківської форми.

Методом електрофорезу запасних білків озимої пшениці визначено ефективність доборів морозостійких форм за продуктивністю та якісними показниками.

Створено селекційно цінні лінії які є одночасно носіями цінних алелів, що маркують високу морозостійкість, продуктивність та якість зерна (5/1 Миронівська 808 / Одеська 267, 6/3 Одеська 267 / Миронівська 808, 9/10 Волжская 23 / Лузанівка Одеська, 10/6 Лузанівка Одеська / Волжская 23, 11/5 Харківська 105 / Українка Одеська, 12/9 Українка Одеська / Харківська 105, 13/7 Харус / Миронівська 808).

За результатами досліджень з комбінації Харківська 105 / Донецька 48 створено три сорти озимої пшениці: Досконала, Лютесценс 891 – 04, Лютесценс 1304 – 05. Сорт Досконала передано на Державне сорто випробування.

При створенні цінного вихідного матеріалу для адаптивної селекції одним із шляхів є залучення в схрещування сортів і форм різного ступеня інтенсивності.

Література

1. Гурьев Б.П., Литун П.П., Гурьева И.А. Методические рекомендации по экологическому сортоиспытанию кукурузы. – Харьков.: 1981. – 32 с.
2. Методика Державного сорто випробування сільськогосподарських культур.- Вип.1.- Київ, 2000. – С. 5 – 100.
3. Ng P.K.W., Scanlon M.G., Bushuk W.A. Catalog of biochemical fingerprints of registered Canadian wheat cultivars by electrophoresis and high-performance bi liquid chromatography // Food Sci. Department, University of Manitoba, Winnipeg. – 1988. № 5. – Vol. 139. – P. 83.

Резюме

В роботі викладені результати вивчення сортів озимої пшениці які різняться за адаптивним, продуктивним, якісним потенціалом та потомств від їх схрещування. Проаналізовані показники продуктивності, стійкості проти вилягання, зимостійкості. Виділені сорти та зновстворені високопродуктивні лінії з підвищеною і високою зимостійкістю.

В статье изложены результаты изучения сортов озимой пшеницы различных по адаптивному, продуктивному и качественному потенциалу и потомств от их скрещивания. Проанализированы показатели продуктивности, устойчивости против полегания, зимостойкости. Выделены сорта и вновь созданные высокопродуктивные линии с повышенной и высокой зимостойкостью.

The paper presents the results of the studies of winter wheat varieties differing in their adaptive, yield producing and qualitative potential and the generations of the crossing. There are analyzed the indices of productivity, lodging resistance, hardiness. There are identified the varieties and newly developed highly productive lines with increased and high winter hardiness.

КВИТКО О.В., МУРАТОВА Е.Н., БАЖИНА Е.В.

Институт леса им. В.Н. Сукачева СО РАН

Россия, 660036, г. Красноярск, Академгородок, e-mail: kvitko_olga@ksc.krasn.ru

КАРИОТИПИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ПИХТЫ СИБИРСКОЙ В СРЕДНЕЙ СИБИРИ

Генетические ресурсы основных лесобразующих хвойных Сибири и Дальнего Востока изучены недостаточно (Ирошников, 1998; Милютин, 1998, 2006). Кариологические исследования являются составной частью изучения генетических ресурсов и необходимы для использования генофонда мирового разнообразия хвойных. За последние годы были проведены обширные кариологические исследования сибирских видов хвойных. Среди них намного лучше изучены представители родов *Pinus*, *Picea* и *Larix*. Среди представителей рода *Abies* изучение кариотипического разнообразия проводилось только для пихты сибирской. Однако, учитывая обширный ареал данного вида, это исследование нельзя считать завершенным, поскольку оно охватывает лишь несколько популяций *A. sibirica* из Казахстана и Сибири (Бударагин, 1972, 1974; Муратова, Матвеева, 1996; Седельникова, Пименов, 2005; Квитко, 2006).

Материалы и методы

Материалом для исследований служили семена пихты сибирской, собранные в пяти популяциях Средней Сибири. Две равнинные популяции расположены в Енисейском (окрестности д. Плотбище, 100 м над ур. м.) и Козульском (ст. Веселая, 300 м над ур. м.) районах Красноярского края. Также в исследование были включены низкогорная популяция из Восточного Саяна (Березовский район, территория заповедника «Столбы», долина р. Каменка, 520-550 м над ур. м.) и две разновысотные популяции из Западного Саяна (Ермаковский район, окрестности пос. Танзыбей, 400 м над ур. м., и окрестности метеостанции «Оленья речка», 1500 м над ур. м.).

Кариологические исследования проводились на меристематических тканях кончиков корешков проросших семян. Предварительная обработка материала, фиксация, окрашивание и приготовление препаратов производились по стандартным для хвойных методикам (Правдин и др., 1972; Муратова, 1995а, б). Проросшие семена предварительно обрабатывали 1% водным раствором колхицина в течение 4-6 ч для разрушения веретена деления и сокращения хромосом. В качестве фиксатора использовали уксуснокислый этанол (3 части 96% этилового спирта и 1 часть ледяной уксусной кислоты). Окрашивание производили 1% ацетогематоксилином в течение 24 ч при комнатной температуре. Перед окрашиванием материал выдерживали в 4% растворе железосамонийных квасцов в течение 10-15 мин. Временные давленные препараты готовили по стандартной методике. Анализ ядрышек в интерфазных ядрах проводился по методике Е. Н. Муратовой (1995б). Окрашивание материала производили 50% раствором азотнокислого серебра (AgNO_3) в течение 5-6 ч при температуре 60°C. После этого корешки промывали водой и готовили давленные препараты стандартным способом в капле 2% ацетокармина. Для подсчета ядрышек анализировали не менее 1000 интерфазных ядер для каждого местопроисхождения.

Для характеристики кариотипа использовали следующие признаки: соматическое число хромосом ($2n$); абсолютную длину хромосом (L^a , мкм); суммарную длину хромосом набора (ΣL^a , мкм); относительную длину ($L^r, \%$ – отношение абсолютной длины хромосомы к суммарной длине набора); центромерный индекс ($I^c, \%$ – отношение абсолютной длины короткого плеча к длине всей хромосомы); локализацию вторичной перетяжки ($sc, \%$ – отношение расстояния от центромеры до перетяжки к длине плеча). Для изучения изменчивости морфометрических параметров хромосом применен метод построения поликариограмм (Павулсоне и др., 1970).

Классификацию хромосом по центромерному индексу производили согласно рекомендациям В. Г. Грифа и Н. Д. Агаповой (1986).

Результаты и обсуждение

В диплоидном наборе пихты сибирской содержится 24 хромосомы ($2n=2x=24$). Во всех изученных популяциях зарегистрированы геномные мутации типа миксоплоидии, такие проростки составляли 9,1-14,6% и содержали единичные тетраплоидные ($2n=48$), триплоидные ($2n=36$) и анеуплоидные ($2n=25, 27, 40$) клетки. Впервые у пихты сибирской был обнаружен случай соматической редукции хромосом: 2 проростка из заповедника «Столбы» содержали единичные гаплоидные ($2n=12$) клетки. Здесь же был обнаружен триплоидный проросток, все клетки которого содержали 36 хромосом. Морфометрический анализ выявил наличие тройного набора морфологических типов хромосом, присущих гаплоидному набору. Вероятно, данное семя сформировалось при слиянии редуцированной и нередуцированной гамет, образовавшейся в результате нарушения мейоза одного из родителей.

Суммарная длина хромосомного набора (ΣL^a) у пихты сибирской варьирует от 250,6 до 459,7 мкм. Изученные популяции характеризуются сходными морфометрическими параметрами хромосом. С помощью поликариограммного метода хромосомы диплоидного набора пихты удалось разделить на четыре группы со сходными параметрами. Длинные метацентрические хромосомы образуют две группы, включающие I-V и VI-VII пары. Наиболее четко эти группы видны на поликариограммах пихты из двух популяций Западного Саяна, на остальных графиках облака точек частично перекрываются. Субметацентрические хромосомы VIII-XII пар более короткие. В пределах данной группы отдельно идентифицируются только две пары хромосом: VIII пара отличается от остальных хромосом более крупными размерами, IX пара выделяется по значению центромерного индекса. Согласно рекомендациям В. Г. Грифа и Н. Д. Агаповой (1986) хромосомы IX пары были классифицированы как интерцентрические. Остальные субметацентрики X-XII пар образуют группу со сходными параметрами.

Полученные данные в целом согласуются с результатами исследований других популяций данного вида (Бударагин, 1972, 1974; Муратова, Матвеева, 1996; Седельникова, Пименов, 2005). Однако были обнаружены некоторые различия. В частности, метацентрические хромосомы I-VII пар во всех работах показаны как гомеоморфная группа со сходными параметрами, VI-VII пары хромосом не выделялись. В кариотипе пихты сибирской из Казахстана выделены только I-VII пары метацентрических и VIII-XII пары субметацентрических хромосом (Бударагин, 1972, 1974). В кариотипе пихты из Томской области отдельно идентифицированы VIII и XII пары хромосом (Муратова, Матвеева, 1996; Седельникова, Пименов, 2005). Отдельно идентифицировать хромосомы XII пары в настоящем исследовании не удалось, поэтому они были включены в группу X-XII.

В качестве дополнительного маркера для идентификации отдельных пар гомологичных хромосом использовались вторичные перетяжки. Исследования показали, что во всех изученных местопроизрастаниях постоянные вторичные перетяжки (с частотой встречаемости более 50%) наблюдались только на метацентрических хромосомах (три в группе I-V и одна в группе VI-VII). Непостоянные вторичные перетяжки с более низкой частотой встречаемости (20-50 %) были отмечены у 1-2 метацентрических хромосом I-V пар. Нуклеолярные субметацентрические хромосомы наблюдались в 26,8-42,1 % метафазных пластинок только в трех популяциях из высокогорья Западного Саяна (район интенсивного усыхания пихты) и заповедника «Столбы» (район техногенного загрязнения). Возможно, в этих популяциях под давлением стрессовых факторов произошла активизация слабых ядрышковых организаторов, что позволило им перейти в разряд основных. Кроме того, отличие горных популяций от равнинных может свидетельствовать о дифференцировке кариотипа пихты сибирской в различных условиях произрастания. Число ядрышек в

интерфазных ядрах в популяциях пихты сибирской из Енисейского, Козульского и Березовского районов варьирует от 1 до 8, в Ермаковском районе - от 1 до 12. Наиболее часто встречались клетки, содержащие 4 и 5 ядрышек, что соответствует количеству постоянных вторичных перетяжек.

В результате исследований по средним значениям абсолютной длины и центромерного индекса с учетом выделенных на поликариограмме групп хромосом и распределения вторичных перетяжек построена сравнительная идиограмма пихты сибирской (рис.). Вторичные перетяжки с частотой встречаемости более 50 % показаны неокрашенным блоком, от 20 до 50 % - черным блоком.

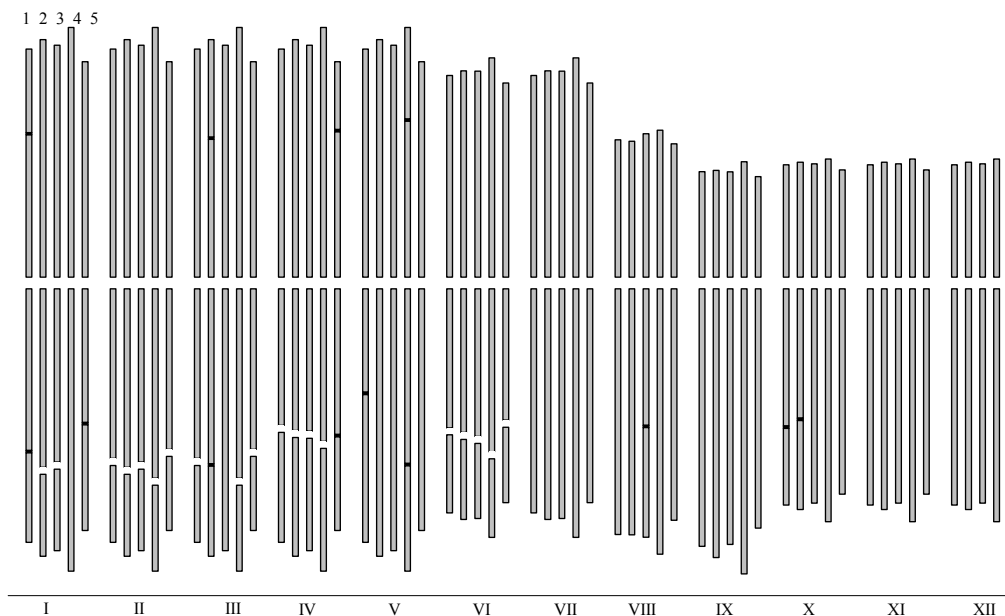


Рисунок. Идиограмма пихты сибирской из Средней Сибири: 1- долина Каменка, Березовский район; 2 – окр. пос. Танзыбей, Ермаковский район; 3 – окр. метеостанции «Оленья речка», Ермаковский район; 4 – окр. д. Плотбище, Енисейский район; 5 – ст. Веселая, Козульский район Красноярского края. I-XII – номера хромосом.

Таким образом, проведенные исследования выявили низкий уровень кариологического полиморфизма пихты сибирской в Средней Сибири, что согласуется с данными, полученными с помощью методов биохимической генетики (Экерт, 2006; Lagionova et al., 2007). Кариотипы изученных популяций различаются по количеству нуклеолярных районов и особенностям их локализации, по числу ядрышек в интерфазных ядрах. Горные популяции характеризуются большим количеством нуклеолярных хромосом, а также увеличением частоты встречаемости геномных мутаций. Наибольшая степень дифференциации отдельных пар гомологичных хромосом в пределах кариотипа установлена в высокогорной популяции пихты из Западного Саяна.

Литература

1. Бударагин В.А. Кариотип пихты сибирской Казахстанского Алтая // Цитология. – 1972. – Т.14, № 1. – С. 130-133.
2. Бударагин В.А. Кариотип пихты сибирской Джунгарского Алатау // Леса и древесные породы Северного Казахстана. – Л.: Наука, Ленингр. отд-ние, 1974. – С. 81-84.
3. Гриф В.Г., Агапова Н.Д. К методике описания кариотипов растений // Ботанический журнал. – 1986. – Т. 71, № 4. – С. 550-553.
4. Ирошников А.И. Состояние и проблемы сохранения генетического фонда древесных пород в лесах России / А. И. Ирошников // Программы сохранения и постоянного воспроизводства лесных генетических ресурсов в новых независимых

- государствах бывшего СССР: М-лы сов. Беловежа, Беларусь. Зволен: Арбора Публицер и Межд. Ин-т раст. генет. ресурсов, Рим, 1998. - С. 37-41
5. *Квитко О.В.* Кариологическое исследование *Abies sibirica* Ledeb. в низкогорье Восточного Саяна // Чтения памяти Л.М. Черепнина. Матер. Четвертой Российской конф. «Флора и растительность Сибири и Дальнего Востока». Краснояр. гос. пед. ун-т. - Т.2. - Красноярск, 2006. - С. 161-165.
 6. *Милютин Л.И.* Лесные генетические ресурсы Восточной Сибири // Программы сохранения и постоянного воспроизводства лесных генетических ресурсов в новых независимых государствах бывшего СССР: М-лы сов. Беловежа, Беларусь. Зволен: Арбора Публицер и Межд. Ин-т раст. генет. ресурсов. - Рим, 1998. - С. 67-69.
 7. *Милютин Л.И.* Лесные генетические ресурсы Северо-Восточной Азии // Лесные экосистемы северо-восточной Азии и их динамика: матер. межд. конф. – Владивосток: Дальнаука, 2006. – С. 208-210.
 8. *Муратова Е.Н.* Кариосистематика семейства *Pinaceae* Lindl. Сибири и Дальнего Востока: Автореф. дис. ... докт. биол. наук. – Новосибирск, 1995а. – 32 с.
 9. *Муратова Е.Н.* Методики окрашивания ядрышек для кариологического анализа хвойных // Ботан. журн. – 1995б. – Т. 80, № 2. – С. 82-86.
 10. *Муратова Е.Н., Матвеева М.В.* Кариологические особенности пихты сибирской в различных условиях произрастания // Экология. – 1996. – № 2. – С. 96-102.
 11. *Павулсоне С.А., Иорданский А.Б., Гиндилис В.М.* 1970. Сравнительно-морфометрический анализ хромосом *Allium cepa* и *A. fistulosum* // Генетика. – 1970. – Т. 6, № 2. – С. 40-55.
 12. *Правдин Л.Ф., Шершукова О.П., Абатурова Г.А.* Кариологические исследования хвойных древесных пород // Научные основы селекции хвойных пород. – М.: Наука, 1972. – С. 45-65.
 13. *Седельникова Т.С., Пименов А.В.* Кариологическое изучение болотной и суходольной популяции пихты сибирской (*Abies sibirica* Ledeb.) // Известия РАН. Сер. биол. – 2005. – № 1. – С. 23-29.
 14. *Экарт А.К.* Эколого-генетический анализ популяций пихты сибирской (*Abies sibirica* Ledeb.): Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Красноярск, 2006. – 20 с.
 15. *Larionova A. Ya., Ekart A. K., Kravchenko A. V.* Genetic Diversity and Population Structure of Siberian fir (*Abies sibirica* Ledeb.) in Middle Siberia, Russia // Eurasian J. of Forest Research. – 2007. – Vol. 10-2. – P. 165-192.

Резюме

Проведено исследование структуры кариотипа пихты сибирской (*Abies sibirica* Ledeb.) в пяти популяциях Средней Сибири. Хромосомный набор ($2n=24$) содержит 7 пар метацентрических (I-V, VI-VII), 4 пары субметацентрических (VIII, X-XII) и 1 пару интерцентрических (IX) хромосом. Постоянные вторичные перетяжки наблюдаются на 4 парах метацентрических хромосом, что соответствует среднему количеству ядрышек в интерфазных ядрах. У пихты сибирской отмечены геномные мутации типа миксоплоидии, обнаружен триплоидный проросток.

The *Abies sibirica* karyotype structure in five populations of Middle Siberia was studied. Chromosome set ($2n=24$) consist of 7 pairs of metacentric (I-V, VI-VII), 4 pairs of submetacentric (VIII, X-XII) and 1 pair of intercentric (IX) chromosomes. The constant secondary constrictions occur in 4 pairs of metacentric chromosomes contain that correspond to average number of nucleoli in interphase nucleus. The genome mutations (mixoploidy) were registered; the triploid seedling of *Abies sibirica* was found.

КИРИЛЕНКО В.В., ГУМЕНЮК О.В., БАСАНЕЦЬ Г.С., КУПЦОВ С.В., ХОМЕНКО С.О.
Миронівський інститут пшениці імені В.М.Ремесла УААН,
Україна, 08853 с. Центральне, Миронівського району, Київської області,
e-mail: mwheats@ukr.net, mironovka@mail.ru

ХАРАКТЕРИСТИКА НОВОСТВОРЕНОГО МАТЕРІАЛУ ПШЕНИЦІ М'ЯКОЇ ОЗИМОЇ НА ПОЛІПШЕННЯ ПОКАЗНИКІВ АДАПТИВНОСТІ У ЛІСОСТЕПУ

Озима пшениця посідає головне місце у структурі площ зернових культур в Україні. Основним фактором, що забезпечує високі і сталі врожаї високоякісного зерна озимої пшениці, є селекційно-генетичне поліпшення культури [1].

Найбільш прогресивним методом захисту рослин є селекція за стійкістю проти основних хвороб. Важливість цього питання пов'язана з тим, що перед людством надзвичайно гостро постали такі проблеми, як захист довкілля та отримання екологічно чистої продукції у обсягах, що забезпечували б зростаючий на неї попит [2,3].

Виходячи з цього метою досліджень було вивчення та створення нового селекційного матеріалу з поліпшеними показниками адаптивності у контрастних за погодними умовами роках.

Матеріали і методи

Дослідження проводили у селекційній сівозміні Миронівського інституту пшениці імені В.М. Ремесла УААН (МІП), з використанням штучного комплексного інфекційного фону (ШКІФ) патогенів.

Погодні умови в роки досліджень (2000-2007 рр.) характеризувалися значними коливаннями кліматичних факторів, близькими до екстремальних, особливо в літній період, які впливали на процеси формування зернівки, наливу зерна, показники якості та розвиток основних патогенів. Так, дефіцит вологи спостерігався у червні 2004 (15,6%), липні 2002 (53,4%) та 2005 (75%) рр. Перезволоження у червні 2002 (262%), липні 2000 (138%) та 2004 (142%) рр. Найменш сприятливим за температурними умовами і запасом вологи (травень, червень відповідно 20%-26% вологи) був 2007 рік, що характеризувався підвищеними денними температурами, особливо у фазу виходу в трубку, колосіння. Поряд з цим опади, що випали у другій та третій декаді червня сприяли поширенню ураження основними збудниками. Природні умови виявляються недостатніми для диференціації ознаки стійкості, тому ключовим моментом фітосанітарного стану селекційної сівозміни є створення ШКІФ патогенів. Прояв даних чинників вплинув на ефективність проведення доборів генотипів у первинних ланках селекції та на формування адаптивних ознак серед ліній на завершальних її етапах.

Фенологічні спостереження проводили згідно з вимогами методики державного сортовипробування сільськогосподарських культур [4]. Створення ШКІФ патогенів та оцінки стійкості проти основних грибних хвороб озимої пшениці здійснювали в усіх ланках селекційного процесу за методичними рекомендаціями [5]. Достовірність отриманих статистичних параметрів та реалізацію потенціалу урожайності оцінювали за Доспеховим Б.О. [6]. За результатами урожайності ліній вираховували статистичні показники: середнє арифметичне (\bar{X}), розмах варіювання (R). Розраховували показники гомеостатичності (Hom) та селекційну цінність (Sc) за В.В. Хангільдіним і М.А. Литвиненком [7]. Коефіцієнт чутливості на умови вирощування (B_1) — за S.A. Eberhart and W.A. Russell (цит. по [8]).

Результати та обговорення

Дослідження були направлені на пошук та залучення генетичних джерел світової колекції для створення нових сортів озимої пшениці та ефективного використання у селекції на поєднання ознак і властивостей (Рис.). Пари для схрещування підбирали так, щоб батьківські компоненти різнилися за стійкістю проти групи патогенів (*E. graminis*, *P. recondita*, *S. tritici*) і мали селекційну цінність для

подальшої роботи. Із даних таблиці 1 випливає, що вагома маса схрещувань проводилась по типу місцевий сорт x місцевий (42%). Це пов'язано з тим,

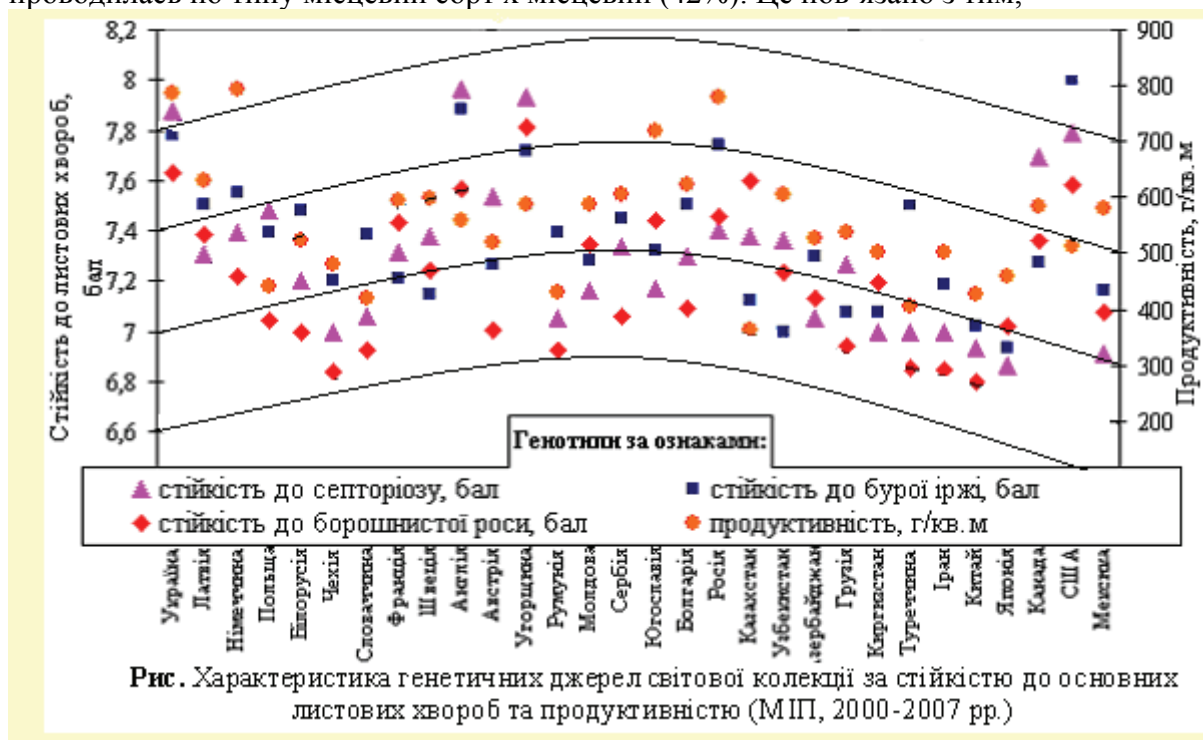


Рис. Характеристика генетичних джерел світової колекції за стійкістю до основних листових хвороб та продуктивністю (МПП, 2000-2007 рр.)

що в останні роки створено генофонд із місцевих зразків у лабораторії (покращені джерела стійкості проти ураження збудниками – створені у відділі захисту рослин (ЗР МПП) та інтрогресивні лінії – у лабораторії генетики пшениці МПП).

Таблиця 1

Характер внутрішньовидових схрещувань пшениці м'якої озимої у різні роки

Батьківський сорт		Число комбінацій по роках, шт.								Всього комбінацій	
♀	♂	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	шт.	%
М	М	149	115	108	129	89	88	28	28	734	42
М	I	16	84	26	28	18	46	26	13	257	15
I	М	54	74	100	117	89	57	20	27	538	31
I	I	12	24	2	25	54	20	44	42	223	12
Всього		231	297	236	299	250	211	118	110	1752	100

М- місцевий сорт, I- інорайонний сорт

Упродовж 1995–2007 рр. у селекції на стійкість нами постійно проводився пошук, виділення та залучення до схрещувань джерел стійкості щодо збудників основних хвороб пшениці з використанням ШКІФ патогенів. Використання ШКІФ патогенів у селекційному процесі дало змогу підвищити результативність при виділенні форм озимої пшениці за стійкістю проти ураження патогенами та за окремими елементами адаптивності. Так, за 12 років (1995–2007) у результаті досліджень ліній озимої пшениці за стійкістю проти ураження збудниками *E. graminis*, *P. recondita* та *S. tritici* кількість форм з груповою стійкістю зростає у конкурсному сортовипробуванні – від 22,7% до 84%, продуктивність їх відповідно з 36% до 54%. У результаті селекційної роботи за стійкістю проти захворювань виділено низку перспективних новостворених ліній та два сорти. Лінії протягом чотирьох років у конкурсному сортовипробуванні суттєво перевищували стандарт за врожайністю, характеризувалися груповою стійкістю проти ураження збудниками основних хвороб пшениці на ШКІФ (проти рас: *P. recondita* – 16, 28, 38, 49, 51, 77, 112, 124, 129, 144, 151; *E. graminis* – 4, 26, 27, 43, 44, 45, 58, 88.) та на штучних роздільних інфекційних фонах (ШРІФ) відділу ЗР МПП. Показники якості зерна – на рівні цінної пшениці (табл. 2).

За статистичними характеристиками новостворені лінії мають кращі показники, ніж у стандарту. Так, лінія Лютесценс 34628 має перше місце за найвищим адаптивним

Таблиця 2

Адаптивна оцінка новостворених ліній пшениці озимої (середнє за 2005-2007 рр.)

Назва лінії та походження	Продуктивність, ц/га	Стійкість проти хвороб, бал						Показники якості зерна		
		борошніст а роса ^{1,2}	бура іржа ^{1,2}	септоріоз ^{1,2}	кореневі гнилі ^{1,2}	фузаріоз ² колосу	ВЖКЯ ³	седимента- ція, мл	„сира” клей- ковина, %	вміст білка, %
Подолянка — St	59,2	5	5	6	6	6	5	70	27,8	13,6
Лютесценс 32345 (Л.Е.г.4/96/Л.Р.р.12/96)	64,1	6	7	7	7	8	7	59	28,2	13,9
Лютесценс 34629 (Р.р. 13/96/Л. 24470)	60,5	6	7	7	9	8	8	67	27,0	14,2
Лютесценс 35280 KM248-22/(Л.с.н.98/88/ /Ер. Т.с.46/89)	61,0	7	7	8	8	9	7	57	26,3	13,2
Лютесценс 32737 (Л.Е.г.4/96/Л.Р.р.12/96)	60,2	6	6	7	8	8	7	65	25,4	13,6
Лютесценс 35397 (Ер. 27564/Л. 20513)	64,0	7	7	7	8	7	6	69	27,6	13,7
Лютесценс 32407 (Напівкарлик3/Oasis)/Мур.62)/Фантазія одеська	62,4	6	6	8	7	7	7	56	27,8	14,0
Лютесценс 34628 (Л. Р.р.13/96/Л. 24470)	65,7	7	7	8	8	7	6	59	25,6	14,0
Лютесценс 32692 (Л.19550/Juwel5)	59,9	6	7	7	7	8	6	60	27,4	13,4
Лютесценс 32450 (Л.Р.р.12/96/Hadm.20581/84)	61,7	6	7	7	7	9	7	59	25,9	13,2
НР _{0,05}	2,3									

1-дослідження на ШКІФ патогенів, 2- на ШРІФ патогенів, 3- на природному фоні.

потенціалом ($Z=6$), добрими показниками адаптивності характеризуються лінії, зокрема Лютесценс 35280 (шосте місце за середньою врожайністю (x), перше – за показником гомеостатичності (Ном) та друге – за селекційною цінністю (Sc) та лінія Лютесценс 32345 (друге, четверте-третє, відповідно). Обчислення суми рангів (Z) за показником урожайності ліній наведено у таблиці 3. Генотипи озимої пшениці володіють високою реалізацією потенціалу урожайності (Р). Її величина в середньому становить 75,7-86,3%. Високою чутливістю до умов вирощування (B_1) характеризуються лінії Лютесценс 35397, Лютесценс 32450, Лютесценс 34629, Лютесценс 32407, Лютесценс 34628 та Лютесценс 32345 ($B_1>1$). Решта ліній менш чутлива до умов середовища, їх краще використовувати на екстенсивному фоні вирощування, де отримуємо максимум віддачі при менших затратах.

Нові сорти Економка та Миронівська сторічна, які передані на Державне сортовипробування (ДСВ), характеризуються високою урожайністю, стійкістю до екстремальних умов вирощування та поліпшеними хлібопекарними якості зерна, що підтверджується проведенням електрофорезу запасних білків (HMW субодиниць глютенінів за локусами *GluA1*, *GluB1*, *GluD1*, представлені аелями *GluA1-b*, *GluB1-c*, *GluD1-d* та HMW субодиниць гліадинів за локусами *GliA1*, *GliB1*, *GliD1*, які представлені наступними аелями *GliA1-4*, *GliB1-1+3*, *GliD1-1*. На сорти видано ІР ім. В.Я. Юр'єва Національним центром генетичних ресурсів рослин України „Свідectво

про реєстрацію зразків генофонду рослин в Україні” на елемент новизни – комплексна стійкість проти ураження збудниками хвороб озимої пшениці.

Таблиця 3

Урожайність і екологічні параметри ліній пшениці озимої (МІП, 2005-2007 рр.)

Лінія	X, ц/га-Z	R-Z	Ном-Z	Sc-Z	Сума Z	B ₁	P ¹ , %
Лют.35397	64,0 - 3	42,5 - 9	248 - 5	30,7 - 4	21	1,08	81,0
Лют. 35280	61,0 - 6	32,0 - 1	294 - 1	34,6 - 2	10	0,82	80,6
Лют. 34629	60,5 - 7	39,3 - 5	221 - 9	28,8 - 8	29	1,06	82,4
Лют. 34628	65,7 - 1	36,3 - 2	268 - 2	35,0 - 1	6	1,01	78,8
Лют. 32737	60,2 - 8	37,0 - 3	241 - 7	30,4 - 6	24	0,92	78,2
Лют. 32692	59,9 - 9	41,9 - 8	251 - 4	28,7 - 9	30	0,98	78,0
Лют. 32450	61,7 - 5	41,7 - 7	231 - 8	29,0 - 7	27	1,07	86,3
Лют. 32407	62,4 - 4	40,3 - 6	246 - 6	30,6 - 5	21	1,03	78,2
Лют. 32345	64,1 - 2	39,1 - 4	256 - 3	32,4 - 3	12	1,03	75,7
НІР ₀₅	2,3						

Висновки

При створенні селекційного матеріалу використовували внутрішньовидову гібридизацію з залученням зразків світової колекції і джерел стійкості з відділу ЗР МІП з послідуочим добором стійких генотипів при використанні ШКІФ патогенів.

Розроблені методи покладено в основу створення нових ліній та сортів озимої пшениці. Нові сорти Економка та Миронівська сторічна передані на ДСВ.

Література

1. Болезни и вредители полевых культур / В.П.Петренко, В.В.Кириченко, Л.И.Чернобай и др. – Харьков, 2001.-78 с.
2. Каталог вихідного матеріалу зернових, зернобобових культур та соняшнику для селекції на стійкість до основних хвороб і шкідників в умовах Лісостепу України / За ред. В.П. Петренкової, В.К. Рябчуна. – Х.: Магда LTD, 2006. – С. 4-9.
3. Оптимізація інтегрованого захисту польових культур (довідник) / За ред. В.В. Кириченка. – Харків, 2006. – С. 3-6.
4. Методика державного сорто випробування сільськогосподарських культур.- К., 2000. – 100 с.
5. Шелепов В.В., Дубовий В.І., Кириленко В.В. та ін. Створення стійких сортів озимої пшениці з використанням комплексних інфекційних фонів патогенів у ланках селекційного процесу: Методичні рекомендації. – К.: Колобіг, 2005. – 25 с.
6. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта. – М.: Агропромиздат, 1985. – 351 с.
7. Хангильдин В.В., Литвиненко Н.А. Гомеостатичность и адаптивность сортов озимой пшеницы // Науч.-техн. бюл. ВСГИ. – Одесса, 1981. – Вып. 39. – С. 8-14.
8. Параметры экологической пластичности сельскохозяйственных растений, их расчет и анализ: Методические рекомендации. – Новосибирск, 1984. – 24 с.

Резюме

Показана ефективність використання внутрішньовидової гібридизації з залученням зразків світової колекції та поліпшених джерел стійкості з послідуочим добором стійких генотипів на ШКІФ патогенів при створення селекційного матеріалу. Розроблені методи покладено в основу створення ліній та сортів озимої пшениці. Сорти Економка та Миронівська сторічна досліджуються на Державному сорто випробуванні.

Показана эффективность использования внутривидовой гибридизации с привлечением генетических образцов мировой коллекции и улучшенных источников устойчивости с последующим отбором устойчивых генотипов на ИКИФ патогенов при создании нового селекционного материала. Разработанные методы положены в основу

создания новых линий и сортов озимой пшеницы. Сорты Экономка и Мыронивська старична исследуются на Государственном сортоиспытании.

It is shown that for creation of new selection material intraspecific hybridization was utilized involving genetic varieties of world collection and improving sources of resistance following selection of resistant genotypes on artificial complex infectious background of some pathogens. The developed methods have been basis creation of new lines and strains of winter wheat. Strains Economka and Myronivs'ka storychna are being under State strain test .

КИСЛОВА Е.А.

*Харьковский национальный университет им.В.Н.Каразина,
Украина, 61077, Харьков, пл. Свободы, 4, e-mail: kislova-lena87@mail.ru*

РАДИОБИОЛОГИЧЕСКАЯ РЕАКЦИЯ ПРОРОСТКОВ ОЗИМОГО РАПСА

Интенсивность морфогенеза определяется клеточными процессами, связанными с активностью меристем. Для понимания сущности тех процессов, которые происходят во взрослом растении под влиянием ионизирующей радиации, необходимо знать основные эффекты и реакции, вызванные облучением, на клеточном уровне. Так как именно дальнейшее развитие растения и характер дифференциации клеток будет определяться особенностями функционирования и процессами, происходящими в клетках образовательной ткани.

Для большинства растений реакция семян на широкий диапазон доз гамма-излучения уже изучена. Рапс в этом отношении остается мало изученным. Учитывая перспективность использования и повышенный в последнее время интерес к этой культуре, представляло интерес проследить на ранних этапах онтогенеза растения его реакции на разные дозы гамма-облучения как на клеточном, так и тканевом уровнях; выяснить возможность стимулирующего эффекта на рост и развитие проростков семян озимого рапса. В качестве меры радиобиологического эффекта были использованы такие параметры как процент всхожести семян, показатель сухого веса и процент делящихся клеток в апикальных меристемах корней проростков.

Материалы и методы

В качестве объекта исследования были взяты семена озимого рапса (сорт Тисменицкий). Среди двудольных растений виды семейства крестоцветных Cruciferae отличаются наиболее высокой радиоустойчивостью семян, при это род Brassica отличается особо высокой радиоустойчивостью. Для семян рапса (*Brassica napus* L. var. *oleifera*) уже установлена полулетальная доза гамма-облучения, при которой рост проростков ингибируется на 50%, составляет 1200 – 1400 Гр (Mei M.T. et al., 1987). Поэтому для облучения семян гамма-радиацией ⁶⁰Со были выбраны дозы 50, 100 и 200 Гр. Контрольные (необлученные) и опытные (облученные) семена проращивали в рулонах фильтровальной бумаги при t=22-23 °С. Одним из показателей ростовых процессов был учет процентов всхожести семян и величины сухого веса проростков. Проявление радиобиологической реакции определяли, сравнивая показатели контроля, принятого за 100%, с показателями в вариантах с облучением. Также учитывали долю делящихся клеток (митотический индекс, МИ) в апикальных меристемах корней проростков на разных этапах фиксации проросших семян, как один из показателей радиобиологической реакции растения на ранних этапах онтогенеза. Для этого проросшие семена фиксировали на 24 (1-ая фиксация), 27 (2-ая), 30 (3-ая), 33 (4-ая), 36 (5-ая), 39 (6-ая) и 51 (7-ая) часах проращивания, и затем определяли показатель МИ в апикальных меристемах корней проростков методом давленных препаратов.

Результаты и обсуждения

В контроле максимальное значение МИ приходилось на последнюю фиксацию (7-ая фиксация) и составляло 3,22%; тогда как при дозе 50 Гр максимальное значение МИ наблюдалось на 6-ой фиксации - 5,3%, а на 7-ой – 3,7%. В среднем МИ 50 Гр по всем фиксациям был выше контроля на 1,08%. Что касается вариантов 100 Гр и 200 Гр, на первых фиксациях, наблюдалось некоторое увеличение МИ в сравнении с контролем (МИ при 100 Гр на второй фиксации 1,4 %, а в варианте 200 Гр – 0,68 %). Максимальные значения при 100 Гр на 6-й фиксации (3,52 %) и на 5-ой при 200 Гр (2,68 %). Затем идет некоторое снижение значения МИ до 7-й фиксации в варианте 100 Гр (1,72 %) и на 6-й в варианте 200 Гр (1,4 %).

Таблица 1

Значения средних митотических индексов (МИ) в контроле и при дозах облучения

№, фиксация	МИ, %	Контроль	50 Гр	100 Гр	200 Гр
1.	$\overline{МИ}_1$	0	$0,18 \pm 0,15$	0	$0,04 \pm 0,06$
2.	$\overline{МИ}_2$	$0,44 \pm 0,21$	$0,76 \pm 0,28$	$1,40 \pm 0,37$	$0,68 \pm 0,26$
3.	$\overline{МИ}_3$	$0,22 \pm 0,15$	$0,88 \pm 0,30$	$1,50 \pm 0,41$	$0,72 \pm 0,27$
4.	$\overline{МИ}_4$	$1,18 \pm 0,34$	$1,70 \pm 0,48$	$1,70 \pm 0,41$	$1,26 \pm 0,35$
5.	$\overline{МИ}_5$	$1,32 \pm 0,36$	$2,36 \pm 0,41$	$2,68 \pm 0,51$	$2,46 \pm 0,50$
6.	$\overline{МИ}_6$	$0,94 \pm 0,92$	$5,30 \pm 0,71$	$3,52 \pm 0,58$	$1,40 \pm 0,37$
7.	$\overline{МИ}_7$	$3,22 \pm 0,56$	$3,70 \pm 0,60$	$1,72 \pm 0,41$	$1,60 \pm 0,40$

Результаты учета всхожести показали, что доза облучения 50 Гр оказывает максимальный стимуляционный эффект (количество проросших семян на 23% выше контроля). Доза 100 Гр оказала меньший стимуляционный эффект (превышение над контролем 19%). При облучении 200 Гр всхожесть снижалась по сравнению с контролем в 2 раза. Показатель сухого веса проростков в варианте 50 Гр был выше контроля на 11%, а в варианте 200 Гр значения сухого веса находились на уровне, близком к контролю.

Как видим, в нашем случае стимулирующий эффект дозы 50 Гр проявляется в повышении интенсивности ростовых процессов, ускорении прорастания семян, увеличении сухого веса проростков. В какой-то мере стимуляционный эффект оказывает и доза 100 Гр, что видно по результатам всхожести и повышению МИ до 6-й фиксации, по сравнению с контролем, но затем идет снижение этого показателя на 7-й фиксации, что на 1,5 % ниже контроля. В то время как на 6-ой и 7-й фиксациях при дозе 50 Гр этот показатель был выше контроля на 4,4 % и 0,5 % соответственно.

Выводы

Одним из важных свойств клеточной меристемы является ее гетерогенность, что проявляется в разной продолжительности митотического цикла у отдельных клеток. Эти изменения числа делящихся клеток, (что выражается в показателях МИ), и темпов деления отражаются на ростовой реакции корня (что в нашем случае определялось показателями процента всхожести и сухого веса проростков). Апекс корня относительно проще организован, чем апекс побега, поэтому его легче использовать для изучения кинетики клеточных популяций в радиобиологических исследованиях.

Изучение динамики роста проростков и процессов клеточного деления на ранних этапах онтогенеза является одним из интегральных показателей метаболизма растений. По результатам исследования можно сделать вывод о стимулирующем эффекте дозы 50 Гр для озимого рапса, как это установлено и для других растений (Шестопалова и др., 1991).

Резюме

Целью работы было выяснение возможности стимуляции роста проростков озимого рапса путем облучения их разными дозами гамма-облучения. При учете процентов всхожести семян, сухого веса проростков и значений митотических индексов у клеток корневых меристем проростков озимого рапса установлен стимулирующий эффект дозы 50 Гр для этого растения.

Головною метою було визначення можливості стимуляції росту проростків озимого ріпаку шляхом опромінення їх різними дозами гамма-випромінювання. За результатами показників процентів проростання, сухої ваги проростків та значень митотичних індексів у клітинах корневих меристем проростків озимого ріпаку показаний стимуляційний вплив дози 50 Гр на цю рослину.

Finding-out of possibility of stimulation of growth of sprouts Brassica napus by an irradiation their different doses of gamma irradiation was the work purpose. At the account of percent come up seeds, dry weight of sprouts and values mitosis indexes of cages root sprouts Brassica napus the stimulating effect of a dose 50 Gr for this plant is established.

¹КОНДРАЦКАЯ И.П., ²СТОЛЕПЧЕНКО В.А.,¹ФОМЕНКО И.И., ²ШИШЛОВА А.М.

¹Центральный ботанический сад НАН Беларуси,

Беларусь, 220012, Минск, ул. Сурганова 2 в, e-mail: ikondratskaya@mail.ru

²Научно-практический центр Национальной академии наук по земледелию,

Беларусь, 222160, Минская обл, Жодино, ул. Тимирязева, 1, e-mail : : izis@tyt.by

БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ПОЛИМОРФИЗМА ЛЕГКОРАСТВОРИМЫХ БЕЛКОВ ПРИ МАРКИРОВАНИИ ХОЗЯЙСТВЕННО- ЦЕННЫХ ПРИЗНАКОВ МЕЖРОДОВЫХ ГИБРИДОВ ОВСЯНИЦЫ ЛУГОВОЙ И ОВСЯНИЦЫ ТРОСТНИКОВОЙ

Самым дешевым и высокопитательным кормом в пастбищный период является зеленый корм, который по химическому составу имеет значительные преимущества перед другими видами кормов благодаря наличию в зеленых листьях каротина, легко усвояемых солей, азотистых веществ. Синтез новых сортов овсяницы тростниковой позволит организовать зеленый конвейер из одновременно созревающих видов и сортов многолетних злаковых трав, обеспечит расширение ареала возделывания овсяницы тростниковой на избыточно-увлажненных и супесчаных почвах и повышение продуктивности среднеспелых пастбищных травостоев. Целью данной работы является создание межвидовых гибридов овсяницы луговой и овсяницы тростниковой (*Festuca pratensis*, *Festuca arundinacea*) с мягкими листьями, которые позволят создавать среднеспелые пастбищные травостои, адаптированные к избыточному увлажнению почв с высокой продуктивностью, хорошим качеством корма и высокой поедаемостью скотом, а также изучить биохимические показатели полиморфизма легкорастворимых белков у отдаленных гибридов и их родительских форм овсяницы луговой и овсяницы тростниковой для маркирования хозяйственно-ценные признаки и биологических свойств растений.

Материалы и методы.

В селекции овсяницы луговой и тростниковой используются следующие методы:

- Индивидуальный, массовый, семейно-групповой и другие виды отбора на анализирующих фонах, в том числе на инфекционном фоне;
- Внутривидовая гибридизация на основе ограниченно-свободного опыления и искусственного скрещивания;
- Межвидовая гибридизация (овсяница луговая X овсяницу тростниковую);
- Методы поликросса для создания синтетических и сложногибридных популяций;
- Метод экспериментальной полиплоидии.

Подбор родительских пар для гибридизации проводится с учетом числа хромосом в сортообразце.

Методом одномерного электрофореза в ПААГе проведен анализ компонентного состава легкорастворимых белков отдаленных гибридов и их родительских форм овсяницы луговой и овсяницы тростниковой. Первый сбор проведен в июле в фазе колошения, второй - в августе после третьего укоса, в фазе молодых отростков.

Результаты и обсуждения.

В селекционном питомнике гибридов F₂, заложенном в 2006 году, проведена селекционная работа и сформированы гибридно-рекомбинантные популяции F₂*R₂ с учетом расщепления по таким важным признакам как мягкость листьев, урожайность зеленой массы, облиственность, интенсивность отрастания весной и после укосов.

Большую ценность по урожайности зеленой массы представляют собой гибриды из комбинации *о.тр. дик. Франция X о.л. Exidion*, отличающиеся мощным развитием и относительно мягкими листьями. В этой комбинации проведен беккросс с целью улучшения показателя мягкости листьев. Работа проведена путем подсаживания растений *о.л. Exidion* к гибридам овсяниц и последующей их изоляцией. Для лучшей завязываемости семян в период цветения проведено механическое доопыление путем встряхивания изоляторов. Такая же работа проведена в комбинации *о.тр. дик. Франция X о.л. Коммерческая Канада*, *о.тр. дик. Архангельская X о.л. Kaunisvaara*, где применение беккросса позволит заменить все гены доноров, кроме одного, контролирующего мягкость листьев. Для почти полного замещения одного гена другим беккроссы проведены с генотипами овсяницы тростниковой, как более ценными формами в пастбищном использовании.

При исследовании популяций наблюдаются различия по форме куста, мощности развития растений и сроках прохождения фенологических фаз. Так в популяции *о.л. Коммерческая Канада X о.тр. дик. Франция* полураскидистая форма куста отмечена у десяти растений, прямостоячая – у двух, раскидистая – у четырех. В то время как основная часть растений этой популяции находилась в фазе выбрасывания флагового листа, у двух растений наблюдалась фаза выметывания. У популяции *о.тр. Hokkai-4 X о.л. Exidion* прямостоячая форма куста наблюдалась у 79 % растений данной популяции и у 21 % растений была полураскидистая форма.

По семенной продуктивности у изученных популяций в сравнении с исходными формами в основном наблюдался гетерозис, кроме гибрида популяции *о.т.дик. Франция X о.л.коммерческая Канада*

Результаты анализа площади листьев гибридов и родителей в фазу флагового листа–начало выметывания показали, что гибриды в основном имеют площадь листьев больше чем площадь листьев родительских форм или совпадает по площади листьев с одной из родительских форм.

Электрофоретическое разделение легкорастворимых белков показало, что основная часть полипептидов у изучаемых отдаленных гибридов овсяницы луговой и овсяницы тростниковой и их родительских форм, собранных в фазе колошения расположена в диапазоне молекулярных масс от 120 до 10 кДа и характеризуются незначительной степенью изменчивости в интенсивности и расположении компонентов на спектрах.

Электрофоретическое разделение легкорастворимых белков отдаленных гибридов овсяницы тростниковой и овсяницы луговой и их родительских форм в молодых листьях собранных в августе после третьего укоса выявило наличие от 24 до 27 белковых компонентов расположенных в диапазоне молекулярных масс (Мм) от 6,0 до 120 кДа. Спектры очень изменчивы и имеют компоненты, расположение или уровень экспрессии индивидуально для некоторых образцов. Высокой степенью полиморфизма по полипептидным спектрам характеризуются почти все изученные образцы, но несмотря на высокую степень изменчивости, выявлена и общая закономерность в интенсивности и расположении компонентов на спектрах.

Анализ гибрида *о.л. Exidion x о.т. Hokkai* и его родительских форм показал высокую гетерогенность и изменчивость спектров. На электрофореграмме изучаемых образцов можно выделить три зоны полипептидов: высокомолекулярные белковые компоненты с Мм от 130 до 60 кДа, среднемoleкулярные с Мм от 60 до 20 кДа и низкомолекулярные – от 20 до 6 кДа. Существенные отличия в полипептидных спектрах отмечены в зоне высоко- и среднемoleкулярных белковых компонентов (рисунок 1). При сравнении полипептидных спектров в комбинации *о.л. Exidion x о.т. Hokkai*, у о. л. Exidion не обнаружены 5 высокомолекулярных полипептида с Мм 105,0; 102,0; 101,0; 90,0 и 89,0 кДа, но выявлены два полипептида с Мм 75,0 и 75,5, которые не обнаружены у гибрида и о.т. Hokkia. В зоне среднемoleкулярных полипептидов выявляется группа из 2 белковых компонента с молекулярной массой 46,5 и 45,5 кДа характерная только для гибрида о.л. Exidion x о.т. Hokkai. Уровень экспрессии полипептида с Мм 47,5 кДа у о.л. Exidion в 2,5 раза ниже, чем у гибрида и в 3 раза, чем у о.т. Hokkia. У о. т. Hokkia и у гибрида отмечен полипептид с Мм 29,0 кДа с высоким уровнем экспрессии, у о. л. Exidion этот полипептид не выявлен, но обнаружены два полипептида с Мм 30,0 и 30,5 кДа, которые не встречаются у гибрида и о.т. Hokkia. Полипептид с Мм 30,0 кДа присутствует как у гибрида, так в родительских формах, но отличается уровнем экспрессии, так у гибрида площадь пика этого полипептида в 3 раза выше, чем у о.т. Hokkia, и в 0,5 раз больше, чем у о.л. Exidion. Овсяница луговая имеет в полипептидных спектрах белковый компонент с Мм 24,0 кДа, который не выявлен у гибрида и о.т. Hokkia. В зоне полипептидных спектров с Мм от 14,4 до 23,0 кДа экспрессии этих белковых компонентов у гибрида и о.т. Hokkia выше, чем у о.л. Exidion. Из полученных данных можно отметить, что гибрид о.л. Exidion x о.т. Hokkai по составу и экспрессии белковых компонентов сходен с овсяницей тростниковой Hokkia, но имеет свои специфические индивидуальные спектры.

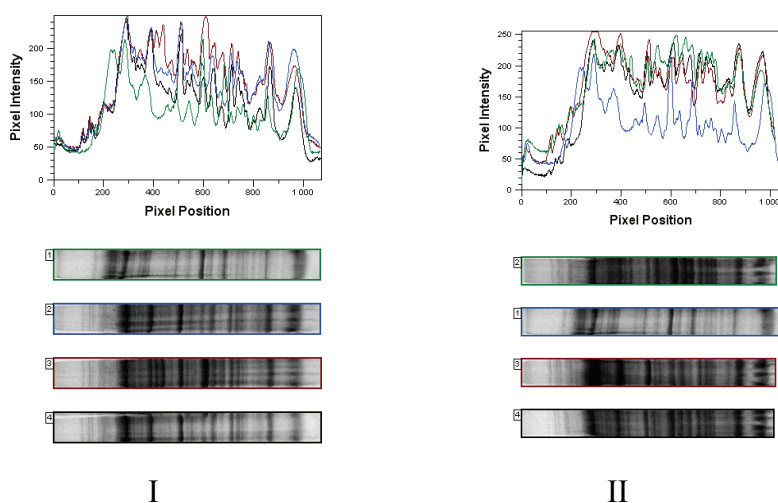


Рисунок 1 – Денситограммы легкорастворимых белков молодых листьев после последнего укоса (август): I - 1- о.л. Edixion (зеленый цвет); 2 – о.т. Hokkia (синий цвет); 3 – гибрид о.л. Exidion x о.т. Hokkai (красный цвет); 4- гибрид о.т. Hokkai x о.л.

Exidion (черный цвет). II - 1 – гибрид о.т.д. Франция х о.л. Exidion (зеленый цвет); 2- о.л. Exidion (синий цвет); 3 - о.т. Франция (красный цвет); 4 –гибрид о.л. Exidion х о.т. Франция

Электрофоретическое исследование гибрида *о. т. д. Франция х о.л. Exidion* и гибрида *о.л. Exidion х о.т.д.Франция* и родительских форм показано значительные изменения в полипептидных спектрах по расположению и интенсивности белковых компонентов, как между родительскими формами, так и между гибридом и родительскими формами (рисунок 1). В полипептидных спектрах о. л. Exidion не обнаружены 5 высокомолекулярных полипептида с Мм 105,0; 102,0; 101,0; 90,0 и 89,0 кДа, которые присутствуют у о. т. д. Франция и гибридов о.т.д.Франция х о.л. Exidion. У о гибридов отсутствует полипептид с Мм 75,0 и 34,0 кДа, однако в полипептидных спектрах гибридов выявлены два полипептида с Мм 46,5 и 45,5 кДа, но не обнаруженные в полипептидных спектрах родительских форм. По уровню экспрессии белковых компонентов отдаленные гибриды *о. т. д. Франция х о. л. Exidion* и *о.л. Exidion х о.т.д. Франция* имеют сходство с родительской формой о.т.д. Франция, отличием является только полипептид с Мм 66,0 кДа, у о.т.д. Франция площадь пика этого полипептида выше в два раза по сравнению с гибридами и в 4 раза с о.л. Exidion.

Анализ электрофоретического разделения легкорастворимых белков *гибридов о. т. д. Франция х о. л. К. Канада* и *о. л. к. Канада х о. т. д. Франция* выявил отличия по количеству и интенсивности белковых полос между отдаленными гибридами, а также и в родительских формах (рисунок 2). С помощью электрофореза выявлено у гибрида *о.л. к. Канада х о.т.д. Франция* 21 белковый компонент, у о.т.д. Франция – 25, у гибрида *о.т.д. Франция х о.л.к. Канада* – 27, у о.л.к. Канада – 23. Гибрид *о.т.д. Франция х о.л.к. Канада* в зоне полипептидных спектров с мМ 52,0 – 54,0; 45,5 – 44,5 и от 34,0 до 19,0 кДа выделен высоким уровнем экспрессии белковых компонентов, а родительская форма о.т.д. Франция имеет высокий уровень экспрессии полипептида с мМ 66,0 кДа. В спектрах отдаленного гибрида о.л. к. Канада х о.т.д. Франция не обнаружено 4 высокомолекулярных полипептида с мМ 105,0; 102,0; 90,0 и 78,0 кДа. На электрофореграмме показано, что отдаленные гибриды имеют два полипептида с мМ 46,5 и 45,5 кДа, родительская форма о.т.д. Франция также имеет эти полипептиды, но уровень их экспрессии значительно ниже, чем у гибридов, а в родительской форме о.л.к. Канада эти полипептиды не обнаружены.

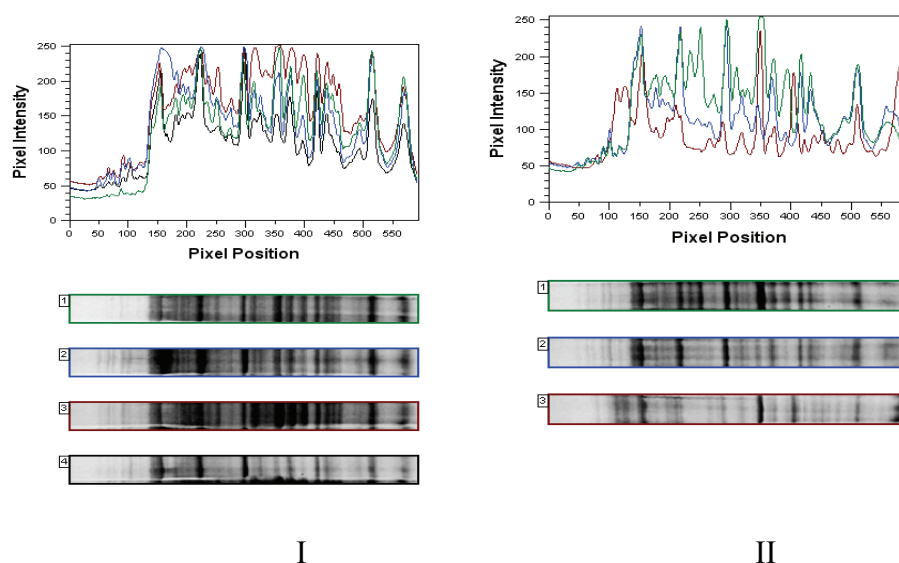


Рисунок 2 – Денситограммы легкорастворимых белков: I - 1 – гибрид о.л.к. Канада х о. т. д. Франция (зеленый цвет); 2 – о.т.д. Франция (синий цвет); 3- гибрид о. т. д. Франция х о.л. к. Канада (красный цвет); 4 – о.л.к. Канада (черный цвет); II - 1– гибрид о.т.д.

Архангельская х о.л. *Kaunisvaara* (зеленый цвет); 2- о.т. д. Архангельская (синий цвет); 3- о.л. *Kaunisvaara* (красный цвет).

При сравнении полипептидных спектров гибрида *о. т. д. Архангельская х о. л. Kaunisvaara* и его родительских форм (рисунок, 2) показано, что отдаленный гибрид о.т.д. Архангельская х о.л. *Kaunisvaara* в своем спектре полипептидов имеет два белковых компонента с мМ 45,5 и 46,5 кДа, которые не обнаружены в родительских формах. В родительской форме о.л. *Kaunisvaara* выявлены два полипептида с мМ 72,0 и 74,0 кДа, но не обнаружены в о.т.д. Архангельская и у гибрида. У отдаленного гибрида и у о.т.д. Архангельская площадь пика полипептида с мМ 40,5 кДа в 2,5 раза выше, чем у о.л. *Kaunisvaara*, полипептид с мМ 30,0 кДа у отдаленного гибрида в 1,5 раза выше, чем у о.л. *Kaunisvaara* и в 3 раза выше, чем у о.т.д. Архангельская.

Выводы. Полученные данные позволяют предположить, что изменчивость по полипептидным спектрам легкорастворимых белков отражает изменчивость в онтогенезе растений. Легкорастворимые белки, выделенные из листьев отдаленных гибридов в фазе колошения близки по составу и интенсивности белковых компонентов. Полипептидные спектры легкорастворимые белки, выделенных из молодых листьев отдаленных гибридов и их родительских форм очень изменчивы и имеют компоненты, расположение или уровень экспрессии индивидуальны и имеют высокой степенью полиморфизма.

Резюме

Методом SDS-гель электрофореза исследован полиморфизм легкорастворимых белков отдаленных гибридов овсяницы тростниковой и овсяницы луговой и их родительских форм. Биохимический анализ легкорастворимых белков выявил значительные изменения, как по уровню экспрессии белка, так и по качественному составу полипептидных компонентов у отдаленных гибридов и их родительских форм. Дана морфологическая характеристика гибридов.

The polymorphism of freely soluble proteins in remote hybrids of *festuca pratensis* and *festuca arundinacea* and their parent forms has been researched using the method of SDS-gel electrophoresis. A biochemical analysis of the freely soluble proteins has shown significant changes in both the level of protein expression and qualitative composition of the polypeptide components in the remote hybrids and their parent forms. A morphophysiological characteristic of the hybrids has been provided.

КОРЗИН В.В.

Никитский ботанический сад - Национальный научный центр, УААН, АР Крым, г. Ялта. 98648, e-mail: KorzinV@rambler.ru

СТЕПЕНЬ САМОФЕРТИЛЬНОСТИ ИНТРОДУЦИРОВАННЫХ НА ЮЖНЫЙ БЕРЕГ КРЫМА СОРТОВ И ФОРМ АБРИКОСА.

Исследования по вопросам самофертильности и перекрёстного опыления у плодовых культур ведутся с конца прошлого столетия. Довольно полный обзор их результатов сделали W. Chandler (1925), В. В. Пашкевич (1930, 1959) и И. Н. Рябов (1930) [7].

По данным зарубежных авторов модель наследования самостерильности и гены, отвечающие за неё, недавно определены, что позволяет сделать подбор родительских генотипов более верным для скрещивания, уменьшить вероятность количества самостерильных семян в потомстве при селекции новых форм абрикоса [2].

Особенности сортов разных эколого-географических групп абрикоса проявляются в различной завязываемости плодов при свободном опылении и опылении

собственной пылью. На основе многолетних данных изучения степени самофертильности сортов абрикоса различных эколого-географических групп К. Ф. Костина (1970) отмечает существенные различия в их поведении: большинство (свыше 88%) сортов европейской группы самофертильны, у среднеазиатских сортов они не превышает 18%, у ирано-кавказских – 6% [4]. Сорты из Северной Америки (“Goldrich”), которые представляют интерес по комплексу признаков, в большинстве своём самостерильные [1]. Отсутствие возможности опыления собственной пылью у американских, среднеазиатских и ирано-кавказских сортов – частое явление в отличие от более молодых по происхождению европейских сортов. По мнению К. Ф. Костиной (1970), признак самостерильности, преобладавший в районах древнего семенного размножения абрикоса, в результате искусственного отбора уступил место более выгодному для человека свойству самофертильности [6; 7].

Степень самоопыления имеет большое значение для продуктивности абрикоса в условиях юга Украины и Крыма, поскольку во время его цветения нередко стоит холодная, ветреная, пасмурная погода. Такая погода препятствует лёту пчёл, а следовательно и опылению. Самофертильные сорта (способные опыляться собственной пылью) менее зависимы от насекомых-опылителей и погодных условий во время опыления цветков, чем сорта, которым для формирования завязи необходима пыльца сортов-опылителей. Так, при перекрестном опылении требуются определенные условия для насекомых-опылителей, и даже попав на рыльце пестика, нужны благоприятные погодные условия, для того чтобы произошло прорастание пыльцы и оплодотворение (ветер, температура, влажность, степень развития пестика). Неблагоприятные климатические условия в фазу цветения и оплодотворения ведут к снижению урожайности и рентабельности производства. Поэтому получение самофертильных сортов является одним из важных направлений при селекции абрикоса [5].

Целью данной работы явилось установление возможности опыления собственной пылью и оплодотворения интродуцированных в Крым сортов и форм абрикоса.

Материалы и методы

Исследования вели в Никитском ботаническом саду (г. Ялта) в 2006-2007 годы. В изучение включены 11 перспективных сортов и форм абрикоса обыкновенного интродуцированных из различных регионов (Европы, Китая, Средней Азии). На коллекционные участки растения были высажены в 1991г.

Проверку пыльцы на жизнеспособность проводили методом проращивания на 10-15-20% растворе сахарозы. Возможность оплодотворения собственной пылью, у интродуцированных сортов и форм выявляли с использованием 2-х способов: 1) опыление цветка без кастрации с изоляцией опыленной ветви дерева марлевым изолятором; 2) принудительное опыление цветков собственной пылью с их кастрацией. Сорт считался самосовместимым, если, по крайней мере, в одном из 2-х лет исследования количество образовавшихся завязей составляло более 5% от всех опылённых цветков. Завязи подсчитывали через 40 суток после опыления. Работа осуществлялась по методике К. Ф. Костиной и Э. Н. Доманской [3].

Результаты и обсуждение

Для изучения самофертильности были отобраны перспективные сорта и формы из 3-х различных эколого-географических групп, главным образом европейской (“Букурия”, “Мельничка Рана”, “Roxana”, “Sulina”, “Cegledi Orias”, “319-757”, “7(2)-2-50”, “LE-132”, “Н-II 5/33”) и в меньшем количестве среднеазиатской (“Лючак Сумбарский”) и китайской (“Да-Хуан-Хоу”).

Определение жизнеспособности пыльцы в 2006г. позволило выявить оптимальные концентрации раствора сахарозы для её прорастания. Лучшими оказались варианты с содержанием сахарозы 15-20%. Наиболее высокая жизнеспособность пыльцы отмечена у сортов: “Да-Хуан-Хоу”, “7(2)-2-50”, “Sulina”, “Мельничка Рана”,

“LE-132” (от 17,66% до 49,39%). В 2007г. строгой закономерности при проращивании пыльцы в растворах с различной концентрацией сахарозы не замечено. Для конкретных сортов и гибридов оптимальная концентрация раствора различна. Лучше всего пыльца проросла у 2-х сортов: “Roxana”, “Sulina” (от 4,77% до 8,78%) и 2-х форм: “7(2)-2-50”, “319-757” (от 4,39% до 8,90%) (Табл.1).

Таблица 1

Жизнеспособность пыльцы новых интродуцированных сортов и форм абрикоса (2006-2007гг.)

№	Сорт, форма	Количество нормально проросших пыльцевых зерен в р-ре сахарозы различной концентрации по годам, %							
		2006		2007		2006		2007	
		10%		15%		20%			
1	Букурия	7,38	5,06	12,25	2,28	8,9	0,69		
2	Да-Хуан-Хоу	23,90	3,62	31,63	2,30	29,78	2,27		
3	LE-132	26,47	1,53	29,61	2,09	20,66	2,23		
4	Лючак Сумбарский	7,10	2,59	4,77	3,15	8,16	2,15		
5	Мельничка Рана	-	2,05	17,66	1,16	24,17	3,17		
6	Roxana	13,42	1,86	23,57	8,78	15,57	5,46		
7	Sulina	27,72	4,77	40,34	3,41	28,0	2,13		
8	Cegledi orias	9,0	-	12,31	4,4	18,54	0,37		
9	Н-II 5/33	10,81	0	12,83	1,29	16,94	1,14		
10	7(2)-2-50	27,57	2,05	44,67	5,26	49,39	8,9		
11	319-757	9,67	4,14	6,86	4,39	6,23	2,14		

Выявлено снижение жизнеспособности пыльцы в 2007г. по сравнению с 2006г., что вероятно обусловлено крайне неблагоприятными климатическими условиями этого года. Так сорта и формы с ранним сроком цветения подверглись действию заморозков во второй половине марта – начале апреля, что привело к частичной или полной гибели хорошо развитых бутонов и распустившихся цветков, и засухе, длившейся со середины марта до начала сентября.

По итогам работы 2006г. установлено, что: “Букурия”, “Да-Хуан-Хоу”, “Мельничка Рана”, “Roxana”, “Sulina”, “Cegledi Orias”, “319-757”, “7(2)-2-50”, “LE-132”, “Н-II 5/33” – являются самофертильными. Количество образовавшихся завязей у них варьировало от 6% до 88%. Сорт “Лючак Сумбарский” оказался самостерильным.

В 2007г. установлено, что: “Н-II 5/33”, “7(2)-2-50” – являются самофертильными (от 11% до 23% образовано завязей), сорта “Cegledi Orias”, “Roxana” и формы – “LE-132”, “319-757” частично самофертильны (от 1% до 3%). Сорта “Букурия”, “Да-Хуан-Хоу”, “Лючак Сумбарский”, “Мельничка Рана”, “Sulina”, оказались самостерильными.

Опыление сорта зависит не только от его генных особенностей, но и от климатических условий и питания растения. В отдельные годы могут наблюдаться морфологические аномалии, состоящие главным образом в отсутствии пыльцы, что приводит к появлению признака самостерильности [1]. Это объясняет появление этого признака в 2007г. у сортов и форм, которые в 2006г. проявили себя как самофертильные (“Букурия”, “Да-Хуан-Хоу”, “Мельничка Рана”, “Sulina”).

Выводы

По итогам двух лет среди изученных интродуцированных сортов и форм абрикоса лучшие результаты по опылению собственной пыльцой и формированию полноценного урожая показали следующие: “Букурия”, “Да-Хуан-Хоу”, “Мельничка Рана”, “Roxana”, “Sulina”, “319-757”, “7(2)-2-50”, “LE-132”. Частичную

самофертильность проявили сорт “Cegledi Orias” и форма “Н-II 5/33”. “Лючак Сумбарский” без перекрёстного опыления завязей не образует.

При проращивании пыльцы на искусственной среде достоверных различий между вариантами не обнаружено. Для конкретных сортов и гибридов оптимальная концентрация раствора различна.

У сортов “Букурия”, “Да-Хуан-Хоу”, “Мельничка Рана”, “Sulina” при опылении собственной пыльцой завязывание плодов не происходит в годы с неблагоприятными климатическими условиями.

Для использования в дальнейшей селекции и производстве представляют интерес сорт “Roxana” и форма “7(2)-2-50”, которые проявили признак самофертильности на протяжении всего времени изучения.

Литература

1. Audergon J. M., Guerriero R., Monteleone P., Viti R. Contribution to the study of inheritance of the character self-incompatibility in apricot. // International symposium on apricot culture, Veria-Makedonia, Greece, 25-30 May, 1997. – Volume 1. — p. 275-279.
2. Burgos L., Perez-Tornero O. Review of self-incompatibility in apricot // International symposium on apricot culture, Veria-Makedonia, Greece, 25-30 May, 1997. – Volume 1.– p. 267-271.
3. Костина К. Ф., Доманская Э. Н. Опыт по самоопылению абрикоса // Доклады «ВАСХНИЛ», 1956.- Вып. 5. — с. 12-14.
4. Костина К. Ф., Горикова Г. А. К вопросу о самоопылении абрикоса. // Ж.: Сельскохозяйственная биология, 1976. – июль – август. - №4. — с. 612-613.
5. Лагутова Е. И. Стерильность пыльцы и самоплодность абрикоса различных эколого-географических групп // Бюл. Никит. ботан. Сада, 1987. - Вып. 64. - с. 102-106.
6. Морилян Э. С. Опыление и оплодотворение стандартных и малораспространенных сортов абрикоса // Известия сельскохозяйственных наук. - Ереван, 1984. - №6. -с. 30-31.
7. Смыков В. К. Биология яблони и абрикоса и принципы формирования промышленных сортиментов // Кишинев. – Издательство «ШТИИИИЦА», 1978. – 163с.

Резюме

Визначено ступінь самофертильності 11 сортів і форм абрикоса звичайного з трьох еколого-географічних груп, інтродукованих на Південний берег Криму. Серед вивчених зразків виділені як самофертильні: сорти “Букурія”, “Да-Хуан-Хоу”, “Мельничка Рана”, “Roxana”, “Sulina”; форми “319-757”, “7(2)-2-50”, “LE-132”. Частково самофертильність виявлено у сорту “Cegledi Orias” і форми “Н-II 5/33”. “Лючак Сумбарський” без перехресного запилення зав'язей не утворює.

Определена степень самофертильности 11 сортов и форм абрикоса обыкновенного из трёх эколого-географических групп интродуцированных на Южный берег Крыма. Среди изученных образцов выделены как самофертильные: сорта “Букурия”, “Да-Хуан-Хоу”, “Мельничка Рана”, “Roxana”, “Sulina”; формы “319-757”, “7(2)-2-50”, “LE-132”. Частичную самофертильность проявили сорт “Cegledi Orias” и форма “Н-II 5/33”. “Лючак Сумбарский” без перекрёстного опыления завязей не образует.

The degree of self-compatibility of 11 apricot cultivars and forms belonging to three eco-geographical groups are presented. Among the investigated samples have been selected as self-compatibility: "Bukuria", "Da-Huan-Hou", "Melnichka Rana", "Roxana", "Sulina", "319-757", "7-2-50", "LE-132"; as self-compatibility: "Luchak Sumbarskiy". Partial of self-compatibility have shown a cultivar “Cegledi Orias” and the form “Н-II 5/33”.

КОРНЄЄВА М.О.¹, МАЗУР З.О.², РАДЧЕНКО В.П.¹

¹Інститут цукрових буряків УААН

Україна, 03141, Київ, вул.Клінічна,25, E-mail:isb@isb kiev.ua

²Верхняцька дослідно-селекційна станція

Україна, 20022, Черкаська область, Христинівський район, с.Верхнячка

АДАПТАЦІЙНА ЗДАТНІСТЬ ГІБРИДІВ ОЗИМОГО ЖИТА, СТВОРЕНИХ НА ОСНОВІ ЦИТОПЛАЗМАТИЧНОЇ ЧОЛОВІЧОЇ СТЕРИЛЬНОСТІ

Створення високопродуктивних ЧС гібридів озимого жита – необхідний етап у роботі селекціонера. Проте необхідно вдосконалювати також і підходи до всебічного їх вивчення щодо адаптаційного потенціалу в різних умовах вирощування.

Вивчення екологічної пластичності і стабільності експериментальних ЧС гібридів озимого жита має велике значення не лише для теоретичних досліджень, а й для практичної селекції [1], оскільки “генотип – середовище” взаємодії можуть бути рівноцінними фактором у формуванні гетерозису [2].

Різні гібриди в різних еколого- кліматичних зонах характеризуються неоднаковою пластичністю: одні виявляють більш стабільні показники продуктивності, інші – суттєво реагують на зміну умов середовища. Різну реакцію гібридів на зміну умов середовища зв'язують, як правило, з відмінностями в їх гомеостазі [3]. Тому при прогнозуванні “поведінки” перспективних гібридів в різних еколого- кліматичних зонах необхідно знати не тільки генетичну детермінацію утилітарних ознак, а й показники генотип–середовищних взаємодій і зв'язані з ними типи реакції на зміни умов довкілля.

Матеріали і методи

У досліді брали участь 16 материнських форм, які були виділені за врожайністю, стерильністю та за комбінаційною здатністю. Це -материнські компоненти ЧС-18 х ЗС-7, ЧС-14/4, ЧС-16/3, ЧС-16 х ЗС-6, ЧС-16 х ЗС-8, ЧС-13/3, ЧС-13/4, ЧС-13 х ЗС-1, ЧС-13/8, ЧС-20 х ЗС-6, ЧС-20 х ЗС-8, ЧС-21 х ЗС-6 та ЧС-21/7, ЧС17/7, ЧС 14/6, ЧС 24/4. В якості відновлювачів фертильності до схрещування були залучені 5 фертильних сортів-популяцій Picasso, Farino, Веселоподолянське крупнозерне, Велидень, Верхняцьке-94. Одержано 80 гібридних комбінацій топкросного типу, які однаковим набором випробовувалися у трьох екологічних зонах: зоні нестійкого зволоження (ДСС 1), зоні достатнього зволоження (ДСС 2) і зоні недостатнього зволоження (Інститут рослинництва, м.Харків).

Експериментальні дані врожайності, одержані у польовому досліді, подано у перерахунку на ц/га. Стандартом слугував районований ЧС гібрид озимого жита Інституту рослинництва ім.В.Я.Юр'єва «Первісток», який у різних екологічних зонах проявив врожайність 43,75.....59,30 ц/га, що свідчить про взаємодію із середовищем.

У процесі топкросних схрещувань отримано 80 сортолінійних ЧС гібридів.

Результати та обговорення

Дисперсійний аналіз показав, що між досліджуваними сортолінійними ЧС гібридами відмінності за врожайністю є істотно доведеними і вони обумовлені як генотипом (фактор А), так і зоною вирощування (фактор В), а також їх взаємодією. В усіх випадках $F_{\text{факт.}} > F_{\text{теорет.05}}$ (табл..1).

Таблиця.1

Дисперсійний аналіз продуктивності сортолінійних гібридів у різних екологічних зонах.

Джерела дисперсії	Сума квадратів	Ступінь свободи	Середній квадрат	F – критерій Фішера	
				фактичне	Теоретичне
Варіанти	129077,383	242	533,378*	8,60	1,00
Повторення	1020,655	1	1020,655*	1,64	3,84

Гібриди(факторА)	33509,125	80	418,864*	6,76	1,32
Зони вирощування (фактор В)	57445,355	2	28722,678*	463,29	3,00
Взаємодія (А x В)	38122,902	160	238,268*	3,84	1,00
Помилка	15003,424	242	61,998		
Загальна	145101,469	485			

* – є достовірні відмінності на 5% рівні

На фенотипове вираження ознаки врожайності зерна найбільший вплив виявили зони вирощування $F_{\text{факт.}} = 463,29 > F_{\text{теорет.}} = 3,00$. Взаємодія компонентів і генотип гібрида також мали вплив на загальну мінливість ознаки продуктивності. Вони були також суттєвими – відповідно $F_{\text{факт.}} = 3,84 > F_{\text{теорет.}} = 1,00$ та $F_{\text{факт.}} = 6,76 > F_{\text{теорет.}} = 1,32$.

Структура мінливості ознаки продуктивності у сортолінійних ЧС гібридів озимого жита наведена на рис.1.

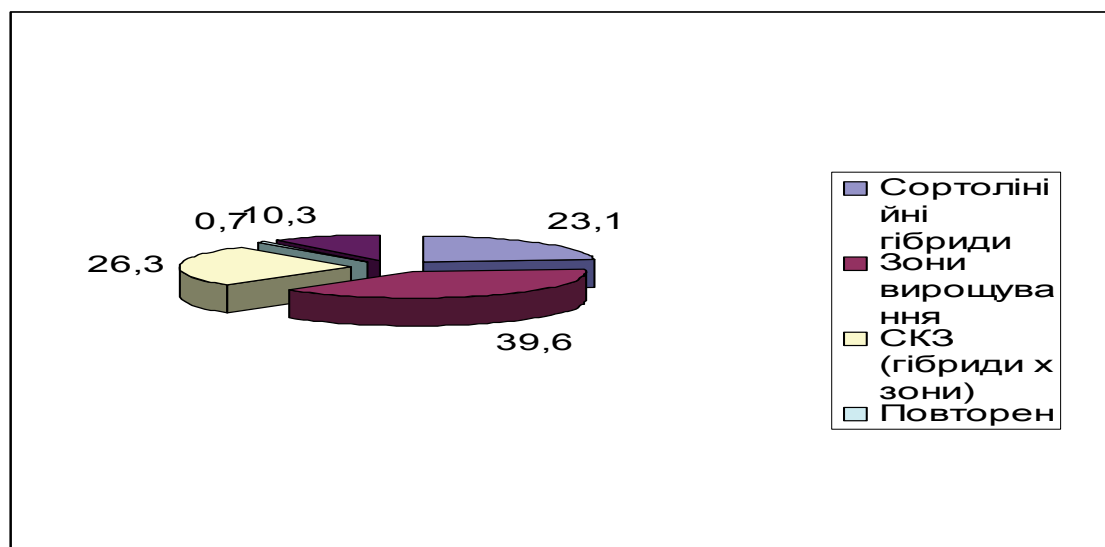


Рис. 1. Структура мінливості ознаки продуктивності сортолінійних гібридів озимого жита.

Вплив сортолінійних гібридів складав 23,1%, зон вирощування був найбільший і складав 39,6%. Це свідчить про те, що велике значення має середовище, в якому випробовуються гібриди. Взаємодія компонентів складала 26,3%.

Істотність відмінностей між одержуваними сортолінійними ЧС гібридами дозволила виявити генетичну цінність кожної із комбінацій схрещування в конкретних природно- кліматичних умовах..

Ефекти генотип-середовищних взаємодій сортолінійних ЧС гібридів, тобто загальна і специфічна адаптаційна здатність (ЗАЗ і САЗ), подано в таблиці 2.

Достовірно від'ємні значення САЗ в конкретних зонах показують негативний вплив цих взаємодій, тобто генетично обумовлений потенціал продуктивності даного гібрида не буде виявлений у цій зоні. І, навпаки, позитивні значення САЗ сприятимуть підвищенню її значень. За даними Aastveit K, позитивні генотип-середовищні взаємодії є одним із чинників формування гетерозисного ефекту ЧС гібриду, виявленого в певній зоні. Значення ЗАЗ показують середню цінність взаємодій “генотип-середовище” по кожному із гібридів в трьох зонах.

Ефекти взаємодії сортолінійних ЧС гібридів озимого жита із середовищем (ЗАЗ та САЗ), 2007р.

Номер ділянки	ЧС аналоги	Ефекти взаємодії (САЗ)			Ефекти ЗАЗ сортолінійних гібридів
		ДСС 1	ДСС 2	ІР 3	
Запилювач Picasso					
3	ЧС-16 x ЗС-6	1,35	-1,26	-0,09	-17,41*
5	ЧС-16 x ЗС-8	-7,20*	7,74	-0,54	-6,41*
1	ЧС 13/3	-10,17	-9,97	20,14*	9,00*
9	ЧС 13/8	18,20*	-10,86	-7,34	5,69
10	ЧС-20 x ЗС-6	12,67*	-7,74	-5,13	1,22
7	ЧС-20 x ЗС-8	6,27	-20,90*	14,62*	3,27
Запилювач Farino					
14	ЧС 14/4	-2,63	-9,54	12,17*	-0,88
26	ЧС 16/3	-15,67*	10,88	4,79	14,90*
13	ЧС 13/3	-19,98*	-2,04	22,02*	1,32
12	ЧС-13 x ЗС-1	-1,80	13,19*	-11,39*	-17,16*
20	ЧС13/8	9,53	8,38	-17,91*	-7,15*
17	ЧС-20 x ЗС-6	-10,40	-10,11	20,51*	2,34
21	ЧС-21 x ЗС-6	-12,42*	-0,07	12,49*	-9,30
22	ЧС 21/7	5,52	-7,84	2,32	12,27*
Запилювач Веселоподолянське крупнозерне					
28	ЧС 13/8	17,70*	3,34	-21,04*	-5,51
36	ЧС-20 x ЗС-8	-7,75	19,44*	-11,69*	14,44*
Запилювач Велитень					
44	ЧС 14/4	7,42	9,66	-17,08*	5,22
58	ЧС 16/3	-0,48	4,61	-4,13	-10,58*
41	ЧС 13/8	11,72*	4,56*	-16,28*	9,47*
46	ЧС-20 x ЗС-6	-8,10	-4,21	12,31*	-5,06
53	ЧС-21 x ЗС-6	-0,89	7,24	-6,34	-1,11
54	ЧС-21/7	0,75	9,64	-10,39	-10,41
Запилювач Верхняцьке 94					
74	ЧС-18 x ЗС-7	5,67	-5,79	0,12	8,27*
61	ЧС 14/4	1,22	5,16	-6,38	-18,53*
65	ЧС-20 x ЗС-6	-3,37	-12,92*	16,29*	4,90
72	ЧС 21/7	-4,27	-2,12	6,39	14,15*

* ефекти істотні на 5-ти % рівні значущості

Так, гібрид ЧС 13/3 x Picasso має істотно високий ефект ЗАЗ, характеризується достовірно високим ефектам генотип-середовищної взаємодії (САЗ) у зоні недостатнього зволоження (ІР 3). У цій же зоні на гібриди з високою ЗАЗ (ЧС 13/8 x Велитень, ЧС20/8 x Веселоподолянське крупнозерне) недоброеприятливо впливало середовище. На потенціальну продуктивність гібридів ЧС 21/6 x Farino, (ЧС 20 x ЗС6) x Велитень зона вирощування також мала позитивний вплив, хоча ефекти ЗАЗ у них були від'ємними.

У зоні нестійкого зволоження (ДСС 1) достовірно високі позитивні ефекти генотип-середовищних взаємодій (САЗ) виявили гібриди комбінації за участю материнських компонентів ЧС 20 x 6, ЧС 13/8 і сорту Picasso. Зона нестійкого зволоження виявила добрий потенціал продуктивності також у гібриду ЧС13/8 x ВП

круп. (+17,7*). У цій зоні погано проявили себе всі гібриди, створені за участю сорта Farino та В-94, оскільки позитивних взаємодій не виявлено.

У зоні достатнього зволоження (ДСС 2) добру взаємодію із умовами довкілля показав лише один гібрид, створений за участю сорта Farino. Це – гібрид (ЧС-13 х ЗС-1) х Farino, у якого ефект САЗ становив +13,2*. Подібним чином проявили себе у цій зоні по одному гібриду, створеному на основі запилювачів сортів Веселоподолянське крупнозерне та Велитень. Це гібриди (ЧС-20 х ЗС-8) х Веселоподолянське крупнозерне та ЧС 13/8 х Велитень з відповідними ефектами САЗ +19,4* та +4,6*. Для всіх гібридів на основі сорту В-94 ця зона несприятлива підвищенню продуктивності, – обумовленому позитивними ефектами генотип х середовищних взаємодій.

В цілому, найкращою еколого- кліматичною зоною для 80 гібридів, створених на основі схрещування однакового набору материнських компонентів з п'ятьма сортами по типу топкрос, виявилася зона ІР 3 (зона недостатнього зволоження) . Ефект самої зони оцінювався величиною +12,4* і був істотно високим.

Висновки

Таким чином, необхідно визнати, що характеристика перспективних гібридів буде більш повною, якщо враховувати інформацію по генотип-середовищним взаємодіям. Такий підхід дасть можливість використовувати адаптаційний потенціал гібридів як складову гетерозису і зумовить правильне розміщення нових гібридів згідно еколого- кліматичних зон з метою їх раціонального використання.

Література

1. Корнеева М.О., Николаенко Н.В., Лищитович Л.И. Экологическая оценка продуктивности селекционных номеров сахарной свеклы // Сельскохозяйственная биология. – 1987. – № 9 – С.18-23.
2. Aastveit K., Heterosis and selection in barley // Genetics, –1964. – Vol. 49, №1. – P. 17-27.
3. Пакудин В.З., Лопатина Л.М. Методика оценки экологической пластичности сортов сельскохозяйственных растений // Итоги работ по селекции и генетике кукурузы. – Краснодар, 1979. С.113-121.

Резюме

На основі екологічного сорто випробування 80 гібридних комбінацій озимого жита, створених з використанням цитоплазматичної чоловічої стерильності, вивчена загальна і специфічна адаптаційна здатність гібридів, випробуваних у трьох зонах: нестійкого зволоження, достатнього зволоження і недостатнього зволоження. Генотип-середовищні взаємодії є повноцінним фактором у розкритті генотипово обумовленого гетерозису гібридів.

На основе экологического сортоиспытания 89 гибридных комбинаций озимой ржи, созданных с использованием цитоплазматической мужской стерильности, изучена общая и специфическая адаптационная способность гибридов, испытанных в трех зонах: неустойчивого увлажнения, достаточного увлажнения и недостаточного увлажнения. Генотип-средовые взаимодействия – полноценный фактор в раскрытии генотипически обусловленного гетерозиса у гибридов.

On the basis of ecological variety trials of 80 hybrid combinations of winter rye developed with the use of CMS, general and specific adaptation abilities of hybrids, tested in three zones – (insecure, sufficient and insufficient moistening), were studied. Genotype-environment interaction is a valuable factor in detecting genotypically caused heterosis of hybrids.

КОСЕНКО І.С., ОПАЛКО О.А., ГОРОБЕЦЬ Н.В.

Національний дендрологічний парк “Софіївка” НАН України, вул. Київська, 12 а, м. Умань, Черкаська обл., 20300, Україна, e-mail: sofievka@ck.ukrtel.net

НЕМОРФОГЕННА РЕГЕНЕРАЦІЙНА ЗДАТНІСТЬ ПРЕДСТАВНИКІВ РОДУ *CORYLUS* L.

Серед багатьох способів реагування рослин на коливання зовнішніх і внутрішніх умов одне з провідних місць займає їхня здатність до регенерації. Механічні травми, так само, як і інші місцеві пошкодження, супроводжують усі рослини, а особливо багаторічні, впродовж усього життя. Тому в процесі еволюції у них виробились пристосувальні механізми захисту від травм, тобто здатність до гоєння. [2]. Відновлення цілісності травмованого організму і його функцій називають регенерацією, а спроможність рослини загоювати рани, які виникають при травмуванні її органів оцінюють за їхнім регенераційним потенціалом [9]. Один з найбільш відомих у минулому сторіччі дослідників явища регенерації М.П. Кренке (1950) підкреслював значення регенераційних потенцій для успіху вегетативного розмноження рослин [6].

Регенераційні процеси у рослин відбуваються під впливом багатьох чинників. Це перш за все філогенетичні особливості, які у найбільш концентрованому вигляді можуть бути узагальнені в спадкових особливостях (генотипі) кожного виду, різновиду, форми чи сорту. З іншого боку, надзвичайно велике значення мають онтогенетичні особливості конкретної особини, її фізіологічний стан, а також ендогенні й екзогенні чинники [1, 6].

Рід *Corylus* L. (ліщина), який об'єднує близько 20 видів, поширених у помірній зоні Євразії та Північної Америки, є важливим елементом широколистяних та хвойно-широколистяних лісів цієї кліматичної зони. Деякі з них культивують ще з античних часів у Середземномор'ї. Проте більшість з них з'явилася в Україні у ХХ ст. в колекціях ботанічних садів. Вирішальним фактором у природному поширенні ліщини у минулому та підтриманні її популяції у наш час є те, що види ліщини — горіхоплідні рослини, і їхні плоди є кормовою базою багатьох видів лісової фауни, а також здавна використовувались людиною у її харчуванні [4]. З виникненням декоративного садівництва ліщина стала широко використовуватись у паркових насадженнях. Дібрано низку цікавих декоративних форм, що застосовують для створення мальовничих рослинних композицій у парках і скверах. Давно відоме значення ліщини для лісового господарства як ґрунтополіпшувальної породи [4].

Біологічна і господарська цінність представників роду *Corylus* L., а також важливість вивчення регенераційних процесів у рослин для вибору технології розмноження, в тім числі мікроклонального [5], і планування операцій догляду спонукали проведення наших досліджень.

Методика досліджень

Для вивчення динаміки регенераційного потенціалу семи генотипів (видів і форм) роду *Corylus* L. (*C. avellana* L. '*Fuscorubra*', *C. avellana* L. '*Heterophylla*', *C. avellana* L. '*Pendula*', *C. colyrna* L., *C. maxima* Mill., *C. maxima* Mill. '*Atropurpurea*', *C. pontica* C. Koch) на однорічних приростах минулого року протягом сезону робили надрізи завдовжки 10–12 мм і завширшки 1,5 мм спеціально виготовленим різцем [9]. У місці вирізування ділянки периферійних тканин на пагоні формувався калюс. Інтенсивність калюсогенезу оцінювали за 9-бальною шкалою. При цьому в 1 бал оцінювали об'єкти, на яких формування калюсу не відбувалось або його поверхня не перевищувала 5 % ранки; 2 бали — ті, де калюс займав 5,1–12,5 %, 3 бали — 12,6–25,0 %, 4 бали — 25,1–37,5 %, 5 балів — 37,6–50,0 %, 6 балів — 50,1–62,5 %, 7 балів — 62,5–75,0 %, 8 балів — 75,1–87,5 %, 9 балів отримували об'єкти з площею калюсу від

87,5 до 100 % відповідно. Перше поранення робили на початку третьої декади березня, друге — на початку другої декади квітня, а наступні — щодаки.

Регенераційний коефіцієнт розраховували за розробленою О.А Опалко [7–9] формулою:

$$R = \frac{S^2}{n_1 + n_2},$$

де R — регенераційний коефіцієнт;

S — інтенсивність калюсогенезу;

n_1 — кількість діб від поранення до появи перших ознак калюсу;

n_2 — кількість діб від поранення до завершення або припинення розвитку калюсу.

Результати і обговорення

Результати досліджень посттравматичної регенераційної здатності представників роду *Corylus* (табл.) показали, що в середньому за сезон регенераційний коефіцієнт найвищим був у *C. pontica* з відповідним показником 1,61.

Таблиця

Інтенсивність неморфогенного калюсогенезу представників роду *Corylus* L. залежно дати поранення

Дата поранення	Регенераційний коефіцієнт						
	<i>C. avellana</i> 'Fuscorubra'	<i>C. avellana</i> 'Heterophylla'	<i>C. avellana</i> 'Pendula'	<i>C. colurna</i>	<i>C. maxima</i>	<i>C. maxima</i> 'Atropurpurea'	<i>C. pontica</i>
21.03	1,12	1,35	0,79	1,50	1,58	0,91	1,28
2.04	1,47	0,89	1,25	1,45	1,42	1,12	1,50
13.04	1,62	0,96	1,05	1,23	1,02	0,50	1,58
23.04	1,76	1,65	1,10	0,27	1,08	1,84	1,93
3.05	1,64	1,96	1,41	0,81	2,02	0,38	1,88
14.05	2,20	3,37	2,03	1,84	2,13	0,56	0,65
23.05	2,56	2,53	2,02	2,03	2,02	1,39	2,02
4.06	2,25	2,79	1,98	1,98	1,98	1,35	1,97
12.06	1,44	1,98	1,62	0,63	2,70	0,07	2,45
22.06	2,13	1,65	1,20	0,79	1,35	0,09	1,88
4.07	1,17	1,69	1,24	0,94	1,24	0,02	1,72
16.07	1,80	1,65	1,65	1,17	1,69	2,38	1,92
25.07	1,53	1,72	1,92	0,78	2,02	1,53	1,52
9.08	0,47	0,05	2,02	0,80	2,31	0,10	2,38
27.08	0,21	0,04	0,25	0,09	0,12	0,02	1,03
11.09	0,02	0,01	0,07	0	0,01	0	0,01
Середнє	1,46	1,52	1,35	1,02	1,54	0,77	1,61
Дисперсія	0,59	0,93	0,37	0,40	0,55	0,57	0,39
Коефіцієнт варіації	52,60	63,45	45,29	61,62	47,94	98,14	38,88

Дещо нижчим регенераційним коефіцієнтом характеризувались *C. maxima* — 1,54 і *C. avellana* 'Heterophylla' — 1,52. Найменшим у досліді був середній регенераційний коефіцієнт *C. maxima* 'Atropurpurea' — 0,77.

Терміни поранень, за яких регенераційний коефіцієнт був близький або перевищував 2,0, у більшості вивчених видів і форм *Corylus* припадали на період з другої декади травня до другої декади червня. При цьому у *C. maxima* період з

порівняно високим регенераційним потенціалом тривав найдовше — з третього травня до 12 червня, коли досягнув свого максимуму — 2,7 одиниці регенераційного коефіцієнта. Крім того, після певного зниження його показників до 1,24–1,69 регенераційний коефіцієнт цього виду знову досягнув значень 2,02 і 2,31 відповідно 25 липня і 9 серпня.

З запізненням на одну декаду період з найвищою регенераційною здатністю настав у *C. colyrna* і *C. pontica*. У *C. colyrna* він був одним з найкоротших: з 23 травня до 4 червня (з відповідним регенераційним коефіцієнтом 2,03 і 1,98). У *C. pontica* регенераційні коефіцієнти 23 травня, четвертого і 12 червня становили відповідно 2,02; 1,97 і 2,45 одиниці. Після незначного зниження до 1,52–1,92 протягом 22 червня–25 липня регенераційний коефіцієнт *C. pontica* знову підвищився при пораненні 9 серпня до 2,38 одиниць. Повторна активізація регенераційних процесів при виконанні надрізів 9 серпня спостерігалась і у *C. avellana* 'Pendula'. У цей час її регенераційний коефіцієнт становив 2,02 одиниці.

У *C. avellana* 'Fuscorubra' після підвищення регенераційного потенціалу в період 14.05–4.06 до 2,20–2,56 одиниць регенераційного коефіцієнта, спостерігали короткочасне зниження його до 1,44 одиниці і повторну активізацію 22 червня до 2,13 одиниць. Не спостерігали повторної активізації регенераційних процесів у другій половині літа у *C. avellana* 'Heterophylla', однак саме у цієї форми при виконанні надрізів у другій декаді травня був найвищий показник регенераційного коефіцієнта у досліді — 3,37 одиниць. Період, коли регенераційний коефіцієнт близький або більший 2,0, найкоротшим виявився у *C. maxima* 'Atropurpurea'. Показник 2,38 одиниці регенераційного коефіцієнта було досягнуто лише в один термін поранення — 16 липня. Після 9 серпня, а у деяких видів і форм навіть дещо раніше, наставало різке зниження регенераційної активності, яке на початок другої декади вересня досягнуло нульового показника.

Загалом, аналізуючи результати вивчення регенераційного потенціалу досліджених видів і форм роду *Corylus*, слід відмітити нижчі показники регенераційного коефіцієнта, порівняно з аналогічними дослідженнями, виконаними з видами, формами, сортами і клоновими підщепами яблуні [7, 8]. Можливо, саме цим можна пояснити і не досить високий відсоток приживання щеплень ліщини [3, 4], який для різних форм *C. avellana* і різних способів щеплення становив від 0,4 до 40,7 %.

Висновок

Отже, запропонований спосіб оцінювання регенераційної здатності представників роду *Corylus* впродовж вегетації дає змогу встановлювати календарні дати сприятливих для калюсогенезу періодів, які можуть бути використані для оптимізації строків вегетативного розмноження та вдосконалення технологій догляду за насадженнями ліщини.

Льтература

1. Гартман Х.Т., Кестер Д.Е. Размножение садовых растений: Пер. с англ. — М.: Сельхозиздат, 1963. — 471 с.
2. Гершензон С.М. Основы современной генетики. — К.: Наукова думка, 1979. — 508 с.
3. Косенко І.С. Досвід розмноження декоративних форм *Corylus avellana* L. щепленням на штаббі *Corylus colyrna* L. // 8-а Міжнар. конф. «Вивчення онтогенезу рослин природних та культурних флор у ботанічних закладах Європі». — К., 1995. — С. 75.
4. Косенко І.С. Ліщини в Україні / За ред. проф. М.А. Кохна. — К.: Академперіодика, 2002. — 266 с.
5. Косенко І.С., Опалко А.І. Перспективи мікроклонального розмноження представників роду *Corylus* L. // Досягнення і проблеми генетики, селекції та

- біотехнології: Зб. наук. пр. Укр. т-ва генет. і селекц. ім. М.І. Вавилова; Редкол.: ... Кунах В. А. (голов. ред.) та ін. — К.: Логос, 2007. — Т. 2. — С. 512–516.
6. Кренке Н.П. Регенерация растений. — М.-Л.: Изд-во АН СССР, 1950. — 667 с.
 7. Опалко О.А. Динаміка регенераційного потенціалу яблуні // Зб. наук. пр. Уманської ДАА. — 2002. — Вип. 55. — С. 182–188.
 8. Опалко О.А., Опалко А.И. Регенерационная способность как критерий использования представителей рода *Malus* Mill. в ландшафтных композициях // Труды Тбилисского ботанического сада. — 2006. — Т. 96. — С. 187–189.
 9. Селекція плодкових і овочевих культур. Практикум: навчальний посібник / А.І.Опалко, А.О.Яценко, О.А.Опалко, Н.В.Мойсейченко. — К.: Наук. світ, 2004. — 307 с.

Резюме

Наведено результати вивчення динаміки регенераційного потенціалу семи генотипів роду *Corylus* L., на підставі чого пропонується оптимізувати строки вегетативного розмноження та операцій догляду за насадженнями ліщини з урахуванням сприятливих для калусогенезу періодів.

Приведено результати изучения динамике регенерационного потенциала семи генотипов рода *Corylus* L., на основании чего предлагается оптимизировать сроки вегетативного размножения и операций ухода за насаждениями орешника с учетом благоприятных для каллусогенеза периодов.

The results of study of dynamics of regeneration potential of seven genotypes of *Corylus* L. genus are given. On the basis of these results it is offered to optimize the dates of vegetative propagation and operations of tending the hazel plantations taking into consideration favorable periods of callus formation.

КРЕМЕНЧУЦКИЙ Г.Н., ШАРУН О.В., ЮРГЕЛЬ Л.Г., КОНДРАТЬЕВ Ю.А., СТЕПАНСКИЙ Д.А., БОНДАРЬ В.А., СЕМЕНОВА С.Н., КОШЕВАЯ И.П.

Днепропетровская государственная медицинская академия,
Украина, 49027, Октябрьская пл. 4, e-mail: kremen@dsmu.dp.ua

МОРФО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ H₂O₂ - ОТРИЦАТЕЛЬНЫХ АЭРОКОККОВ

Aerococcus viridans - микроорганизм, обнаруженный в воздухе жилых помещений [22] и являющийся представителем нормальной микрофлоры человека и животных; антагонистически активен в отношении ряда групп патогенных бактерий.

Антагонистическая активность аэрококков обусловлена экскрецией бактерицидных концентраций пероксида водорода [12-13] в результате функционирования НАД-независимой лактатдегидрогеназы [10], а также вещества липопротеиновой природы, антагонистическое действие которого снимается каталазой [14, 15].

Ранее установлено спонтанное образование атипичных колоний в естественных посевах *A. viridans*, чистые культуры из которых обладали полиморфизмом, не продуцировали пероксид водорода и были лишены антагонистических свойств *in vitro*. Чистые культуры из атипичных колоний сохраняли "новые" свойства в течение длительных пересевов, что позволило их относить к морфофункциональным (МФ) мутантам.

Мутантные варианты при определенных условиях реверсировали, восстанавливая

все свойства исходного штамма [7,8,9]. Вместе с тем тонкое строение клеток аэрококков и их вариантов, образующихся при функциональном изменении исходного штамма, практически не изучено.

Цель настоящего сообщения - сравнительное изучение морфологических, биологических и ультраструктурных особенностей исходных культур аэрококков, продуцирующих пероксид водорода, мутантного варианта с нарушением продукции пероксида водорода и его ревертантов.

Материалы и методы

Объектами исследования служили штаммы аэрококков: *A. viridans* 770; *A. viridans* 56 н/а, полученный из негемолитической колонии в естественном рассеивании штамма 770 на 3%-ном кровяном агаре; ревертант с преимущественно выраженной оксидазной активностью - 56 окс. рев; ревертант с преимущественно выраженной редуказной активностью - 56 ред. рев. Вид преимущественной активности ревертантов оценивали на индикаторной среде определенного биохимического состава [11].

Оценку антагонистической активности аэрококков проводили с помощью тест-культур каталазонегативного штамма *Vibrio NAG p-6078* и каталазопозитивного штамма *Escherichia coli* АВ 1157. Показателем антагонистической активности аэрококков служили зоны подавления роста тест-культур после опыления их суспензиями суточных штрихов роста культур аэрококков.

Определение метилглиоксаля в штаммах аэрококков проводили при выращивании культур в жидкой среде [12], содержащей в качестве предшественников метилглиоксаля глюкозу, дигидроксиацетон, α -глицерофосфат или треонин в концентрациях по 100 мкг/мл.

Выделение НАД-независимой лактатдегидрогеназы и определение ее активности проводили по ранее опубликованному методу [17]. Определяли также содержание пероксида водорода в культуральных жидкостях аэрококков [5]. Белок определяли биуретовым методом [20]. Фазово-контрастное исследование морфологии культур аэрококков проводили с помощью микрокамер [4].

Электронно-микроскопическое исследование культуры исходного штамма и ревертантов проводили соответственно [18], [6].

Результаты и обсуждение

Исследование морфологии клеток было проведено в фазово-контрастном микроскопе с использованием микрокамер и параллельно с помощью ультратонких срезов. При фазово-контрастной микроскопии штаммов *A. viridans* наблюдались в основном округлые кокковидные клетки. При просмотре той же культуры в электронном микроскопе также обнаружены кокки с гомогенной клеточной стенкой толщиной 40—45 нм. Слоистость клеточной стенки слабо выражена, цитоплазматическая мембрана выявлялась плохо, цитоплазма была более или менее равномерно заполнена рибосомами и обладала достаточно высокой электронной плотностью. В цитоплазме хорошо различимы небольшие зоны нуклеоида и гранулы волютина, которые, испаряясь под пучком электронов, имели вид светлой вакуоли, ограниченной трехслойной мембраной. Деление клеток происходило путем образования поперечных перегородок, в результате чего формировались четыре дочерние клетки.

При просмотре культуры мутанта *A. viridans* 56 н/а, не продуцирующего пероксид водорода, как в фазовом контрасте, так и в электронном микроскопе, отмечались существенные изменения морфологии и ультраструктуры клеток по сравнению с клетками исходного штамма. Клетки, выросшие на МПА с 10 % лошадиной сыворотки, и в световом и в электронном микроскопе имели не кокковидную, а удлиненную, иногда строго бациллярную, нередко удлиненно-грушевидную форму. В отличие от клеток исходного штамма, у клеток мутанта наблюдалась микрокапсула, которая отходила от поверхности клеточной стенки в виде коротких ворсинок и кустика. Клеточная стенка была гомогенной не на всем

протяжении клетки; в некоторых ее участках слоистость была выражена лучше. В цитоплазме закономерно выявлялись мембранные структуры ламеллярного типа, обычно расположенные в местах образования продукта, имевшего высокую электронную плотность. Дальнейшая идентификация гиперпродукции метилглиоксала клетками мутантов вследствие нарушения лактатоксидазной функции позволяет предполагать его концентрацию в электронно-плотных зонах. Морфологические изменения клеток мутанта более явно выражена на среде, обедненной нативным белком. В препаратах этой культуры, просмотренной в световом микроскопе, кокковидные клетки встречались реже, чаще встречались клетки грушевидной, гантелевидной и булавовидной форм. При электронно-микроскопическом исследовании обнаружено, что гетерогенность культуры объясняется атипичным делением; это приводит к образованию удлинённых клеток с множеством поперечных перегородок, нередко асимметрично расположенных. Некоторые из дочерних сегментов имели больший размер, придавая всей особи булавовидную или гантелевидную форму. Структура клеточной стенки данной культуры была аналогична структуре стенки мутанта, описанной выше.

Цитоплазма клеток, особенно в отдельных сегментах, имела высокую электронную плотность; зоны нуклеоида и внутрицитоплазматические мембранные структуры не выявлялись. Вне клеток обнаружены кристаллоподобные структуры округлой или гексагональной формы, обладавшие высокой электронной плотностью и имевшие определенную периодичность.

У культур ревертантов, особенно у его оксидазного варианта, продуцирующего увеличенные количества пероксида водорода, восстанавливалась форма и структура. У клеток редуктазного варианта со слабой продукцией пероксида водорода на поверхности клеточной стенки еще сохранялась небольшая микрокапсула, а клетки делились путем образования как симметричных, так и асимметричных перегородок. Даже когда клетки делились на четыре части, дочерние сегменты были неодинаковы по размеру.

Морфологические и ультраструктурные особенности исходной культуры аэрококка, мутанта и ревертантов, по-видимому, являются следствием изменений биологических свойств. Для установления этой связи было проведено сравнительное изучение ряда свойств культур аэрококков.

Было изучено отношение описываемых культур аэрококков к некоторым антибиотикам, действующим на основные пути биосинтеза клеточной стенки клетки мутанта в противоположность клеткам исходной культуры высокочувствительны к действию пенициллина, оксациллина, метициллина и устойчивы к действию лизоцима. У ревертантов в большей или меньшей степени наблюдается восстановление исходных свойств. Было установлено, что исчезновение антагонистической активности у мутантов связано с отсутствием продукции пероксида водорода вследствие потери активности НАД-независимой лактатдегидрогеназы (ЛДГ).

Биосинтез лактата у исследованных культур аэрококков идет из метилглиоксала с участием глиоксалаз. Отсутствие окисления лактата у неактивного мутанта приводит к накоплению метилглиоксала, являющегося ингибитором биосинтеза полиаминов, регулирующих деление клеток [2,3,9]. Наибольшая концентрация метилглиоксала накапливается в культурах мутанта аэрококка, не продуцирующего пероксид водорода, особенно при введении в среду α-глицерофосфата. Обращает на себя внимание повышенное накопление метилглиоксала при введении в среду треонина в культуре редуктазного ревертанта, не полностью восстанавливающего исходную морфологию.

В литературе имеются единичные сообщения, связывающие морфологические изменения клеток без нарушения целостности клеточной стенки с функциональными изменениями. Снижение уровня супероксидной дисмутазы в культурах *Campylobacter*

jejuni ATС 29428 ведет к накоплению кокковидных форм [21]. Это указывает на невыясненную роль супероксидного радикала в процессе морфообразования. Csillag [16] описала кокковидную трансформацию культур микобактерий, связав ее с особыми условиями культивирования, в частности с изменением доступа кислорода в культуры.

Выводы

1. Наблюдения об изменчивости аэрококков отсутствуют. Получение и изучение различных морфологических вариантов аэрококков обсуждается впервые.

2. Отсутствие активности НАД-независимой лактатдегидрогеназы и накопление в культурах морфологических мутантов аэрококков метилглиоксаль позволяет связать эти явления с морфологической трансформацией аэрококков, так как метилглиоксаль является ингибитором биосинтеза полиаминов [20] и аутоингибитором бактерий [19].

Литература

1. А-бактерин в лечении и профилактике гнойно-воспалительных процессов / Кременчуцкий Г.Н., Рыженко С.А., Волянский А.Ю., Молчанов Р.Н., Чуйко В.И.- Днепропетровск.: Пороги, 2001.-252 С.
2. Алексеев В.С. Количественное определение лактата, пирувата и метилглиоксаль в их смеси // Укр. биохим. ж. - 1978. - 50. -№4. - С.517-518.
3. Алексеев В.С. Метилглиоксаль: метаболизм и биологическая активность // Укр. биохим. ж. - 1987. - 59. - №6. - С.88-94.
4. Гашинский В.В. Камера для микроскопического наблюдения за размножением микроорганизмов в проточной питательной среде. // Лаб. дело.-1964.-№12.- С.743-745.
5. Государственная фармакопея Союза Советских Социалистических Республик. - 10-е изд. - М.: Медицина, - 1968. - 1079 С.
6. Константинова Н.Д., Зигангирова Н.А., Прозоровский С.И., Кац Л.А. Исследование ультраструктуры микоплазм // Журн. микроб., эпидем. и иммунобиол.-1983.-Т.52, Вып.6.-С.56-59.
7. Кременчуцкий Г.Н., Ферхан Р. Определение лактатдегидрогеназной активности *Aerococcus viridans* // 5-я научно-практическая конференция КГМИ: тез.докл.- Кабул, ДРА.- 1986.-С.130-135.
8. Кременчуцкий Г.Н., Шарун Э.Н. Закономерности приобретения устойчивости к антибиотикам *Mycococcus hyperoxydans* 167// VI съезд Украинского микробиологического общества: тез.докл.-Киев, 1984.-С.136.
9. Кременчуцкий Г.Н., Шарун Э.Н., Бицкий В.В. Отбор и изучение спонтанных «негемолитических» клонов *Aerococcus viridans* (*Mycococcus hyperoxydans*) // Сб. Актуальные вопросы инфекционной патологии.- Днепропетровск, 1985.- С.34.
10. Кременчуцкий Г.Н. Биологические особенности А-бактерина // Медичні перспективи.-2001.-Т6, №3.-С.90-97.
11. Кременчуцкий Г.Н. А.с. № 1359301 СССР, Индикаторная среда для определения оксидазной активности *Aerococcus viridans*.- Оpubл. в БИ,1987, № 46.
12. Кременчуцкий Г.Н., Самойленко И.И. Действие перекиси водорода, продуцируемой *Aerococcus viridans* на *Bacillus subtilis* и *Escherichia coli* // Микробиол. ж.-1987.-Т.49, №2,-С.91-93.
13. Кременчуцкий Г.Н., Рыженко С.А., Вальчук С.И. Роль микроэкологии организма человека и принципы ее коррекции. – Днепропетровск: "Пороги", 2003.-230 С.
14. Ballester J.M., Ballester M., Belaich J.P. Virideocine: a bactericine from *Aerococcus viridans* // Ann.Microbiol.- 1977.-V.128, P.393 - 400.
15. Ballester J.M., Ballester M., Belaich J.P. Purification of the viridocine produced by *Aerococcus viridans* // Antimicrob. Agents Chemother.-1980.-V.17, N5.- P.784 - 788.
16. Csillag A. Growth of a Form 2 Mycobacterium and Various Bacillus Species on

- Lowenstein-Jensen Medium // J.Gen. Microbiol.-1964.-V.34.- P.341-352
17. *Doelle H.W.* Nicotinamide Adenine Dinucleotide-Dependent and Nicotinamide Adenine Dinucleotide - independent lactate dehydrogenase in homofermentative and heterofermentative lactic acid bacteria // J.Bacteriol.-1971.-V.108, N3.- P.1284-1289.
 18. *Ferchan R., Kremenchutskyy G.* Research of production of hydrogen peroxide by aerococci // Abstr.Papers 6 Sci. Conference.-Kabul University.-1987.- P.135
 19. *Freedberg W.B., Kistler W.S., Lin E.C.* Lethal Synthesis of Methylglyoxal by *Esherichia coli* During Unregulated Glycerol Metabolism // J.Bacteriol.- 1971.-V.108, N I.- P.137-144.
 20. *Gornall A.C., Bardawill C.J., David M.M.* Determinations of Serum proteins by means of the biuret reaction// J.Biol.Chem.- 1949.- V.177.- P751-766
 21. *Williams R.E.O., Hirsch A.* The detection of Streptococci in air // J.Hyg. - 1950. - V.48. - P.504-524.
 22. *Williams R.E., Hirsch A., Cowan S.T.* *Aerococcus* - a new bacterial genus // J.Gen.Microbiol.- 1953. -N.8. - P.475-480.

Резюме

Методами фазово-контрастної і електронної мікроскопії показані морфологічні і ультраструктурні зміни кліток *Aerococcus viridans*, втрачених здатність окислення лактату і не продуцируючих пероксид водню. У культурах мутантів виявлено підвищене вміст метилгліоксалу.

Методами фазово-контрастної і електронної мікроскопії показані морфологічні і ультраструктурні зміни кліток *Aerococcus viridans*, що втратили здатність окислення лактату і що не продукують пероксид водню. У культурах мутантів виявлений підвищений вміст метилгліоксалу.

The techniques of phase-contrast and electron microscopy were used to demonstrate morphological and ultrastructural modifications in *Aerococcus viridans* cells which had lost the ability to oxidise lactate synthesized in them via methyl glyoxal which accumulate in cells.

КРИВОШЕЄВА Л.М., ЛОГІНОВ М.І.

Інститут луб'яних культур УААН,

Україна, 41400, м.Глухів Сумської обл., вул.Терещенків,45; E-mail: ibs@sm.ukrtel.net

ГЕНЕТИЧНІ РЕСУРСИ РОСЛИН ЛЬОНУ ІНСТИТУТУ ЛУБ'ЯНИХ КУЛЬТУР УААН

Льон – культура комплексного використання льоносировини в різних галузях виробництва. Успішний розвиток галузі льонарства залежить від селекційної роботи, завданням якої є створення високопродуктивних сортів льону-довгунця, які відповідають вимогам сільськогосподарського виробництва і легкої промисловості. Ефективність селекційної роботи залежить в першу чергу від генетичного різноманіття вихідного матеріалу, основним джерелом якого є світова колекція льону.

Розкриття потенціалу генетичних ресурсів за основними біологічними та селекційними ознаками забезпечує генетичну базу для реалізації селекційних програм різних напрямків. В цілому передселекційна робота включає всі етапи роботи з генофондом від збору, підтримання та вивчення до правових аспектів авторства на донори і джерела цінних ознак. Генетична різноманітність зразків, які зберігаються в центрах генетичних ресурсів рослин та генних банках світу, які слугують ефективною базою для поліпшення культур, повинні бути всебічно вивчені, а колекції ретельно організовані. Кожен зразок колекції повинен бути ідентифікований та паспортизований.

Збереження генетичної цілісності зразків також є однією з принципових проблем. Мова йде не тільки про збереження зразка, як такого, але з його цінними властивостями, адаптивними з іншими ознаками[1].

Виявлення серед зразків світової колекції льону нової чітко вираженої “ознаки”, як правило в більшості виявляє економічну ефективність сорту. Ретельне та всебічне вивчення сортозразків льону з метою виявлення джерел та донорів господарсько-цінних ознак повинно проводитись в місцевих умовах, тобто там, де ведеться селекційна робота.

Матеріал та методи

Вивчення колекційних зразків проведено згідно методичних рекомендацій Всеросійського інституту рослинництва ім. М.І.Вавилова (ВІР) з вивчення колекції льону (*Linum usitatissimum* L.) [2]. Морфологічний опис зразків, їх класифікація за біологічними, господарськими та технологічними властивостями – за класифікатором виду *Linum usitatissimum* L. [3,4].

Дослідження та оцінка колекційних зразків льону-довгунця на стійкість до хвороб проведено на комплексному інфекційному фоні у польових умовах згідно методичних рекомендацій [5].

Вивчення колекційних зразків здійснюється на дослідному полі Інституту луб’яних культур (м. Глухів Сумської області).

Результати досліджень

Формування колекції генетичних ресурсів рослин льону в Інституті луб’яних культур розпочато в 1992 році на основі дублетних зразків, отриманих із Всеросійського інституту рослинництва ім. М.І.Вавилова (м.Санкт-Петербург), Всеросійського інституту льону, а також одержаних за обміном з інших країн ближнього і далекого зарубіжжя. У 1995 році колекція складалась з 969 зразків, серед яких 99% - це льон-довгунець. Станом на 1 лютого 2008 року в ній нараховується 1246 зразків, із них: льону-довгунця – 1078, льону-межеумку – 130, льону олійного – 31, та сім зразків інших видів льону (*L.bienne*, *L.strietum*, *L.nervozum*, *L.tenue*, *L.coeruleum*, *L.corimbiferum*, *L.grandiflorum*), за географічним походженням із 47 країн світу (рис.1). Найбільша кількість зразків представлена із Росії – 296, Швеції – 116, України – 85, Чехії – 77, Німеччини – 64, Нідерландів – 55, Франції – 55, Китаю – 44, Білорусі – 23 (рис2).

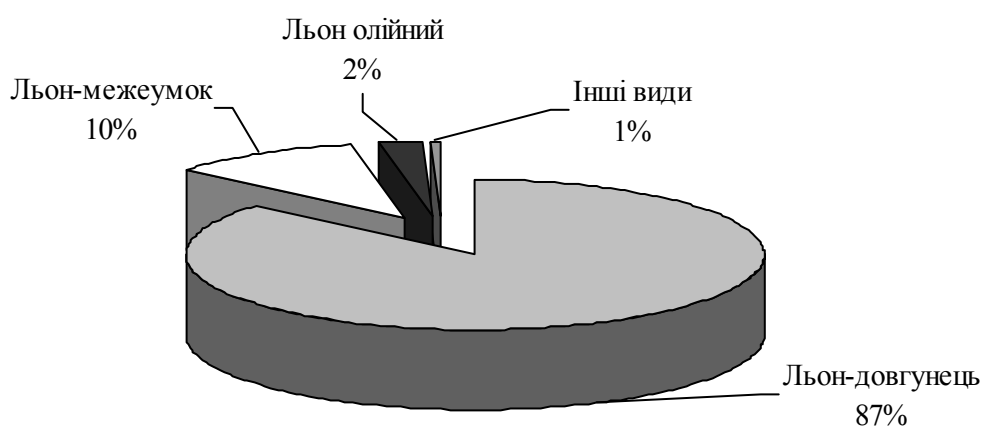


Рис.1. Склад колекції льону на 1.02.2008 р.

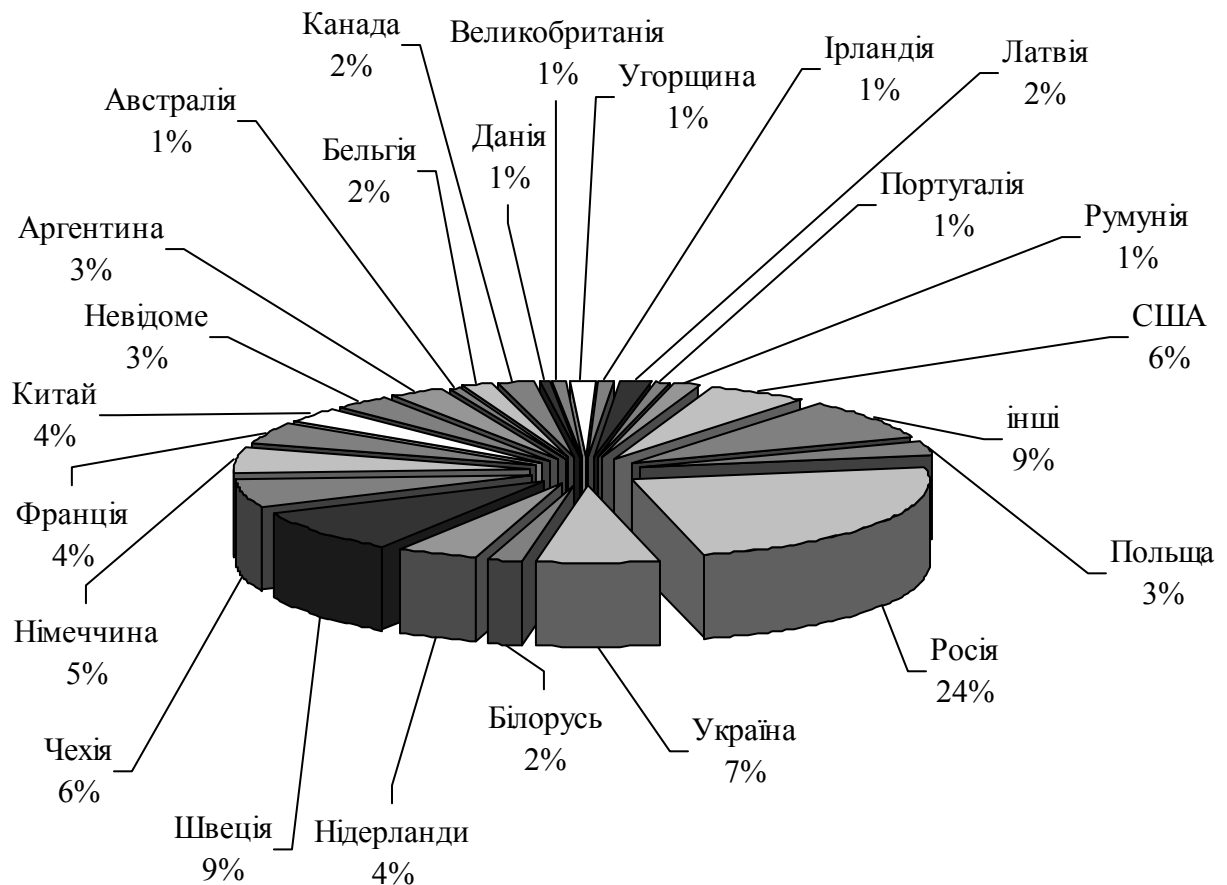


Рис.2. Географічне походження зразків льону

Дослідження генетичних ресурсів льону в Інституті луб'яних культур проводяться за наступними напрямками:

- пошук та залучення до генофонду місцевих, вітчизняних та зарубіжних селекційних сортів;
- вивчення генофонду льону за комплексом біологічних та господарсько-цінних ознак і створення на цій основі ознакових колекцій;
- збереження зразків в колекціях зберігання;
- паспортизація зразків колекції льону, створення інформаційної бази даних;
- використання сортів – носіїв комплексу або окремих ознак при створенні нових сортів.

Збагачення колекції є неодмінною умовою її ефективного використання у селекційних, наукових та інших програмах. Це є необхідним для формування більш досконалого складу колекції.

Українська національна колекція льону кожен рік поповнюється новими цікавими зразками льону шляхом одержання їх з науково-дослідних, селекційних установ України, країн близького та далекого зарубіжжя, експедиційних зборів та обміну з іншими банками. За період з 2002 по 2007рр. колекція льону збільшилась на 254 сортозразки.

Залучений до колекції зразок реєструється та одержує номер ІЛК. В перший рік, після вивчення у розсаднику інтродукції на однорідність і типовість, нові сортозаски реєструються у базі паспортних даних Національного Центру генетичних ресурсів рослин України згідно з системою EURISCO (Стандарт Європейського пошукового каталогу з генетичних ресурсів рослин) та отримують номер Національного каталогу.

Після розмноження насіння передається до Національного сховища на довготривале зберігання.

Вивчення колекційних зразків проводиться частинами за трьохрчним циклом залежно від їх надходження та з урахуванням трудозатрат. Зараз вивчено в умовах північно-східного Полісся України 970 сортозразків, повна характеристика яких за господарсько-цінними ознаками представлена у чотирьох випусках каталогів Української національної колекції льону [6-9].

Найбільш важливими сільськогосподарськими ознаками є довжина вегетаційного періоду, продуктивність з 1м^2 соломи, волокна, насіння, вміст всього та довгого волокна в стеблах, стійкість до вилягання та хвороб, а також морфологічні ознаки, які характеризують зразки колекції – загальна та технологічна довжина стебла, форма суцвіття, розтріскування коробочок та форма насіння і біологічні ознаки, які розрізняють генотипи – плямистість чашолистиків, гофрованість пелюсток, забарвлення пелюсток, жилок, тичинок, пиляків, приймочки.

За результатами багаторічного вивчення створено паспортну базу та зареєстровано базову колекцію зразків льону (свідоцтво № 10 від 17.11.05 р.), в якій поєднані наявні зразки Інституту луб'яних культур, які представляють повний спектр мінливості ознак в межах культури.

На основі базової колекції створюються ознакові колекції льону-довгунця.

Ознакові колекції – у яких зразки підібрані за певним рівнем фенотипового вияву окремих ознак або їх поєднань. До цих колекцій включають зразки з високим, оптимальним або низьким виявом ознак, в залежності від напрямку використання. Неодмінними елементами ознакової колекції є еталонні зразки, які мають більш стабільний рівень вияву ознак при можливо більш високому рівні продукційного процесу.

В Інституті луб'яних культур сформовано дві ознакові колекції: за високим вмістом всього та довгого волокна в стеблах (81 зразок) та за високою насінневою продуктивністю (216 зразків), які передані на реєстрацію до НЦГРРУ.

За результатами багаторічного вивчення колекційного матеріалу виділені джерела широкого спектру господарсько цінних ознак: за скоростиглістю – 132, за стійкістю до вилягання – 45, за насінневою продуктивністю – 160, за масою стебел – 82, за продуктивністю всього волокна – 38, за вмістом всього волокна – 56, за вмістом довгого волокна – 84, за якістю волокна -113 сортозразків.

Важливе значення мають зразки, що поєднують у своєму генотипі декілька господарсько цінних ознак. У результаті вивчення нами виділені цінні сортозразки за комплексом ознак, які можуть бути використані в якості вихідного матеріалу для селекції. Так, у 2002-2004 роках, український сорт Світанок перевищив стандарт Могильовський 2 за п'ятьма ознаками, а саме: ранньостиглість, продуктивність стебел, вміст та маса всього волокна, стійкість до вилягання. Також за п'ятьма ознаками (продуктивність всього волокна, маса насіння та стебел, стійкість до вилягання та антракнозу) мав перевагу над стандартом зразок Глазур із України. За чотирма ознаками (вегетаційний період, вміст та урожай всього волокна, стійкість до вилягання) виділились зразки Згода, Ліра із Білорусії та Тверской із Росії. Російський зразок Томский 18 перевищив стандарт за наступними ознаками: вегетаційний період, вміст та продуктивність всього волокна, продуктивність насіння, стійкість до вилягання та антракнозу. У 2005-2007рр. російський сорт Гост 2 і литовський сорт Б-100 перевищували стандарт Чарівний за шістьма ознаками (висота рослин, продуктивність соломи, насіння і волокна, вміст всього та довгого волокна в стеблах). За п'ятьма ознаками мали перевагу наступні зразки: Оріон (Росія), Б 58 (Литва) – продуктивність соломи, насіння і волокна, вміст всього та довгого волокна в стеблах); К-65, Е-68 (Білорусь), Б 62 (Литва), 2004-1 (Китай) – висота рослин, продуктивність соломи, волокна, вміст всього та довгого волокна в стеблах; М-38 (Україна), 2003-1 (Китай) –

висота рослин, продуктивність соломи, насіння і волокна, вміст довгого волокна. Деякі зарубіжні сортозразки були кращими за стандарт за трьома-чотирма показниками. Так, сорт Г-1781-4-18 із Росії виділявся за продуктивністю соломи, масою і вмістом всього та довгого волокна; М-12 із Білорусі – за продуктивністю соломи, насіння і волокна, вмістом всього волокна; Б-146 із Литви - за продуктивністю насіння і волокна, вмістом всього та довгого волокна; Хейя 11, Хейя 13 із Китаю – за висотою рослин, продуктивність соломи, насіння і волокна.

Література

1. *Конарев А.В., Конарева В.Г., Губарева Н.К., Пенева Т.И.* Белки семян как маркеры в решении проблем генетических ресурсов растений, селекции и семеноводства // Цитология и генетика. - №2. – Т. 34. – 2000. – С. 91 – 104.
2. *Кутузова С.Н., Питько А.Г.* Изучение коллекции льна (*Linum usitatissimum* L.). – Л.: ВНИИР, 1988. – 27 с.
3. *Рыкова Р.П.* Классификатор вида *Linum usitatissimum* L. (лен).– Л.: ВНИИР, 1979. – 16 с.
4. Широкий унифицированный классификатор СЭВ вида *Linum usitatissimum* L. /*Рыкова Р., Кутузова С., Корнейчук В. и др.*– Л.: ВНИИР, 1979. – 22 с.
5. *Караджова Л.В., Дударев Е.И., Крылова Т.В., и др.* Методические указания по фитопатологическим работам со льном-долгунцом. – М.: Колос. 1969. – 31 с.
6. *Каталог української колекції льону-довгунця Вип.1*//Логінов М.І., Вировець В.Г., Степченко О.Г. і ін. – Глухів: ІЛК, 1994. – 18с.
7. *Каталог української колекції льону-довгунця. Вип.2.*/ Вировець В.Г., Логінов М.І., Чучвага В.І., Муковоз В.Ю. За ред. П.А.Голобородька. - Глухів: ІЛК, 2000. – 69 с.
8. *Каталог української колекції льону. Вип.3.*/ Вировець В.Г., Логінов М.І., Чучвага В.І., Муковоз В.Ю., Кривошеева Л.М. За ред. П.А.Голобородька. - Глухів: ІЛК, 2005. – 17 с.
9. *Каталог української колекції льону. Вип.4.*/ Вировець В.Г., Логінов М.І., Чучвага В.І., Кривошеева Л.М., Муковоз В.Ю. За ред. П.А.Голобородька. - Глухів: ІЛК, 2007. – 21 с.

Резюме

В Інституті луб'яних культур сформовані базова колекція льону на 1246 сортозразків, ознакові колекції за високим вмістом всього та довгого волокна (81 сортозразок), за високою насінневою продуктивністю (216 сортозразків). У результаті вивчення виділені джерела, як за окремими, так і за комплексом господарсько-цінних ознак льону-довгунця.

В Институте лубяных культур создана базовая коллекция льна на 1246 сортообразцов, признаковые коллекции по высокому содержанию всего и длинного волокна (81 сортообразец), по высокой семенной продуктивности (216 сортообразцов). В результате изучения выделены источники как по отдельным так по комплексу хозяйственно ценных признаков льна-долгунца.

The basic flax collection of 1246 variety samples, signs collection on high content of the total and long fiber (82 variety samples) and high seeds productivity (216 variety samples) are created in the Institute of Bast Crops UAAS. As a result, we got original sources of individual and complex economically valuable signs of fiber flax.

КУЗЬМИН С.Р., КУЗЬМИНА Н.А.

Институт леса им. В.Н. Сукачева СО РАН,

Россия, 660036, Красноярск, Академгородок, e-mail: sergio7@akadem.ru

ПЛОТНОСТЬ УСТЬИЦ У СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ РАЗНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ В ГЕОГРАФИЧЕСКИХ КУЛЬТУРАХ ПРИАНГАРЬЯ

Анатомические элементы хвои и, в частности устьица, участвуют в регуляции энергии и газового обмена между растением и атмосферой, их плотность (число на единицу площади) определяет потенциальную площадь для газового обмена. Во многих работах установлено отсутствие реакции плотности устьиц и устьичного индекса на экспериментальные или сезонные изменения температуры [1, 2 и др.]. Однако в работе Луомала и др. [3] отмечено уменьшение плотности устьиц в связи с возрастанием температуры воздуха. Повышение температуры воздуха может приводить к увеличению толщины хвои [4]. Высказывается обоснованное мнение, что частота устьиц на любой поверхности листа находится под тесным генетическим контролем, но может быть модифицирована параметрами окружающей среды [5].

В связи с этим, представляло интерес изучение плотности устьиц и других анатомических и морфологических признаков хвои у климатипов сосны обыкновенной в географических культурах. Для климатипов предполагается сочетание двух механизмов влияния на морфологию хвои: 1) генетически закрепленного в связи с местом происхождения климатипа; 2) модифицирующего, обусловленного влиянием конкретных условий выращивания культур. Оценка сочетания влияния этих механизмов на морфологию и анатомию хвои и составила предмет наших исследований.

Материалы и методы

Объекты исследования – 10 климатипов сосны обыкновенной, произрастающие в географических культурах Богучанского лесхоза Красноярского края (58°39' с.ш. 97°30' в.д.): печенгский (лесотундра, Мурманская область), кандалакшский (северная тайга, Мурманская область), пинежский (северная тайга, Архангельская область), плесецкий (средняя тайга, Архангельская область), богучанский (местный, южная тайга, Красноярский край), енисейский (средняя тайга, Красноярский край), минусинский (лесостепь, Красноярский край), чемальский (лесостепь, Алтай), балгазынский (лесостепь, Тыва), кяхтинский (степные условия, Бурятия). Возраст деревьев каждого климатипа – 30 лет.

Целью данной работы было изучение некоторых анатомических и морфологических признаков хвои у сосны разного происхождения в географических культурах, в том числе у тех климатипов, у которых ранее исследовалась анатомия древесины [6].

При сборе образцов хвои, учете ее параметров и плотности устьиц использовались методические рекомендации Л.Ф. Правдина [7], С.А. Мамаева [8] и др., а также применялись собственные методические разработки. В связи с тем, что у исследуемых климатипов анатомическая структура древесины изучалась у 5 средних по таксационным параметрам деревьев, плотность устьиц и количественные характеристики изучались также у этого числа деревьев, но в работе также использованы данные предыдущих исследований морфологии хвои, проведенные на 30 деревьях у 64 климатипов.

В географических культурах каждый климатип произрастает на отдельном участке из посаженных по единой методике деревьев. Стандартный участок имеет 13 рядов (длиной 50 м). Расстояние между рядами равно 1,5 м, расстояние между деревьями в одном ряду равно 0,75 м. Таким образом, средний размер участка составляет 50x18 м. Расстояние между участками составляет 3 м. Сомкнутость полога древостоя у всех исследуемых климатипов высокая и равна 0,8-1,0. У всех климатипов деревья для исследования отбирались из центральных рядов с одинаковой густотой и сомкнутостью полога в конкретном центральном участке. Предварительно проводились

измерения высот и диаметров у 50 деревьев для определения среднего дерева по этим параметрам. У деревьев изучалось 10 пар хвоинок двухлетнего возраста из боковой ветви первого порядка восьмой мутовки сверху с юго-восточной стороны. Сомкнутость на уровне восьмой мутовки у всех климатипов равна 1,0. Собранная хвоя является световой.

Измерение длины хвои проводилось с помощью линейки, измерение ширины хвои проводилось на бинокляре при увеличении 56х. Измерение плотности устьиц проводилось на выпуклой (верхней) поверхности хвои из ее строго центральной части, которая представляла собой вырезанный фрагмент длиной около 0,5 см, шириной около 1,3 мм. На этом фрагменте измерения проводились в 6 полях зрения (0,6 мм x 0,75 мм = 0,45 мм²), которые были равномерно распределены по центральной части исследуемого фрагмента. Подобная методика исследований с применением полей зрения использовалась другими авторами при исследовании хвои у тсуги [9]. Таким образом, общая площадь исследований одной хвоинки составляла 2,7 мм².

Результаты и обсуждение

Абсолютные пределы колебания плотности устьиц у исследованных деревьев климатипов сосны составляют 48-106 шт./мм², при этом коэффициент индивидуальной изменчивости варьирует от 4 до 9 %, географическая изменчивость составляет 12 %. Среднее значение признака у климатипов варьирует от 60 до 85 шт./мм². Наименьшее число устьиц (60-62 шт./мм²) наблюдается у климатипов самых северных происхождений (кандалакшского и печенгского из Мурманской обл.), наибольшее – у местного и южных происхождений, богучанского (Красноярского края), чемальского (Алтайского края), балгазынского (Тывы) и кяхтинского (Бурятии).

Оценка сходства и различий климатипов по плотности устьиц показала, что северные климатипы (печенгский, кандалакшский, плесецкий) достоверно отличаются меньшими средними значениями от богучанского, чемальского, кяхтинского и балгазынского при уровне значимости $p < 0,05$ и $p < 0,01$, от пинежского и енисейского при $p < 0,01$. Анализ корреляционной связи признака с географической широтой выявил, что плотность устьиц возрастает с уменьшением географической широты. Связь отрицательная и близкая к прямолинейной ($r = -0,91$; $p < 0,01$). Эту закономерность отмечают и другие исследователи северных и южных популяций сосны. Так, согласно данным финских исследователей [3], число устьиц на выпуклой поверхности (которая изучалась и нами) двухлетней хвои у сосны, произрастающей в Финляндии, равно 66,4 шт./мм² (на вогнутой – 76,9 шт./мм²). По данным С.А. Мамаева [8], на Урале в более теплых и засушливых местообитаниях сосна формирует хвою с большим количеством устьиц, чем в северных условиях. В природных популяциях сосны на юге Красноярского края (в Минусинской и Ширинской степях) плотность устьиц варьирует от 87,7 до 95,7 шт./мм².

Анализ корреляции плотности устьиц с широтой и климатическими факторами места происхождения показал отрицательную связь с широтой, положительную связь признака с суммой температур больше 5°C, средней температурой июля и продолжительностью вегетационного периода.

При исследовании плотности устьиц у хвои замерялись ее параметры – длина и ширина. Проведенный корреляционный анализ изучаемых признаков показал, что между числом устьиц и длиной хвои наблюдается положительная связь, что подтверждается коэффициентом корреляции ($r = +0,79$; $p < 0,01$). Плотность устьиц отрицательно коррелирует с шириной хвои ($r = -0,78$; $p < 0,01$).

Длина хвои имеет высокую отрицательную корреляцию с широтой и положительную корреляцию с продолжительностью вегетационного периода, а ширина – положительную с широтой и отрицательную с продолжительностью вегетационного периода. В отличие от ширины, длина хвои имеет высокую корреляцию с суммой температур больше 5°C и средней температурой июля. Наиболее короткая (31-39 мм) и

относительно широкая хвоя (1,34-1,50 мм) в географических культурах наблюдается у северных климатипов. Для местного (богучанский) и южных климатипов характерна более длинная (52-65 мм) и узкая (1,23-1,38 мм) хвоя. Так же, как и плотность устьиц, длина хвои имеет отрицательную корреляционную связь с широтой ($r = -0,84$ при $p < 0,01$), что подтверждает довольно строгую закономерность изменчивости признаков, выявленную в географических культурах, потомство из северных широт формирует короткую хвою, а потомство из южных – наоборот. Очевидно, что у потомства разных климатипов происходит строгая реализация генетической программы, обусловленная в первую очередь вегетационным периодом, характерным для их места происхождения. Это подтверждают работы по экспрессии генов, отвечающих за начало и окончание роста листы или хвои [10]. Так, изящными экспериментами было показано, что соотношение CO/FT активности генов определяет не только начало цветения, но и прекращение роста листы у осины в зависимости от достигнутой критической длины дня. Гены CO отвечают за суточные колебания белков, аккумулирующихся при длинном дне. Эти белки индуцируют транскрипцию гена FT (гена цветения), м-РНК которого транспортируется из листьев в верхушечные меристемы, где продуцированные белки индуцируют цветение. Оказалось, что соотношение CO/FT определяет и прекращение роста листы при достижении критической для данной широты длины дня. При этом у деревьев из более северных популяций прекращение роста и заложение новых почек наблюдаются при более длинном дне, чем у южных, поскольку изменения длины дня происходят в сочетании с изменениями температуры. Если сопоставить эти результаты с нашими, то можно полагать, что анатомия хвои у климатипов (в частности частота устьиц, как результат развития ассимиляционного аппарата) находится под преобладающим генетическим контролем, а на уровне клеток и тканей устойчиво функционирует механизм CO/FT, контролируемый изменением длины дня. Этот механизм кажется устойчивым, несмотря на существенные изменения условий роста климатипов. Следовательно, адаптационные возможности климатипов в первую очередь ограничиваются устойчивостью генетического контроля развития ассимиляционного аппарата. Именно здесь надо искать те изменения в процессах, которые могут модифицировать эту устойчивость в связи с существенными изменениями условий роста (соотношение изменений длины дня и температуры и др.).

Выводы

В географических культурах наблюдается клинальная изменчивость размеров хвои и плотности устьиц у климатипов сосны. Градиент нарастания длины хвои составляет 1,5 мм, плотности устьиц – 1 шт. мм² на градус широты. Плотность устьиц и длина хвои находятся под существенным генетическим контролем и связаны между собой положительной корреляционной связью, с шириной хвои у них выявлена отрицательная связь, но между длиной и шириной хвои эта связь не достоверная. Это может свидетельствовать о том, что ширина хвои находится в большей степени под контролем температурного фактора в пункте испытания. Генетический контроль у климатипов обусловлен комплексом факторов, прежде всего климатическими условиями места происхождения сосны. У северных климатипов (севернее 62°) в относительно теплых для них условиях в пункте испытания географических культур продолжает формироваться короткая хвоя (31-39 мм) с низкой плотностью устьиц (60-73 шт./мм²). У южных климатипов (южнее 54°) в условиях географических культур формируется длинная (44-65 мм) и относительно узкая хвоя с высокой плотностью устьиц (79-85 шт./мм²).

Формирование удлиненной хвои у южных климатипов способствует вовлечению больших объемов ассимилятов в обмен веществ посредством фотосинтеза, осуществляемого большей поверхностью листа. Это требует и большего числа устьиц для активной транспирации, которая бы соответствовала значительному обмену веществ. Относительно низкие для южных климатипов суммы температур воздуха в

пункте испытания способствуют формированию узкой хвои с большим числом устьиц. Большой объем ассимилятов активно используется и для построения большой толщины клеточной стенки ранней древесины у южных климатипов [6].

Литература

1. Apple M.E., Olszyk D.M., Ormond D.P., Lewis J., Southworth D., Tingey D.T. Morphology and stomatal function of Douglas fir needles exposed to climate change, elevated CO₂ and temperature // International Journal of Plant Science. 2000. V. 161. № 1. P. 127-132.
2. Beerling D.J. Carbon isotope discrimination and stomatal responses of mature *Pinus sylvestris* L. trees exposed in situ for three years to elevated CO₂ and temperature // Acta Oecologica. 1997. V. 18. P. 697-712.
3. Luomala E.-M., Laitinen K., Sutinen S., Kellomaki S., Vapaavuori E. Stomatal density, anatomy and nutrient concentrations of Scots pine needles are affected by elevated CO₂ and temperature // Plant, Cell and Environment. 2005. V. 28. P. 733-749.
4. Shavnin S.A., Marina N.V., Novoselova G.N., Usupov I.A., Ivanova L.A., Ronzhina D.A. Impact of local warming on the physiological state of Scots pine needles // Abstracts of International conference. Ekaterinburg. Ural State Forest Engineering University. 2006. P. 85.
5. Croxdale J.L. Stomatal patterning in angiosperms // American Journal of Botany. 2000. V. 87. P. 1069-1080.
6. Кузьмин С.Р., Ваганов Е.А., Кузьмина Н.А., Милютин Л.И. Особенности трахеид древесины у климатипов *Pinus sylvestris* (*Pinaceae*) в географических культурах // Ботанический журнал, 2008, т.93, №1. С. 10-21.
7. Правдин Л.Ф. Сосна обыкновенная. Изменчивость, внутривидовая систематика и селекция. М.: Наука, 1964. 190 с.
8. Мамаев С.А. Формы внутривидовой изменчивости древесных растений. М.: Наука, 1973. 282 с.
9. Kouwenberg L.L.R, Kürschner W.M., Visscher H. Changes in stomatal frequency and size during elongation of *Tsuga heterophylla* needles // Annals of Botany. 2004. V. 94. № 4. P. 561-569.
10. Bohlenius H., Huang T., Charbonnel-Campaa L., Brunner A.M., Jansson S., Strauss S.H., Nilsson O. CO/FT regulatory module controls timing of flowering and seasonal growth cessation in trees // Science. 2006. V. 312. P. 1040-1043.

Резюме

Stomatal density, needle length and width of different Scots pine provenances were studied in the provenance trial. It was determined that the closest relation is between stomatal density and needle length. Stomatal density and needle length are under great genetic control and closely related by positive correlation. Needle width is to a greater extent under control of temperature factor in the place of trial.

КУРЧИЙ В.М., САКАЛО В.Д., ТОПЧИЙ Н.Н., ТИЩЕНКО Е.Н.

Институт физиологии растений и генетики Национальной Академии наук Украины, Украина 03022 Киев, ул. Васильковская, 31/17

ВЛИЯНИЕ 6-БЕНЗИЛАМИНОПУРИНА И ЗЕАТИНА НА МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ В СТАРЕЮЩИХ ЛИСТЯХ САХАРНОЙ СВЕКЛЫ

Процесс старения листьев рассматривается как форма программированной клеточной гибели и сопровождается генетическими, биохимическими и структурными изменениями [8]. На клеточном уровне программа старения развёртывается упорядоченным образом, где одними из первых постепенно начинают разрушаться хлоропласты. Вместе с тем нами показано, что в стареющих листьях сахарной свеклы

нарушению структуры хлоропластов предшествует изменение в реализации генетических программ развития. В связи с этим было предположено участие метилирования ДНК в дифференциальной экспрессии генов.

Ядерно-цитоплазматическая система взаимосвязей сигналов и метаболитов, участвующих в процессе старения, ещё далека от полного понимания. Представляет интерес сахароза как сигнальная молекула, синтез которой ферментом сахарозофосфатсинтазой (СФС, К.Ф. 2.4.1.14) тесно связан с функционированием фотосинтетического аппарата. [7]. Продукты ее гидролиза – гексозы участвуют в регуляции метаболизма стареющих органов и тканей. С процессом старения связывают активацию фермента гексокиназы (К.Ф. 2.7.1.1), так как образуемые им фосфорилированные сахара негативно влияют на экспрессию генов, ответственных за синтез хлорофиллсвязывающих белков [5]. Снижение экспрессии гена гексокиназы, наоборот, тормозит процессы старения [11].

Несмотря на то, что старение является генетически запрограммированным процессом, оно может индуцироваться/модулироваться разными факторами и подвергаться гормональному контролю [1, 8]. Хотя известно, что фитогормоны регулируют транспорт ассимилятов из листьев, принимают участие в регуляции метаболизма, направленного на образование их транспортных форм, взаимодействуют с сахарами в процессе старения [10], сведения об изменениях углеводного метаболизма немногочисленны. Кроме того, в обсуждаемом аспекте слабо изученными являются изменения в уровне метилирования ДНК.

Целью данной работы было изучение влияния гормонов цитокининовой природы (БАП, зеатин) на биохимические процессы, связанные с синтезом сахарозы, ее метаболизмом, а также с метилированием ДНК при старения листьев сахарной свеклы.

Материалы и методы

Сахарную свеклу (*Beta vulgaris* L.) сорта Уладовская односемянная 35 (УО-35) выращивали в вегетационных сосудах (15 кг). Растения дважды в течение вегетации обрабатывали растворами цитокининов (БАП – $4 \cdot 10^{-5}$ М, зеатина $1 \cdot 10^{-6}$ М): в период образования 6-8 листа и в начале периода интенсивного сахаронакопления. В качестве контроля использовали растения, обработанные водой. Для исследования брали 13-14 листья разного возраста – ювенильные (5-дневные), растущие и закончившие рост (25-, 45-дневные) и стареющие (60-дневные). Выделение СФС и определение ее активности проводили по методу Губера с соавт. [6], гексокиназы по [3].

Ядра и яДНК из листьев сахарной свеклы выделяли частично модифицированным нами методом [2, 4]. Используемый метод позволяет получать неповрежденные ядра, в которых отсутствуют цитоплазматические примеси. Рестриктию ДНК проводили рестриктазами *MspI*, *HpaII*, *XhoI*, *PvuII*, *SalI*, *Sau3A I*, *MboI*, *PstI* (“Fermentas”, Литва). На 1 мкг ДНК брали 4-10 единиц активности рестриктаз и инкубировали в течение 8-12 часов при 37 °С. Электрофорез ДНК проводили в 0,8 %-ном агарозном геле, содержащем 0,5 мкг/мл бромистого этидия в 1хТВЕ при 3-4 В/см в течение 3-4 часов.

Результаты и обсуждение

В процессе старения листа происходит частичное разрушение ядер. Так, в старом, (60-ти дневном) листе их содержание составляет 65 % от максимального, отмеченного в молодом развивающемся (5-ти дневном) листе (табл. 1).

Таблица 1

Влияние экзогенных фитогормонов на содержание ядер ($\times 10^{-7}$ на 1 г ткани) в онтогенезе листьев сахарной свеклы

Варианты	Возраст листа, дни				
	5	25	45	60	%
контроль	9,10 ± 0,02	7,90 ± 0,02	6,70 ± 0,01	5,90 ± 0,01	65,0
БАП	8,80 ± 0,02	8,00 ± 0,03	7,50 ± 0,02	6,80 ± 0,02	77,3

зеатин	8,70 ± 0,01	8,10 ± 0,03	7,70 ± 0,02	6,30 ± 0,01	72,4
--------	-------------	-------------	-------------	-------------	------

Под влиянием фитогормонов цитокининовой природы процессы разрушения ядер в стареющих листьях сахарной свеклы замедляются: БАП сдерживает разрушение ядер на 12,3 %, зеатин – на 7,4 %. При этом фрагментации яДНК – одного из основных критериев перехода клеток на путь запрограммированной клеточной гибели, не наблюдается. Это свидетельствует о замедлении процессов старения листьев под влиянием фитогормонов (БАП и зеатин).

Метилирование ДНК рассматривается в качестве одного из таких факторов, которые берут участие в процессах генетической регуляции старения эукариот [1]. Для растений роль ферментативно модифицированных остатков цитозина остаётся недостаточно изученной. Мы изучали природу последовательностей ДНК в процессе старения листьев сахарной свёклы на этапе, когда происходят изменения в реализации генетических программ старения и поддерживается целостность молекул ДНК. Среди проанализированных последовательностей, являющихся сайтами узнавания рестриктаз *MspI/HpaII*, *XhoI*, *SalI*, *PstI*, *PvuII*, *HhaI*, *Sau3AI/MboI*, наблюдается как повышение, так и снижение уровня метилирования ДНК. Последнее характерно для пары изошизомеров *Sau3AI/MboI*. БАП и зеатин не влияли на характер паттернов гидролизированных фрагментов ДНК, что указывает на отсутствие взаимосвязи этих фитогормонов и ферментативной модификации цитозина. Совпадение таких событий, как избирательное метилирование/ деметилирование сайт-специфичных последовательностей ДНК и дифференциальная инактивация/активация транскрипции генов не исключает участия 5мС в эпигенетических аспектах регуляции, связанных с образованием гетерохроматина.

В стареющих листьях происходит снижение уровня хлорофилла, который в 60-ти дневном листе составляет 27 % от максимального, отмеченного в 25-ти дневном. Цитокинины сдерживали разрушение хлорофилла: в старом листе под влиянием БАП содержание хлорофилла составляло 39 % от максимального, зеатина – 42 % (табл. 2).

С состоянием фотосинтетического аппарата тесно связана функциональная активность фермента синтеза сахарозы – СФС. Активность СФС не постоянна. Максимальная удельная активность обнаружена в 25-ти дневном листе, когда он уже выполняет донорную функцию. В старом листе (60 дней) удельная активность СФС составляла 26 % от максимальной. Обработка БАП стимулировала СФС в зрелых (45-ти дневных) и стареющих (60-ти дневных) листьях в 2-3 раза. Под влиянием зеатина в молодых листьях (5-25-ти дневных) изменений активности СФС практически не наблюдалось. В молодых листьях незначительную активацию ферментов БАП-ом и ее полное отсутствие при обработке зеатином, можно объяснить тем, что СФС подвержена сложной системе эндогенной регуляции и тесно связана с фотосинтезом, уровень хлорофилла в этих листьях также практически не изменялся под влиянием цитокининов (см. табл. 2). Таким образом, экзогенные цитокинины (БАП, зеатин) оказывали существенное влияние на СФС, поддерживая на более высоком уровне удельную активность фермента в зрелых и стареющих листьях.

Таблица 2

Удельная активность сахарозофосфатсинтазы и содержание хлорофилла в онтогенезе листьев сахарной свеклы

Варианты	Возраст листа, дни			
	5	25	45	60
Хлорофилл (a+v), мг/дм ²				
Контроль	3,87 ± 0,1	5,65 ± 0,05	1,9 ± 0,03	1,54 ± 0,02
БАП	3,91 ± 0,3	5,40 ± 0,1	2,5 ± 0,05	2,1 ± 0,07
Зеатин	3,80 ± 0,4	5,46 ± 0,06	2,64 ± 0,04	2,3 ± 0,03
СФС(мкмоль сахарозы /мг белка · час)*				
Контроль	0,77 ± 0,02/ 100	2,2 ± 0,06/ 100	1,1 ± 0,02/ 100	0,58 ± 0,01/ 100

БАП	0,9 ± 0,05/ 117	2,85 ± 0,05/ 130	3,3 ± 0,1/ 300	1,8 ± 0,02/ 310
Зеатин	0,68 ± 0,01/ 88	1,8 ± 0,04/ 82	3,2 ± 0,01/ 291	1,3 ± 0,01/ 224

*Примечание: за чертой в этой и в табл.3 - % от контроля

Важная роль в регуляции эндогенного уровня сахаров в фотосинтетических тканях и связанного с этим старением принадлежит гексокиназе, которая фосфорилируя глюкозу не только образует субстраты для гликолиза, но и участвует в регуляции старения [9].

В молодых (5-ти дневных) листьях экзогенные БАП и зеатин значительно активировали фермент (на 288 и 176 %), но общий уровень активности был не высоким (табл. 3). Активация БАП-ом гексокиназы в молодых листьях сопровождалась и повышением активности СФС, чего нельзя сказать про зеатин. По мере созревания и старения листьев активность гексокиназы стремительно повышалась и в 60-ти дневном листе ее уровень в 15,7 раза превышал активность 5-ти дневного. БАП и зеатин в старых листьях ингибировали гексокиназу на 40 %. То есть гормоны цитокининовой природы снижают степень активации гексокиназы в стареющих листьях.

Таблица 3

Удельная активность гексокиназы в онтогенезе листа сахарной свеклы (мкм продукта на 1 мг белка · мин)

Варианты	Возраст листа, дни			
	5	25	45	60
Контроль	0,67 ± 0,01/ 100	3,4 ± 0,05/ 100	7,3 ± 0,1/ 100	10,5 ± 0,5/ 100
БАП	2,6 ± 0,04*/ 388	2,8 ± 0,03/ 83	6,2 ± 0,1/ 85	6,4 ± 0,2/ 61
Зеатин	1,85 ± 0,05 /276	4,0 ± 0,02/ 119	6,4 ± 0,02/ 87	6,0 ± 0,2/ 57

Таким образом, экзогенные фитогормоны цитокининовой природы (БАП и зеатин) принимают участие в процессах поддержания целостности и стабильности молекул ДНК, оказывают существенное влияние на продление функциональной активности листьев сахарной свеклы путем активации синтеза сахарозы СФС-зой, снижают разрушение хлорофилла и ингибируют фермент гексокиназу, однако не оказывают влияние на избирательное метилирование сайт-специфичных последовательностей ДНК при старении листьев сахарной свёклы.

Литература

1. Ванюшин Б.Ф., Шортинг Б.Ю., Середина А.В., Александрушкина Н.И. Влияние фитогормонов и 5-ацитазина на апоптоз у этиолированных проростков пшеницы // Физиология растений. – 2002. – 46, № 4. – С. 558-564.
2. Искаков Б.К., Айтхожин М.А. Выделение белков информсом и анализ их с помощью двумерного электрофореза // Методы молекулярной биологии, биохимии и биотехнологии растений. Алма-Ата: Наука, 1988. – с.5.
3. Курсанов А.Л., Прасолова М.Ф., Павлинова О.А. Пути ферментативного превращения сахарозы в корне сахарной свеклы в связи с его аттрагирующей функцией // Физиология растений. – 1989. – 36, № 4. – С. 629-641.
4. Тищенко Е.Н., Топчий Н.Н. Старение листа сахарной свеклы: сайт-специфичность метилирования ДНК// Физиология и биохимия культ. растений. – 2001. – 33, №2. – С.170-175.
5. Daia N., Schaffer A., Petreicov M., Shahak L., et al. Overexpression of Arabidopsis hexokinase in tomato plants inhibit growth, reduces photosynthesis and induces rapid senescence // Plant Cell. – 1998. – 11, N 7. – P. 1253-1266.
6. Huber S.C., Nielsen T.H., Huber J.L.A. et al. Variation among species in light activation of sucrose phosphate synthase // Plant Cell Physiol. – 1989. – 30, N 2. – P. 277-285.
7. Paul M.J., Foyer C.H. Sink regulation of photosynthesis // J. Exp. Bot. – 2001. – 52, N 360. – P. 1383-1400.

8. *Quirino B.F., Noh G.S., Himelblau E., Amasino R.M.* Molecular aspects of leaves senescence // Elsevier Science. – 2000. – 5, N 7. – P. 278-282.
9. *Simeonova E., Mostowska A.* Biochemiczne i molekularne aspekty starzenia sie lisci // Post Biol. Komorki. – 2001. – 25, N 1. – P. 17-32.
10. *Wingler A., von Schaewen A., Leegood R.C., Lea P.J. and Quick P.* Regulation of leaf senescence by cytokinin, sugar and light // Plant Physiol. – 1998. – 116. – P. 329-335.
11. *Xiao W., Sheen J., Jang J.C.* The role hexokinase in plant sugar signal transduction and growth and development // Plant Mol. Biol. – 2000. – 44, N 4. – P. 451-461.

Резюме

Изучено влияние БАП и зеатина на метаболические процессы стареющих листьев сахарной свеклы. Установлено, что к концу онтогенеза листьев происходит разрушение ядер и яДНК, снижение содержания хлорофилла, инактивация сахарозофосфатсинтазы, активация гексокиназы. БАП и зеатин регулируют эти процессы, повышая функциональную активность стареющих листьев. Однако, эти регуляторы роста не влияют на метилирование цитозина в сайт-специфичных последовательностях ДНК

Вивчено вплив БАП і зеатина на метаболічні процеси старіючих листків цукрових буряків. Установлено, що в кінці онтогенезу листків відбувається руйнування ядер і яДНК, зниження вмісту хлорофілу, інактивация сахарозофосфатсинтази, активация гексокинази. БАП і зеатин регулюють ці процеси, підвищуючи функціональну активність старіючих листків цукрових буряків. Проте ці регулятори росту не впливають на метилування цитозину в сайт-специфічних послідовностях ДНК.

The effect of both benzyladenine (BA) and zeatin on the metabolic processes in the senescencing leaves of sugar beet has been studied. In the end of leave ontogeny the degradation of nucleuses and nDNA, chlorophyll decreasing, sucrose phosphate synthase inactivation, and hexokinase activation are found. BA and zeatin regulate these processes by increasing functional activity of senescence leaves of the sugar beet. However, these plant regulators don't have affect on cytosine methylation of site-specific sequences.

ЛАВРИНЕНКО Ю.О.

*Институт землеробства південного регіону УААН,
Україна, 73483, Херсон, Наддніпрянське, ІЗПР*

ОЦІНКА СЕРЕДОВИЩА, ЯК ФОНУ ДЛЯ ДОБОРУ ГІБРИДІВ КУКУРУДЗИ

Ідентифікацію параметрів адаптивності генотипів кукурудзи необхідно проводити за результатами випробувань в екологічному градієнті, який формується за допомогою агротехнічних заходів і найбільш повно відображає спектр агрокліматичних умов можливого розповсюдження генотипу. Сучасні агроекономічні умови вимагають широкого набору генотипів кукурудзи, що мають специфічну адаптованість до ґрунтово-кліматичних та технологічних чинників. В умовах південного регіону України головним фактором ліміту врожайності є волога [1, 2].

Метою досліджень було визначення параметрів мінливості та адаптивності нових гібридів кукурудзи за врожайністю зерна залежно від вологозабезпеченості та погодних умов року в південному Степу України.

Матеріали та методи

Дослідження проводились в 2004-2006 рр. на 8 гібридах ФАО 190-600. Параметри екологічної стабільності та пластичності визначали за загально визначеними методиками [3].

Результати та обговорення

Вивчення реакції окремих генотипів кукурудзи на водозабезпеченість показало, що спостерігається сильна генотип-середовищна реакція, яка може істотно змінювати ранжирування гібридів за рівнем врожайності (табл. 1).

Таблиця 1

Реакція генотипів кукурудзи різних груп ФАО на водозабезпеченість та погодні умови року

№ генотипів	Гібрид, фактор А	ФАО	Врожайність зерна при режимі зрошення та у окремі роки (номера середовища), ц/га (фактор В)											
			оптимальний режим				водозберігаючий				без зрошення			
			2004 р.	2005 р.	2006 р.	середнє	2004 р.	2005 р.	2006 р.	середнє	2004 р.	2005 р.	2006 р.	середнє
			1	2	3		4	5	6		7	8	9	
1	Тендра	190	99,4	90,6	86,9	92,3	97,9	83,3	82,3	87,8	55,7	38,3	34,9	43,0
2	Борисфен 191МВ	190	96,1	73,1	67,0	78,7	95,2	58,6	58,7	70,8	44,4	34,8	30,4	36,5
3	Борисфен 250МВ	280	109,8	106,9	103,0	106,6	104,3	96,9	95,2	98,8	48,9	37,5	34,0	40,1
4	Сиваш	280	111,8	108,2	107,4	109,1	100,4	98,6	96,9	98,6	57,4	41,1	34,0	45,6
5	Борисфен 380МВ	320	110,9	106,4	108,5	108,6	99,2	97,5	94,9	97,2	39,6	32,8	30,7	34,3
6	Азов	360	120,6	117,5	100,8	118,0	100,8	97,3	96,8	98,3	36,3	26,2	25,0	29,2
7	Борисфен 433МВ	430	121,1	119,2	121,9	120,7	95,9	94,9	97,1	95,9	35,1	24,8	23,6	27,8
8	Борисфен 600 СВ	550	136,6	131,7	131,5	133,3	82,5	77,2	70,5	76,7	36,1	13,8	13,5	21,1
	Середнє по фактору В		113,3	106,7	103,4	108,4	97,0	88,0	86,6	90,5	44,2	31,2	28,3	34,7
НІР ₀₅ , ц/га : 2004 р. фактор А = 1,94; В = 1,19; АВ = 3,37 2005 р. фактор А = 1,84; В = 1,13; АВ = 3,19 2006 р. фактор А = 1,80; В = 1,10; АВ = 3,11														

Так, найбільш високим потенціалом врожайності за оптимального режиму зрошення характеризувались гібриди з ФАО понад 400 (120-133,3 ц/га). Проте, вже при водозберігаючому режимі зрошення спостерігалось різке зменшення врожайності гібридів з ФАО понад 400, а перші місця за врожайністю посідали середньоранні та середньостиглі гібриди.

Найбільш значна зміна рангів відбувається при технологіях вирощування без зрошення. Найбільш універсальними є середньоранні гібриди, які досить ефективно використовують осінне-зимові запаси вологи, прискорено дозрівають наприкінці серпня і мають низьку збиральну вологість зерна. У сухі за погодними умовами роки рівень врожайності пізніх гібридів може знижуватись не адекватно генотиповому потенціалу. Це призводить до того, що добір високоврожайних гібридів з ФАО понад 400 в сухі за погодними умовами роки може бути не ефективним, а найбільш врожайною постає група ФАО 280-390, яка завдяки пластичності та меншому водоспоживанню у такі роки забезпечує найбільшу врожайність зерна.

Важливим питанням селекції є добір генотипів з певною реакцією на технологічне забезпечення та ґрунтово-кліматичні умови. При контрольованих умовах середовища доцільно проводити добір на специфічну адаптивну здатність (САЗ). Високу САЗ показали гібриди середньостиглої, середньопізньої та пізньостиглої групи,

тобто всі вони здатні підвищувати врожайність при поліпшенні умов вирощування (табл. 2). Відносна стабільність прогнозу реакції також притаманна цим гібридам.

Коефіцієнт пластичності (b_i) є найбільш інформативним показником реакції генотипів на зміну умов середовища. За коефіцієнтом пластичності гібриди були розподілені на групи: 1) гомеостатичні ($b_i < 1$); 2) інтенсивного типу ($b_i > 1$); 3) середньопластичні ($b_i = 1$).

Для одночасного добору на загальну адаптивну здатність та стабільність використовується показник “селекційна цінність генотипу” (СЦГ). Найбільш високу селекційну цінність у даних умовах проявив гібрид Сиваш, який досить стабільно проявляв відносно високу врожайність зерна у різних екоградієнтах. Гібриди такого типу можуть давати максимальні врожаї навіть при несприятливих умовах.

Загальна адаптивна здатність (ЗАЗ), показник, який поєднує усі попередні показники також був найвищим у гібриду Сиваш, що підкреслює його перспективність використання у даних агроекономічних умовах.

Таблиця 2

Адаптивні показники гібридів

№ гібриду	Гібрид	Специфічна адаптивна здатність, САЗ	Віднос-на стабільність	Коефіцієнт пластичності, b_i	Селекційна цінність генотипу, СЦГ	Варіанса взаємодії генотип * середовище	Середнє значення генотипу, ц/га	Загальна адаптивна здатність, ЗАЗ
1	Тендра	618,8	33,4	0,72	46,3	112,1	74,3	-3,25
2	Борисфен 191МВ	560,4	38,1	0,62	35,3	278,0	62,0	-15,5
3	Борисфен 250МВ	1013,3	38,9	0,93	45,9	19,2	81,8	4,21
4	Сиваш	950,3	36,7	0,91	49,2	24,1	83,9	6,35
5	Борисфен 380МВ	1206,4	43,3	1,02	40,87	21,5	80,1	2,43
6	Азов	1541,2	48,9	1,15	35,8	52,7	80,1	2,52
7	Борисфен 433МВ	1746,5	51,2	1,23	34,3	91,1	81,5	3,89
8	Борисфен 600СВ	2410,7	63,7	1,39	21,6	390,9	77,0	-0,57

Для удосконалення теорії добору велике значення має визначення середовища в якості фону для добору. Загальноприйнятим є поділ фону на стабілізуючий, на якому генотиповий поліморфізм популяції звужений стабілізуючими факторами; аналізуючий, який сприяє фенотиповому прояву генотипових задатків; нівелюючий, на якому відмінності між генотипами зведені до мінімуму. Селекціонерів, зазвичай, приваблює аналізуючий фон добору. Для оцінки середовища як фону для добору використовують показник ДЗС (диференціюючої здатності середовища). У наших дослідах ДЗС була найбільш високою за умов оптимального режиму зрошення (табл.3).

Таблиця 3

Оцінка середовища, як фону для добору

№ екоградієнту	ДЗС (диференціююча здатність середовища)	Варіанса взаємодії генотип * середовище	Показник прогнозованості	Фон
1	166,6	124,1	0,05	стабілізуючий
2	326,9	190,4	0,12	аналізуючий
3	396,8	243,5	0,14	аналізуючий
4	42,8	63,7	0,02	стабілізуючий
5	202,7	63,2	0,15	аналізуючий

6	217,0	80,7	0,15	аналізуючий
7	80,0	128,2	0,001	нівелюючий
8	81,7	134,1	-0,001	нівелюючий
9	52,9	103,2	-0,004	нівелюючий

Варіанса взаємодії “генотип x середовище” була найвищою у сухі роки за оптимального режиму зрошення (середовища № 2,3, табл. 1). Також значна взаємодія генотипу та екоградієнту спостерігалась у варіантах без зрошення. Проте, прогнозованість була позитивною на суходолі тільки у вологий 2004 рік (середовище № 7, табл. 1), а у сухі роки прогнозованість була від’ємною, що вказує на зміну рангів гібридів у богарних умовах.

При екоградієнті, який забезпечує рівень врожайності 60-80 ц/га, потенціал більшості гібридів знаходиться на межі розкриття. Оптимізація агрофону призводить до росту врожайності понад 120 ц/га у гібридів з генотиповими задатками високої врожайності і відриву їх від гомеостатичних. При зниженні фону нижче 50 ц/га проходить зміна рангів гібридів, що може привести до хибних висновків при доборах високоврожайних гібридів.

Висновки

Найбільш сприятливими фонами для добору генотипів кукурудзи різних груп стиглості та прогнозованою реакцією на технологічне забезпечення є умови оптимального режиму зрошення у роки, що характеризуються середніми (типовими) показниками кількості опадів та температури повітря у період вегетації. Визначено гомеостатичні гібриди, які характеризуються слабкою реакцією на зміни умов вирощування і забезпечують стабільні врожаї при погіршенні умов.

Література

1. *Лавриненко Ю.А., Гудзь Ю.В.* Теория и практика адаптивной селекции кукурузы. – Херсон: Борисфен-полиграфсервис. – 1997. – 170 с.
2. *Олешко О.Г.* Адаптивна характеристика гібридів кукурудзи, створених за участю лінії ДК 633//266-112 // Бюлетень Інституту зернового господарства. – 2003. – №21-22. – С. 65-69.
3. *Кильчевский А.В., Хотылева Л.В.* Метод оценки адаптивной способности и стабильности генотипов, дифференцирующей способности среды. // Генетика. — 1985. — Т. XXI, № 9. — С. 1481-1497.

Резюме

Наиболее благоприятными фонами для отбора генотипов кукурузы определенных групп спелости с прогнозированной реакцией на технологическое обеспечение являются условия оптимального режима орошения в годы, характеризующиеся средними (типичными) показателями количества осадков и температуры воздуха в период вегетации.

Найбільш сприятливими фонами для добору генотипів кукурудзи певних груп стиглості та прогнозованою реакцією на технологічне забезпечення є умови оптимального режиму зрошення у роки, що характеризуються середніми (типовими) показниками кількості опадів та температури повітря у період вегетації.

The study singles out homeostatic, high-plastic and medium-plastic hybrids characterized by an adequate reaction to changes in growing conditions.

МАЙОР П.С., Захарова В.П., Великожон Л.Г.

Інститут фізіології рослин і генетики НАН України,

ЗМІНА ВМІСТУ ПЕРОКСИДУ ВОДНЮ ТА АКТИВНОСТІ СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗИ І КАТАЛАЗИ У РОСЛИНАХ РІЗНИХ СОРТІВ ОЗИМОЇ ПШЕНИЦІ ПРИ ЗАГАРТУВАННІ

Температурні умови є одним із факторів, що можуть негативно впливати на ріст, розвиток і продуктивність сільськогосподарських культур. У літературі накопичено значний матеріал щодо дії на рослини екстремальних температур. Стійкість рослин до низьких від'ємних температур (морозостійкість) пов'язана зі здатністю, зокрема, озимих злаків, переносити довготривалий вплив від'ємних температур у стані припинення росту і глибокого спокою [5]. Морозостійкість – генетична ознака, яка проявляється лише за певних обставин. У природних умовах формування у рослинному організмі здатності переносити морози здійснюється задовго до їх настання. Одним із чинників, який викликає адаптивні перебудови у рослинах в процесі загартування, є зниження температури до низьких позитивних значень. В основі набуття морозостійкості рослинами знаходяться структурні та фізіолого-біохімічні зміни, обумовлені як специфічними, так і неспецифічними реакціями на екстремальні умови [4, 11].

Відомо, що продукція активних форм кисню є важливим компонентом загальної відповіді клітин на різні стресові чинники зовнішнього середовища. Встановлено, що активні форми кисню, такі як супероксидний аніон і пероксид водню, відіграють важливу роль у метаболізмі рослин, передачі сигналів та захисті клітин [10, 12]. Підтримання стаціонарного фізіологічно нормального рівня вільнорадикальних процесів в клітині забезпечується функціонуванням складної та високоспецифічної антиоксидантної системи, що включає низькомолекулярні речовини та ферменти [8, 13–16, 18, 19]. До найважливіших ферментів антиоксидантного захисту належать супероксиддисмутаза (СОД; КФ 1.15.1.1), каталаза (КФ 1.11.1.6), пероксидаза (КФ 1.11.1.7), аскорбатпероксидаза (КФ 1.11.1.11), які інактивують супероксидний аніон-радикал та пероксид водню. Для встановлення ролі антиоксидантних ферментативних систем у формуванні і реалізації холодо- і морозостійкості запропоновано кілька підходів [9, 13, 15, 16, 18, 19], у т.ч. із застосуванням генно-інженерних методів. Нашими попередніми дослідженнями [3] встановлено, що при проходженні першої фази загартування (при +3°C) у листках рослин відбувається деяке зростання вмісту продуктів пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ), причому така активація ПОЛ спостерігається переважно у менш морозостійких сортів. Зниження температури до –3°C супроводжувалось зменшенням інтенсивності ПОЛ. При загартуванні відмічено зростання активності як гваякол-, так і аскорбатпероксидази, причому відносно контролю активність пероксидаз збільшувалась більшою мірою у морозостійких сортів. Метою даної роботи було дослідити зміни вмісту пероксиду водню та активності СОД і каталази у рослинах при загартуванні та з'ясувати роль цих антиоксидантних ферментів у формуванні морозостійкості різних генотипів озимої пшениці.

Матеріали і методи

Об'єктом дослідження слугували зелені рослини озимої пшениці 12 сортів озимої пшениці, що відрізняються за морозостійкістю: Миронівська 808, Крижинка, Київська 7, Подолянка, Альбатрос одеський, Безоста 1, Донська напівкарликова, Експромт, Циганка, УК364, УК384, УК324. Рослини вирощували на сірому лісовому супіщаному ґрунті у пластмасових ящиках за штучного освітлення з 10-годинним фотоперіодом. Після появи третього листка рослини витримували 7–10 діб у термостатованій камері за температури +15°C (контроль). Загартовування рослин проводили при +2°C протягом тижня (1 фаза) та при –3°C протягом трьох діб (2 фаза). Після цього температуру знову підвищували до +2°C, при якій рослини витримували три доби (умови ремісії).

Температуру у камері для досягнення необхідних значень змінювали поступово зі швидкістю 2°C/год.

Для досліджень відбирали другий листок з 2–4 рослин п'яти варіантів: контроль, на друга і сьома доба першої фази загартування, третя доба другої фази загартування та третя доба ремісії при +2°C. У зразках із застосуванням спектрофотометричних методів визначали вміст пероксиду водню [17], активність СОД [6] та каталази [2]. Повторність дослідів 3–6-кратна. Дані експериментів оброблені статистично [1]. Рослини озимої пшениці, які вирощували у вегетаційному будиночку, після загартування у природних умовах осінньо-зимового періоду проморожували у камері низьких температур та після подальшого відрощування визначали морозостійкість сортів за часткою живих рослин.

Результати та обговорення

Досліджувані сорти належать до різних груп морозостійкості: від високої до нижче середньої, сорти з низькою морозостійкістю у даній роботі не використовували. Були підібрані такі умови загартування і проморожування зразків, коли частка живих рослин кожного сорту після проморожування становила від 15% до 90%. Цей показник був використаний у якості оцінки рівня морозостійкості сортів при визначенні коефіцієнтів кореляції.

Як показали результати експериментів активності ферментів каталази і супероксиддисмутази і вміст пероксиду водню можуть досить суттєво відрізнитись між сортами. Найбільша міжсортова варіабельність досліджуваних показників спостерігалась при проходженні рослинами другої фази загартування та в умовах ремісії при підвищенні температури від негативних значень до позитивних. У контрольному варіанті розмах між максимальним і мінімальним значенням по загальній виборці генотипів був найнижчим. Такі сортові відмінності переважно не зберігались між варіантами, що свідчить про їх випадковий характер. Тому для характеристики змін, які відбуваються у рослинах при загартуванні та ремісії, у більшості випадків правомірним є використання середніх значень досліджуваних показників для усього набору сортів.

Встановлено, що на другу добу загартування у листках рослин усіх досліджуваних сортів озимої пшениці відбувалось зростання активності каталази у середньому на 25%, зміни активності СОД та вмісту пероксиду водню у листках недостовірні (таблиця). Подальше витримування рослин за низької позитивної температури супроводжувалось поверненням активності каталази до початкового рівня, активність СОД в середньому залишалась на рівні контролю, а вміст пероксиду водню зростав в середньому на 58%. У контрольному варіанті відзначена незначна негативна кореляція між вмістом пероксиду водню у листках рослин та морозостійкістю сорту. Такий самий зв'язок відмічено між активністю СОД та морозостійкістю, активність каталази у контрольних рослинах слабо позитивно корелює з цим показником. Після двох діб витримування рослин при +2°C кореляція між активністю ферментів у листках та морозостійкістю сортів відсутня. На початку загартування дещо зростає негативна кореляція між вмістом пероксиду у листках і морозостійкістю, але сила цього зв'язку недостовірна (на 95%-ному рівні значимості). Наприкінці першої фази загартування, коли вміст пероксиду у листках зростає більше ніж наполовину, кореляція між цим показником і морозостійкістю стає позитивною ($r=0,342$). Більш тісно ($r=0,505$) корелюють між собою активність СОД та морозостійкість. Якщо проаналізувати залежність між морозостійкістю та відносними (до контролю) величинами вмісту пероксиду й активністю СОД, отримаємо більші значення коефіцієнтів кореляції – 0,467 і 0,759 відповідно. Останній коефіцієнт свідчить про значиму (на 99%-ному рівні) кореляцію між морозостійкістю сорту та відносною (до контролю) активністю СОД після семи діб загартування при низькій позитивній температурі. Це є відображенням того, що активність СОД у морозостійких сортів в кінці першої фази відносно

контролю загартування зростала, тоді як у менш морозостійких сортів знижувалась (у середньому ж для всіх сортів вона залишалась на рівні контрольного варіанта).

Таблиця

Вміст пероксиду водню й активність каталази і СОД у рослинах та коефіцієнти кореляції цих показників з морозостійкістю досліджуваних сортів озимої пшениці при загартуванні

Показник	Варіант				
	контроль (+15°C)	1 фаза загартування (+2°C), 2 доби	1 фаза загартування (+2°C), 7 діб	2 фаза загартування (-3°C), 3 доби	ремісія (+2°C), 3 доби
Середнє відносно контролю, %					
Вміст пероксиду водню	100	104	158	225	303
Активність каталази	100	125	99	136	140
Активність СОД	100	96	101	208	245
Коефіцієнт кореляції (<i>r</i>) з морозостійкістю					
Вміст пероксиду водню	-0,289	-0,469	0,342	-0,328	-0,229
Активність каталази	0,367	0,073	-0,021	-0,071	0,385
Активність СОД	-0,276	0,023	0,505	0,031	-0,505

Після трьох діб витримування загартованих рослин за температури -3°C відбувалось більш ніж двократне зростання відносно контрольного варіанту вмісту пероксиду водню та активності СОД у листках, активність каталази зростала у досліджуваних сортів лише на 36% від контрольного рівня. Зв'язок між цими показниками та морозостійкістю сортів у даному варіанті не спостерігався, лише для вмісту пероксиду водню відзначено слабку негативну залежність ($r=-0,328$). Повернення температурного режиму до низьких позитивних значень (+2°C) супроводжувалось на третю добу ще більшим зростанням вмісту пероксиду водню, активність ферментів залишалась приблизно на тому ж рівні, що й наприкінці другої фази загартування. Кореляція даних показників з морозостійкістю сортів характеризувалась майже такими ж коефіцієнтами, що й у контролі, і лише активність СОД у цьому варіанті більш тісно негативно корелювала з морозостійкістю ($r=-0,505$). Отримані нами дані дещо розходяться з результатами, наведеними у роботі [9], в якій повідомлялося про деяке зростання коефіцієнта кореляції до $r=0,631$ між морозостійкістю й активністю каталази у листках загартованих рослин порівняно до контролю ($r=0,249$). Як повідомили дослідники, активність каталази у листках при загартуванні знижувалась, наші ж результати свідчать про відсутність впливу першої фази загартування на активність цього ферменту. На нашу думку, причиною таких розходжень є використання у цитованій роботі не лише генотипів озимої пшениці, а й інших культур з високою та низькою морозостійкістю.

Висновки

Таким чином, дослідження динаміки вмісту пероксиду водню та активності антиоксидантних ферментів СОД і каталази у рослинах озимої пшениці 12 сортів, що належать до трьох груп морозостійкості (висока, середня і нижче середньої) показало, що з другої фази загартування відбувається монотонне зростання цих показників. Для

пероксида водню відмічено збільшення його вмісту в листках уже наприкінці першої фази загартування. Повернення температури з від'ємних до низьких позитивних значень призводило до трикратного порівняно з контролем зростання вмісту пероксида у листках, активність СОД зростала майже у 2,5 рази, тоді як активність каталази – менш ніж наполовину. Менша, порівняно із СОД, активація каталази в умовах загартування може свідчити про меншу участь цього ферменту в адаптивних перебудовах за дії знижених температур. Найбільшу кореляцію з морозостійкістю виявлено для відносної щодо контролю активності СОД після семи діб першої фази загартування. Це дозволяє пропонувати даний показник для оцінки морозостійкості генотипів озимої пшениці.

Література

1. *Доспехов Б.А.* Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований). – М.: Колос, 1979. – 416 с.
2. *Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарев В.Е.* Метод определения активности каталазы // Лабораторное дело. – 1988. – № 1. – С. 16–18.
3. *Майор П., Захарова В., Великожон Л.* Вміст пероксида водню та активності пероксидази і каталази у рослинах озимої пшениці при загартуванні // Онтогенез рослин в природному та трансформованому середовищі. Фізіолого-біохімічні та екологічні аспекти: III Міжнародна конференція (4–6 жовтня 2007 р., Львів, Україна). – Львів, 2007. – С. 158.
4. *Майор П.С., Захарова В.П., Великожон Л.Г.* Дослідження накопичення проліну і цукрів у генотипів озимої пшениці, що відрізняються за рівнем морозостійкості // Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології. Збірник наукових праць. – Київ: Логос, 2007. – Т. 1. – С. 121–128.
5. *Трунова Т.И.* Физиологические и биохимические основы адаптации растений к морозу // С.-х. биология. – 1984, № 6. – С. 3–10.
6. *Чевари С., Чаба И., Секей Й.* Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах клетки и метод определения ее в биологических материалах // Лабораторное дело. – 1985. – № 11. – С. 678–681.
7. *Baek K.-H., Skinner D.Z.* Alteration of antioxidant enzyme gene expression during cold acclimation of near isogenic wheat lines // Plant Science. – 2003. – **165**. – P. 1221–1227.
8. *Couee I., Sulmon C., Gouesbet G.* Involvement of soluble sugars in reactive oxygen species balance and responses to oxidative stress in plants // J. Exp. Bot. – 2006. – **57**, N 3. – P. 449–459.
9. *Janda T., Szalai G., Rios-Gonzalez K. et al.* Correlation between frost tolerance and antioxidant activities in cereals // Acta Biologica Szegediensis. – 2002. – **46**, N 3–4. – P. 67–69.
10. *Hancock J.T., Desikan R., Neill S.J.* Role of reactive oxygen species in cell signalling pathways // Biochem. Soc. Trans. – 2001. – **29**. – P. 345–350.
11. *Hughes M.A., Dunn M.A.* The molecular biology of plant acclimation to low temperature // J. Exp. Bot. – 1996. – **47**, N 296. – P. 291–305.
12. *Hung S.-H., Yu C.-W., Lin C.H.* Hydrogen peroxide functions as a stress signal in plants // Bot. Bull. Acad. Sin. – 2005. – **46**. – P. 1–10.
13. *Kuk Y.I., Shin J.S., Burgos N.R. et al.* Antioxidative enzymes offer protection from chilling damage in rice // PlantsCrop Sci. – 2003. – **43**. – P. 2109–2117.
14. *Noctor G., Foyer C.H.* Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. – 1998. – **49**. – P. 249–279.
15. *Matsumura T., Tabayashi N., Kamagata Y. et al.* Wheat catalase expressed in transgenic rice can improve tolerance against low temperature stress // Physiologia Plantarum. – 2002. – **116**, N 3. – P. 317–327.
16. *McKersie B.D., Bowley S.R., Jones K.S.* Winter survival of transgenic alfalfa overexpressing superoxide dismutase // Plant Physiology. – 1999. – **119**. – P. 839–847.

17. *Sagisaka S.* The occurrence of peroxide in a perennial plant, *Populus gelrica* // Plant Physiol. – 1976. – **57**. – P. 308–309.
18. *Scebba F., Sebastiani L., Vitagliano C.* Changes in activity of antioxidative enzymes in wheat (*Triticum aestivum*) seedlings under cold acclimation // Physiol. Plant. – 1998. – **104**. – P. 747–752.
19. *Soltész A, Kocsy G., Szalai G. et al.* Comparison of the antioxidant capacity in cold-treated recombinant wheat lines // Acta Biologica Szegediensis. – 2005. – **49**, N 1–2. – P. 117–119.

Резюме

Встановлено, що у рослинах озимої пшениці в процесі загартування відбувається збільшення вмісту пероксиду водню та зростання активності супероксиддисмутази і каталази. Активність останнього ферменту збільшується меншою мірою, ніж активність супероксиддисмутази. Найбільша активація цих ферментів та збільшення вмісту пероксиду водню відзначені при проходженні рослинами другої фази загартування та при подальшому підвищенні температури до низьких позитивних значень.

Установлено, что в растениях озимой пшеницы в процессе закаливания происходит увеличение содержания пероксида водорода и повышение активности супероксиддисмутази и каталазы. Активность последнего фермента возрастает в меньшей степени, чем активность супероксиддисмутази. Наибольшая активация этих ферментов и увеличение содержания пероксида водорода отмечены при прохождении растениями второй фазы закаливания и при последующем увеличении температуры до низких положительных значений.

It was shown that the increase in the level of hydrogen peroxide and in activities of catalase and superoxide dismutase occurs in winter wheat plants during cold acclimation. Superoxide dismutase exhibited more significant increase in the activity compared to catalase. The activation of these enzymes and the content of hydrogen peroxide in plants were highest during second phase hardening and the following return of temperature to subzero values.

МАМЕДОВА А.Д., МАМЕДОВА Н.Х., ГАСАНОВА Г.И.

Институт Генетических Ресурсов НАН Азербайджана,

Азербайджан, AZ 1106, Баку, пр. Азадлыг 155, e-mail: Naila.Xurshud@yahoo.com

РЕЗУЛЬТАТЫ ИЗУЧЕНИЯ СТЕПЕНИ УСТОЙЧИВОСТИ СОРТОВ ХЛОПЧАТНИКА ВИДА *G.hirsutum* L. К БИОТИЧЕСКИМ И АБИОТИЧЕСКИМ ФАКТОРАМ СРЕДЫ

Вид хлопчатника *G.hirsutum* L. наиболее распространен в культуре. Первоначальный ареал естественного произрастания этого вида – территория Мексики. Из всего производимого в мире хлопкового волокна на долю *G.hirsutum* L. приходится примерно 70%. Важнейшие хозяйственные признаки у различных сортов этого вида имеют следующие показатели: скороспелость (число дней от посева до начала созревания) от 100 до 155 и более, крупность коробочек (масса хлопка-сырца в коробочке) от 3 до 12 г и более, выход волокна от 25 до 42-45%.

Районы возделывания этого вида значительно различаются по климату и ряду других особенностей. Культура его ведется в орошаемых и богарных условиях при весьма различной обеспеченности атмосферными осадками, в тропической полосе и за ее пределами, доходя в обоих полушариях до самых крайних географических широт хлопкового поля земного шара [4].

Проблема повышения урожайности хлопчатника выдвигает необходимость введения в производство урожайных сортов, устойчивых к действию биотических и абиотических факторов среды. Болезни хлопчатника, засуха, засоление наносят значительный ущерб хлопководству.

Наиболее вредоносными болезнями хлопчатника являются вертициллезный и фузариозный вилт. Вертициллезный вилт – широко распространенное заболевание хлопчатника, интенсивность распространения и вредоносность которого зависят от устойчивости культивируемого сорта к возбудителю – *V.dahliae Klebahn*, фузариозный вилт вызывается грибом *F.oxysporum f.vasinfestum*. Степень развития и вредоносность вертициллезного и фузариозного вилта зависят от устойчивости возделываемого сорта, сроков проявления болезней, погодных условий года и уровня культуры земледелия [3].

На пораженных вертициллезным вилтом кустах вначале появляется беловатая пятнистость, которая переходит в некрозы, приводящие к полному отмиранию листьев и их опадению. Рост растения прекращается и оно погибает.

Вред, причиняемый фузариозным вилтом, выражается в поражении молодых растений, вызывая гибель всходов, в снижении качества волокна и его крепости, ухудшаются посевные качества семян (абсолютная масса, всхожесть и энергия прорастания).

Значительный ущерб хлопководству наносят такие условия внешней среды как засуха и засоление, которые приводят к замедлению роста и развития растения, изменению качества хлопка-сырца и волокна, уменьшению длины и его крепости. В связи с этим, нами проводилась оценка 100 сортов хлопчатника вида *G.hirsutum L.* коллекции Института на устойчивость к действию неблагоприятных факторов среды (вилту, засухе, засолению).

Материалы и методы

Наблюдения по выявлению сортов, устойчивых к вилту, проводились по общепринятой методике [1] – пятибальной шкале на искусственно инфекционном фоне на различных этапах вегетационного развития хлопчатника, оценка устойчивости к засухе и засолению – по показателям стресс-депрессии всхожести семян и биосинтеза хлорофилла у проростков в растворе сахарозы, имитирующего недостаток влаги, и в растворе NaCl [2].

Результаты и обсуждение

Создание экстремальных условий, необходимых и достаточных для проявления уровня устойчивости, позволили нам провести сравнительную оценку устойчивости к действию неблагоприятных факторов среды и выявить сорта, устойчивые к комплексу отрицательных факторов среды. Так например, такие сорта хлопчатника как AzNIXI-142, AzNIXI-187, AzNIXI-201, AzNIXI-175 и другие проявили себя как иммунные. Для этих сортов отмечена 100% устойчивость к вертициллезному и фузариозному вилту.

Сорта Todla-18, Pima 5-1, AzNIXI-154, AzNIXI-165, AzNIXI-190, AzNIXI-198, AzNIXI-199, AzNIXI-200, Deltapine-15, 164-fn и другие устойчивы к вилту.

Процент пораженных растений, в общем числе исследованных, колеблется у них в пределах 1-25%.

Наиболее восприимчивыми к болезням оказались сорта 03655-S.NIXI, S-34213 China, Portugal Arb., Acala-5, Acala-1517, Deltapain-90, Гянджа-107, 73468, Ташкент-9.

При сильной степени заболевания, когда опадают все листья, растения очень угнетены и не плодоносят.

Исследование степени устойчивости к абиотическим факторам среды по физиологическим показателям показало высокую засухоустойчивость сортов AzNIXI-170, S-5348, An Samarqand 2, AzNIXI-142, Aspero, Todla-18, Pima-32, Pima 5-1, 3038, AzNIXI-33 и других .

Сорта 149-F, S-256, AzNIXI-170, AP-350, MA-62, AP-353, AP-347, Coker-100, Allen-150, S-2607 и другие выделены как солеустойчивые. Степень депрессии всхожести семян в стрессовых условиях у этих сортов либо полностью отсутствует, либо незначительна (до 15%).

Анализ изученных образцов на комплексную устойчивость к действию абиотических факторов среды показал, что сорта S-5348, AzNIXI-170, An Samarqand 2, AzNIXI-142, 9732 I, Todla -18, 711/1, 7318 v-1, Агдаш-21, Pima-32, S-6035/1, Pima 5-1, AP-350, MA-62 оказались устойчивыми к засухе и засолению.

Оценка реакций различных сортов на стрессовое воздействие по комплексу иммунологических и физиологических показателей показала устойчивость сортов AzNIXI-142, Todla-18, Pima 5-1 к вилту, засухе и засолению.

Создание экстремальных условий, необходимых и достаточных для проявления уровня устойчивости, позволили нам провести сравнительную оценку устойчивости к действию неблагоприятных факторов среды и выявить сорта, устойчивые к комплексу отрицательных факторов. Эти сорта могут быть использованы в качестве доноров в селекции хлопчатника.

Литература

1. Доброзракова Т.Л. Сельскохозяйственная фитопатология. - Ленинград: Колос.-1966. - 327 с.
2. Методическое руководство «Диагностика устойчивости растений к стрессовым воздействиям» (под редакцией Г.В Удовенко). - Ленинград. - 1988. - 227 с.
3. Пересыпкин Ф.М. Сельскохозяйственная фитопатология. - Москва: Агропромиздат. - 1989. - 480 с.
4. Шлейкер А.И. Распространение, основные морфологические, биологические и хозяйственные особенности культивируемых в СССР видов хлопчатника. //Хлопководство.- Москва: Колос.- 1983. - С. 123-129.

Резюме

В работе представлены результаты комплексной оценки 100 сортов хлопчатника вида *G.hirsutum L.* коллекции Института на устойчивость к вилту, засухе и засолению. Сорта хлопчатника AzNIXI-142, Todla-18, Pima 5-1 выделены как устойчивые к биотическим и абиотическим факторам среды.

The assessment result of 100 varieties of *G.hirsutum L.* cotton of Institute collection of resistance to wilt, drought, salinity. Cotton varieties AzNIXI-142, Todla-18, Pima 5-1 have been selected like resistant ones to biotic and abiotic factors of the environment.

МАРКОВА О.А.

Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина,
Украина, 61077, Харьков, пл. Свободы, 4, e-mail: arabesca@gala.net

РЕПРОДУКТИВНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ ВОЛНИСТЫХ ПОПУГАЙЧИКОВ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ДЛЯ РАЗМНОЖЕНИЯ ОСОБЕЙ, МУТАНТНЫХ ПО РЕДКИМ ГЕНАМ ОКРАСКИ ОПЕРЕНИЯ

У сельскохозяйственных птиц породы часто характеризуются определённой окраской оперения. У волнистых попугайчиков не выделяют отдельных пород, у этого вида известно около 20 генов, ответственных за изменение окраски оперения (Вегерс, 1987; Винс, 2003). Большинство мутаций оперения на территории Украины можно отнести к редко встречающимся. Разнообразие окрасок потомства зависит только от особенностей формирования пар для разведения, а именно от цветовых предпочтений разводчика и системы скрещивания. Часто основу поголовья составляют птицы дикого

фенотипа. Нежелание оставлять для разведения особей волнистых попугайчиков, мутантных по редким генам окраски, может быть связано с опасением снижения репродуктивных показателей.

Имеются данные о результатах исследования влияния генов окраски оперения на ценные, хозяйственно-полезные количественные признаки у различных видов сельскохозяйственных птиц: кур, уток, индеек. Была доказана ассоциация окраски оперения со скоростью роста птенцов, массой яиц, жизнеспособностью и массой тела птиц (Кочиш, 1992; Коган, 1979; Merat P. 1970; Smyth, 1969).

Целью данного исследования было выяснить, изменяет ли использование для размножения волнистых попугайчиков редких окрасок: серокрылых, коричных и перламутровых, - такие репродуктивные показатели: количество яиц в кладке, оплодотворённость и выводимость яиц, количество вылупившихся и выращенных до момента вылета из гнезда птенцов в кладке, выживаемость птенцов до момента вылета из гнезда.

Материалы и методы

Исследования проводились на волнистых попугайчиках (*Melopsittacus undulatus* Show, 1805) с 2001 по 2007 год в течение шести сезонов размножения. Генотипы и фенотипы различных мутаций окраски оперения, анализируемых в исследовании, представлены в таблице 1. Условные обозначения генотипов взяты из литературных источников или обозначены самостоятельно, исходя из приведенного в литературных источниках характера наследования (Вегерс, 1987; Винс, 2003).

Анализ репродуктивных показателей проводился в 10 типах скрещиваний. Всего было проведено 246 скрещиваний, в которых было выращено 1465 птенцов. Типы скрещиваний и суммарные данные по количеству проанализированных кладок, количеству снесённых яиц, вылупившихся и вылетевших из гнёзд птенцов представлены в таблице 2. Под обычной подразумевается птица, не имеющая серокрылый, коричный или перламутровый фенотип. Первый тип скрещиваний является контрольным. Следует также отметить, что средняя плодовитость одной пары составляет 15 – 20 птенцов в год.

Оплодотворённость определяли как отношение количества оплодотворённых яиц к общему количеству снесённых яиц. Выводимость определяли как отношение количества вылупившихся птенцов к общему количеству оплодотворённых яиц. Выживаемость птенцов определяли как отношение количества вылупившихся птенцов к количеству птенцов, вылетевшему из гнезда (Буртов и др., 1990).

Проверку нулевых гипотез проводили на уровне значимости $p < 0,05$. Влияние типа скрещивания на репродуктивные показатели оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа количественных и качественных признаков с использованием критерия Фишера. В случае выявления значимого влияния типа скрещивания на признак разницу средних арифметических и долей исследуемых групп с контрольной группой оценивали методом Шеффе.

Таблица 1

Генотипы и фенотипы мутаций окраски оперения у волнистых попугайчиков, анализируемых в исследовании

Название мутации	Ген, обуславливающий признак	Генотипы и фенотипы	Фенотипическое проявление
Серокрылый	Аутосомный ген, рецессивный, полиаллельная система	<i>OnOn</i> , <i>OnOg</i> , - чернокрылый <i>OgOg</i> , - серокрылый	Серый рисунок на крыльях, осветление основного цвета на 2/3.
Коричный	Ген сцеплен с полом, рецессивный, диаллельная система	<i>KK</i> - обычный самец <i>Kk</i> - обычный самец, расщепляющийся на коричных <i>kk</i> - коричный самец <i>ky</i> - коричная самка <i>Ky</i> - обычная самка	Коричневый рисунок на крыльях, осветление основного цвета на 1/3.

Перламутровый	Аутосомный ген, кодоминантный, диаллельная система	<i>PP</i> – одноцветный темноглазый <i>Pp</i> – перламутровый <i>pp</i> – обычная птица	На каждом пере крыла имеется окантовка.
---------------	--	---	---

Таблица 2

Типы скрещиваний и численность выборок

№	Тип скрещивания самец × самка	Количество кладок	Количество яиц	Количество вылупившихся птенцов	Количество вылетевших птенцов
1	обычный × обычная	21	145	128	121
2	обычный × коричная	21	154	118	111
3	обычный × серокрылая	19	154	109	102
4	серокрылый × обычная	19	139	113	100
5	серокрылый × обычная/серокрылых	23	203	169	159
6	обычный/серокрылых × серокрылая	36	287	231	220
7	коричный × обычная	36	305	249	235
8	обычный/коричные × коричная	20	167	131	118
9	перламутровый × обычная	32	241	195	187
10	обычный × перламутровая	19	141	117	112

Примечание: / - расщепляющийся (- щаяся)

Результаты и обсуждение

Значения репродуктивных показателей, полученных в разных типах скрещивания представлены в таблице 3. Проведённый дисперсионный анализ показал значимое влияние типа скрещивания на число яиц в кладке ($p < 0,001$), количество вылупившихся птенцов ($p < 0,05$), а также на выводимость яиц ($p < 0,05$). В целом можно отметить, что результаты контрольных скрещиваний характеризуются наименьшим числом яиц в кладке – 6,90 яиц; и наибольшим показателем выводимости яиц – 97,71%. Среднее количество яиц в кладке выше по сравнению с контролем в скрещиваниях серокрылых самцов и обычных самок, расщепляющихся на серокрылых ($p < 0,05$) и составляет 8,83 яйца. В скрещиваниях коричных самцов и обычных самок среднее количество яиц в кладке также значимо выше по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$) и составляет 8,47 яйца. Показатели скрещиваний с участием перламутровых птиц значимо не отличаются от контроля. Среднее количество вылупившихся птенцов в анализируемых группах значимо не отличается от среднего значения контрольной группы. Тип скрещивания не влияет на оплодотворённость яиц и выживаемость птенцов. В скрещиваниях обычных самцов и серокрылых самок показатель выводимости яиц ниже на 12,2%, по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$).

Таблица 3

Репродуктивные показатели анализируемых скрещиваний

№	Среднее количество яиц в кладке	Оплодотворённость яиц, %	Выводимость птенцов, %	Среднее количество вылупившихся птенцов в кладке	Среднее количество вылетевших птенцов в кладке	Выживаемость птенцов, %
1	6,90	90,34	97,71	6,10	5,76	94,53
2	7,33	89,61	85,51	5,62	5,29	94,07
3	8,11	86,36	81,95*	5,74	5,37	93,58
4	7,32	87,05	93,39	5,95	5,26	88,46
5	8,83*	90,14	92,35	7,35	6,91	94,08
6	7,97	90,94	88,51	6,42	6,11	95,24
7	8,47*	91,48	89,25	6,92	6,53	94,38
8	8,35	92,22	85,06	6,55	5,90	90,08
9	7,53	90,04	89,86	6,09	5,84	95,90
10	7,42	91,49	90,69	6,16	5,89	95,73

Примечания: № - номер типа скрещивания (смотри табл. №2), * - разница с контролем (скрещивание №1) значима на уровне $p < 0,05$.

Таким образом, в результате проведенной работы было доказано, что использования для разведения коричневых, перламутровых и серокрылых особей значимо не изменяет среднее количество выращенных птенцов в кладке по сравнению с контролем. К сожалению, некоторые гены окраски волнистых попугайчиков на Украине можно отнести к вымирающим, в частности и те, которые анализировались в данной работе. Увеличение доли редких расцветок в группах птиц, оставляемых для размножения, должно стать приоритетным направлением селекции волнистых попугайчиков и способствовать сохранению генофонда этого вида.

Литература

1. Буртов Ю.З., Голдин Ю.С., Кривошипин И.П. Инкубация яиц. – М.: "Агропромиздат", 1990. - 239с
2. Вегерс, Зд. Разведение волнистых попугайчиков. – М.: Лесная промышленность, 1987. – 175с.
3. Винс, Т. Волнистые попугайчики / пер. с нем. – М.: ООО "АКВАРИУМ БУК", 2003. – 152 с.
4. Коган З.М. Признаки экстерьера и интерьера у кур (генетика и хозяйственное значение). – Новосибирск: Наука, 1979. – 295 с.
5. Кочин И.И. Селекция в птицеводстве. – М.: Колос, 1992.- 272 с.
6. Merat P. Mendelian genetics and selection for quantitative traits in poultry: Results and perspectives. // World's Poultry Science Journal. – 1970. – vol. 26. – P. 571 – 586.
7. Smyth J. R. Relationships Between Genes Affecting Melanin Pigmentation and Other Traits in the Fowl // World's Poultry Science Journal. – 1969. – vol. 25. – P. 6–14.

Резюме

Проводили скрещивания обычных волнистых попугайчиков и птиц с редкими мутациями окраски оперения: серокрылых, коричневых и перламутровых. Показано, что использование для размножения мутантных особей не снижает производительности птиц. Выявлено значимое увеличение среднего количества яиц в кладке в скрещиваниях серокрылых самцов и самок, расщепляющихся на серокрылых птиц.

Проводили скрещування звичайних хвилястих папужок та птахів з рідкісними мутаціями забарвлення оперення: сірокрилих, коричневих та перламутрових. Показано, що використання для розмноження мутантних особин не зменшує продуктивність птахів. Виявлено вірогідне збільшення кількості яєць в скрещуваннях сірокрилих самців та самиць, що розщеплюються на сірокрилих птахів.

Crossings between normal budgerigars and birds with rare colour mutations: greywing, cinnamon and spangle, - have been analyzed. It has been shown, that using mutant birds do not change productivity of the nestlings. Significant increase of the eggs quantity has been observed in the crossings between greywing males and normal females, splitting on the greywing birds.

МЩЕНКО С.В., ВИРОВЕЦЬ В.Г., ЛАЙКО І.М., КИРИЧЕНКО Г.І., ОНУПРІЄНКО Л.Г.

Інститут луб'яних культур УААН,

Україна, 41400, Сумська обл., м. Глухів, вул. Терещенків, 45, e-mail: ibc@sm.ukrtel.net

ОЦІНКА ПЕРСПЕКТИВНИХ СОРТІВ КОНОПЕЛЬ ЗА ОСОБЛИВОСТЯМИ ЦВІТІННЯ

Збір та збереження генетичного різноманіття рослин має виключно важливе значення як для окремої країни, так і для людства в цілому. Реалізація селекційних програм, кінцевою метою яких є, в першу чергу, вирішення продовольчих, загальноекономічних і навіть соціальних проблем, неможливе без надійних джерел вихідного матеріалу, зокрема банків генетичних ресурсів рослин. Крім того, колекції генетичних ресурсів мають важливе наукове та освітньо-пізнавальне значення. У зв'язку з цим роботи по збору, збереженню, вивченню та забезпеченню ефективного використання колекцій генетичних рослинних ресурсів є пріоритетними проблемами рослинництва. Широке використання світового генофонду рослин сприяє підвищенню ефективності процесів селекції при створенні не тільки сортів інтенсивного типу, а й сортів, завдяки яким одержують екологічно чисту продукцію.

Створення нових сортів конопель, які б відповідали сучасним вимогам сільського господарства та легкої промисловості, можливе лише на основі всебічного вивчення та правильного підбору вихідного матеріалу із національної колекції, і використанні досягнень сучасної селекції, генетики, фізіології та інших наук. Базова колекція конопель Інституту луб'яних культур нараховує станом на 2006 р. 454 зразки із 27 країн світу, в т.ч. 145 із України, 65 – із СНД і 244 - з інших країн. До складу колекції входить 312 зразків дводомної та 142 – одnodомної форм. Ознакова колекція за високим вмістом волокна в стеблах нараховує 51 зразок українського походження і 2 зразки – за національним каталогом 0600022 і 0600439 – угорського походження. Ознакова колекція з пониженим вмістом канабіноїдних сполук сформована із 30 зразків українського походження. Характеристика зразків колекції конопель у каталогах подається за такими ознаками: форма конопель (дводомна чи одnodомна), загальна висота в см, урожайність в г/м² стебел, насіння та довгого волокна, вихід довгого волокна у %, якість волокна (розривне навантаження (даН), лінійна щільність (текс), номер, сорт), маса 1000 насінин в г, вміст канабіноїдів (КБД, ТГК, КБН) в балах, відсоток рослин, пошкоджених шкідниками (конопляною блохою і стебловим метеликом) і уражених хворобами (фузаріозом, дендрофомозом, гнилями).

Сьогодення вимагає створення сортів одnodомних конопель стабільних за ознакою одnodомності. Однією з особливостей селекційної роботи, направленої на стабілізацію даної ознаки, є бажане виключення запилення жіночих квіток плоскістю одnodомних конопель, відбір одnodомних рослин зі зближеними строками зацвітання чоловічих і жіночих квіток домінуючого статевого типу, щоб надати можливість вільного перезапилення між рослинами одnodомної фемінізованої матірки. Постає проблема пошуку зразків із згаданими характеристиками (ця ознака у певній мірі передається потомству). Ось чому ми виявили новаторський підхід до оцінки генетичних ресурсів, зокрема вивчали нові сортозразки за особливостями цвітіння чоловічих і жіночих квіток.

Матеріали і методи

У дослідженні використаний ряд сучасних сортозразків одnodомних конопель, які за даними селекційного сортовипробування характеризуються найвищою продуктивністю та комплексом господарсько-цінних ознак. До них увійшли сорти: ЮСО-31 (№ каталогу Інституту луб'яних культур 00259), Глухівські одnodомні 18 (00298), Глухівські 58 (00453), Гляна (00452), Глухівські 46 (00255), Глера (00297),

Глухівські 51 (00454), Глухівські 33 (00306), Золотоніські ЮСО-11 (00262). У фазі бутонізації етикували по 30 рослин, відмічали дату появи першої чоловічої та жіночої квітки, відцвітання останніх квіток на суцвітті, появу першої та останньої насінини серед рослин однодомної фемінізованої матірки (ОФМ), справжніх однодомних фемінізованих рослин (СОФР), однодомної фемінізованої плосконі (ОФП). Зближеними строками зацвітань квіток обох статей вважали тоді, коли жіночі квітки розкриваються на 1-3 доби раніше чоловічих, пізніше чоловічих і одночасно з чоловічими. Кореляційний зв'язок встановлювали між: 1) тривалістю цвітіння жіночих і чоловічих квіток; 2) тривалістю цвітіння жіночих квіток і тривалістю дозрівання насіння; 3) тривалістю цвітіння чоловічих квіток і тривалістю дозрівання насіння.

Результати та обговорення

Встановлено, що раннє розкриття жіночих квіток (більше ніж на 3 доби) спостерігається не тільки у однодомної фемінізованої матірки, а й у справжніх однодомних фемінізованих рослин, хоча у меншій мірі, та однодомній фемінізованій плосконі окремих сортів у незначного відсотка рослин (табл. 1). Рослин однодомної фемінізованої матірки з такою особливістю виявлено від 6,2% (сорт Золотоніські ЮСО-11) до 52,2% (сорт Глухівські 51).

Таблиця 1

Розрив у строках зацвітань жіночих і чоловічих квіток (2005-2007 рр.)

Сорт	Статевий тип	Кількість рослин зі зближеними строками цвітіння, %				одночасне зацвітання
		усього	з раннім розкриттям жіночих квіток (на 1-3 доби)	з раннім розкриттям чоловічих квіток		
				1-3 доби	>3 діб	
ЮСО-31	ОФМ	70,9	36,4	14,5	9,1	10,9
	СОФР	80,0	30,0	30,0	10,0	10,0
	ОФП	100,0	0	14,3	64,3	21,4
Глухівські однодомні 18	ОФМ	48,9	28,9	4,5	4,4	11,1
	СОФР	94,7	10,5	36,8	21,1	26,3
	ОФП	100,0	16,7	0	33,3	50,0
Глухівські 58	ОФМ	69,8	28,3	24,5	1,9	15,1
	СОФР	90,0	20,0	40,0	10,0	20,0
	ОФП	100,0	0	42,9	42,8	14,3
Гляна	ОФМ	56,9	36,2	8,6	5,2	6,9
	СОФР	92,9	42,9	14,3	0	35,7
	ОФП	100,0	12,5	12,5	50,0	25,0
Глухівські 46	ОФМ	71,4	61,9	4,7	2,4	2,4
	СОФР	95,5	31,8	22,8	9,1	31,8
	ОФП	96,0	8,0	32,0	48,0	8,0
Глера	ОФМ	71,7	39,6	9,4	5,7	17,0
	СОФР	82,4	35,3	17,7	11,8	17,6
	ОФП	100,0	10,0	10,0	70,0	10,0
Глухівські 51	ОФМ	47,8	30,4	8,7	2,2	6,5
	СОФР	76,2	33,3	4,8	19,1	19,0
	ОФП	100,0	33,4	8,3	58,3	0
Глухівські 33	ОФМ	72,2	61,1	5,5	2,8	2,8
	СОФР	96,4	35,7	21,4	14,3	25,0
	ОФП	87,5	6,3	6,2	62,5	12,5
Золотоніські ЮСО-11	ОФМ	93,8	25,0	29,2	25,0	14,6
	СОФР	95,7	8,7	8,7	73,9	4,4
	ОФП	93,7	6,2	0	87,5	0

Зближені строки зацвітання квіток обох статей у більшій мірі характерні для справжніх однодомних фемінізованих рослин (від 76,2% у сорту Глухівські 51 до 96,4% у сорту Глухівські 33) та однодомної фемінізованої плосконі (від 87,5% у сорту Глухівські 33 до 100,0% у шести сортів). Відсоток рослин зі зближеними строками зацвітання жіночих і чоловічих квіток однодомної фемінізованої матірki у різних сортів зростає у такій послідовності: Глухівські 51 (47,8%), Глухівські однодомні 18 (48,9%), Гляна (56,9%), Глухівські 58 (69,8%), ЮСО-31 (70,9%), Глухівські 46 (71,4%), Глера (71,7%), Глухівські 33 (72,2%), Золотоніські ЮСО-11 (93,8%).

Серед рослин однодомної фемінізованої матірki найбільше виявлено рослин з розкриттям жіночих квіток раніше на 1-3 доби у сорту Глухівські 46 (61,9%), а найменше – у сорту Золотоніські ЮСО-11 (25,0%), серед справжніх однодомних фемінізованих рослин найбільше таких особин у сорту Гляна (42,9%), найменше у сорту Золотоніські ЮСО-11 (8,7%). Серед однодомної фемінізованої плосконі не виявлено таких рослин у сортів ЮСО-31 та Глухівські 58. Більш раннє розкриття чоловічих квіток (на 1-3 доби раніше за жіночі) характерне практично для всіх досліджуваних статевих типів різних сортів, але не в однаковій мірі. Чоловічі квітки розкриваються раніше жіночих більше ніж на 3 доби в однодомної фемінізованої плосконі усіх сортів (від 33,3% у сорту Глухівські однодомні 18 до 87,5% у сорту Золотоніські ЮСО-11). Відмічені рослини такого типу і серед справжніх однодомних фемінізованих рослин та однодомної фемінізованої матірki.

Відмічені рослини і з одночасним зацвітанням квіток обох статей. У однодомної фемінізованої матірki кількість таких особин не перевищує 17,0%.

Таким чином, найбільш зближені строки цвітіння квіток обох статей домінуючого статевого типу у сортів ЮСО-31, Глухівські 58, Глухівські 46, Глера, Глухівські 33, Золотоніські ЮСО-11 (близько 70% і більше). У сучасних сортів цілеспрямовані добори привели до значного зближення строків зацвітання чоловічих і жіночих квіток у однодомної фемінізованої матірki.

Середній обернений кореляційний зв'язок існує між тривалістю цвітіння жіночих квіток і тривалістю цвітіння чоловічих квіток у сортів ЮСО-31, Глухівські однодомні 18, Глухівські 51, Золотоніські ЮСО-11, сильний обернений – у решти досліджуваних сортів (табл. 2). Коефіцієнт кореляції знаходиться в межах від $-0,54$ (сорт ЮСО-31) до $-0,85$ (Глухівські 58). Сортам Глухівські однодомні 18, Глухівські 51, Золотоніські ЮСО-11 притаманний середній прямий кореляційний зв'язок між ознаками тривалості цвітіння жіночих квіток і тривалістю дозрівання насіння, у решти сортів – сильний прямий зв'язок. Коефіцієнти кореляції при цьому коливаються від $0,53$ (сорт Глухівські однодомні 18) до $0,87$ (Глухівські 58). Несподіваним виявилось те, що між тривалістю цвітіння чоловічих квіток і тривалістю дозрівання насіння існує середній обернений кореляційний зв'язок (від $r = -0,41$ у сорту Золотоніські ЮСО-11 до $r = -0,68$ у сорту Глухівські 46), у сорту Глухівські 58 – він сильний обернений.

Таким чином, тривалість цвітіння жіночих і чоловічих квіток залежить від статевого типу, а точніше від їх співвідношення у суцвітті. Чим довше цвітуть жіночі квітки, тим коротший період цвітіння чоловічих і навпаки. Між тривалістю цвітіння жіночих квіток і тривалістю дозрівання насіння прямий зв'язок. Це можемо пояснити тим, що значна тривалість цвітіння жіночих квіток, спричинена їх численністю на рослині, приводить до розтянутого строку дозрівання і навпаки. Чим довше цвітуть чоловічі квітки, тим коротший період дозрівання насіння, а довго вони цвітуть в однодомної фемінізованої плосконі, де насіння зав'язується зовсім мало і т.п.

Отримані дані дають підстави стверджувати, що ступінь зв'язку між досліджуваними ознаками залежить від сорту і майже не залежить від умов року. Наприклад, для сорту Глухівські однодомні 18 характерний середній кореляційний зв'язок і відносно невисокі коефіцієнти кореляції. Між першою і другою ознаками у 2005 р. $r = -0,64$, у 2006 р. $r = -0,77$, у 2007 р. $r = -0,48$; між першою і третьою – $r = 0,45$,

$r = 0,52$ і $r = 0,62$ відповідно; між другою і третьою – $r = -0,32$, $r = -0,35$ і $r = -0,65$ відповідно. Для сорту Глухівські 58 завжди характерні сильні кореляційні зв'язки і відносно високі коефіцієнти. Відповідно між першою і другою ознаками $r = -0,91$, $r = -0,93$ і $r = -0,71$; між першою і третьою $r = 0,92$, $r = 0,87$ і $r = 0,82$; між другою і третьою $r = -0,95$, $r = -0,85$ і $r = -0,76$.

Таблиця 2

Кореляційний зв'язок між тривалістю цвітіння і дозрівання (2005-2007 рр.)

Сорт	Коефіцієнт кореляції (r)		
	1	2	3
ЮСО-31	-0,54	0,73	-0,51
Глухівські однодомні 18	-0,63	0,53	-0,44
Глухівські 58	-0,85	0,87	-0,85
Гляна	-0,72	0,71	-0,65
Глухівські 46	-0,72	0,72	-0,68
Глера	-0,72	0,73	-0,59
Глухівські 51	-0,55	0,66	-0,43
Глухівські 33	-0,71	0,72	-0,58
Золотоніські ЮСО-11	-0,60	0,65	-0,41

1 – між тривалістю цвітіння жіночих і чоловічих квіток; 2 – між тривалістю цвітіння жіночих квіток і дозрівання насіння; 3 – між тривалістю цвітіння чоловічих квіток і дозрівання насіння. Значення достовірні на 5-ти процентному рівні.

Взагалі, за всіма трьома парами досліджуваних ознак коефіцієнти кореляції наближаються до одиниці у сорту Глухівські 58. У такого сорту порушити зв'язки між тривалостями цвітіння та дозрівання насіння селекційним втручання буде важче, ніж у сортів з середніми кореляційними зв'язками. До них належать сорти Глухівські однодомні 18, Глухівські 51, Золотоніські ЮСО-11. Вони можуть бути рекомендовані для селекції на зміну вегетаційного періоду, на стабілізацію ознаки однодомності. У сортів із сильними кореляційними зв'язками можливе послаблення контролю за корекцією цвітіння квіток.

Коефіцієнти кореляцій ознак тривалості цвітіння квіток і досягання насіння у певних сортів допомагають спланувати роботу із корекції строків цвітіння чи зацвітання жіночих і чоловічих квіток у популяції для маніпулювання процесами перезаплення між статевими типами.

Висновки

Сорти ЮСО-31, Глухівські 58, Глухівські 46, Глера, Глухівські 33, Золотоніські-11 рекомендуються у якості джерел і донорів ознаки зближених строків цвітіння чоловічих і жіночих квіток однодомної фемінізованої матірки. До сортів із середніми кореляційними зв'язками тривалостей цвітіння і дозрівання належать сорти Глухівські однодомні 18, Глухівські 51, Золотоніські ЮСО-11. Вони рекомендуються для селекції на скоростиглість шляхом відбору рослин з тривалим періодом цвітіння жіночих квіток (що забезпечує високу насінневу продуктивність) і незначним часом дозрівання насіння, або, навпаки, на збільшення тривалості вегетаційного періоду, для селекції на стабілізацію ознаки однодомності шляхом добору рослин однодомної фемінізованої матірки з тривалим періодом цвітіння як жіночих, так і чоловічих квіток, що забезпечить “насичення” популяції пилком цього статевого типу тощо.

Резюме

Выделены образцы из коллекции генетических ресурсов конопли со сближенными сроками цветения мужских и женских цветков однодомной феминизированной матерки, установлены корреляционные связи между продолжительностью цветения и созревания семян.

Виділені зразки з колекції генетичних ресурсів конопель зі зближеними строками цвітіння чоловічих і жіночих квіток однодомної фемінізованої матірки, встановлені кореляційні зв'язки між тривалостями цвітіння і дозрівання насіння.

Samples of hemp genetic researches with absence of the staminate monoecious hemp with drawn together periods of flowering of male and female flowers of the monoecious feminized pestillate hemp are given. Correlation communications between flowering and seeds ripening duration are set.

МОЛОДЧЕНКОВА О.О., АДАМОВСЬКА В.Г., ЛИТВИНЕНКО М.А., ЦІСЕЛЬСЬКА Л.Й., СОЛОМОНОВ Р.В., БЕЗКРОВНА Л.Я.

Селекційно-генетичний інститут-Національний центр насіннезнавства та сортовивчення УААН,

Україна, 65036, Одеса, Овідіопольська дорога 3, e-mail: adam@paco.net

ВЗАЄМОЗВ'ЯЗОК МІЖ БІЛКОВО-ФЕРМЕНТНИМ КОМПЛЕКСОМ ОЗИМОЇ ПШЕНИЦІ ТА СТІЙКІСТЮ ДО ФУЗАРІОЗУ

Серед факторів, лімітуючих врожай пшениці в степовій зоні України, найбільш шкочинними є фітозахворювання, зокрема фузаріоз. Селекція стійких до збудників фузаріозу сортів є економічно вигідним та екологічно безпечним напрямком боротьби з фітозахворюванням. Успіх селекційної роботи на стійкість до фузаріозу залежить від ефективності методів визначення реакції різних генотипів на вторгнення патогену та формування рослиною механізмів стійкості на різних етапах взаємодії рослини та патогену. Припускається кількісний характер успадкування та домінуюча полігенна система генетичного контролю ознаки стійкості до фузаріозу [1]. Рівень стійкості рослин до фузаріозу, а також механізми її формування забезпечуються багатьма біохімічними показниками, які відповідають за збереження життєздатності та перебудову метаболізму рослин в умовах патогенезу. В адаптаційних процесах рослин при зараженні патогенами важливу роль відіграють такі реакції, як утворення патогенезозалежних білків, збільшення рівня фенолів, активація ферментів (протеаз, фенілаланінаміакліази), зміни в окислювально-відновних процесах [2]. Вважається, що у формуванні механізмів стійкості до фітозахворювань беруть участь інгібітори протеїназ та лектини. Встановлено, що ці білки захищають рослини від ураження патогенами і що їх вміст у насінні генетично детермінований [3,4].

Метою даної роботи було встановлення взаємозв'язку між активністю інгібітора трипсину, лектинів, фенілаланінаміакліази (ФАЛ), нейтральної протеази в генотипах пшениці, які достовірно відрізнялися за стійкістю до фузаріозу (при зараженні відповідними збудниками) та стійкістю до фузаріозної інфекції та відбір більш специфічних показників стійкості для подальшого їх використання для оцінки селекційного матеріалу.

Дослідження проводили на 13 генотипах пшениці, які достовірно відрізнялися за стійкістю до захворювання. Стійкі генотипи: лінія 5/20-91, 7 генотипів, створених від схрещування сорту ярої пшениці Superb з чистими лініями озимої пшениці, що мають гени стійкості до фузаріозу. Сприйнятливі генотипи: Харківська 26, Елегія МIRONIVSЬКА, Рання 73, Дніпрянка, Колективна 3.

Рослини вирощували при 24°C на воді (контроль) і на інфекційному фоні (сильнопатогенний штам K90 *Fusarium graminearum*).

Активність інгібітора трипсину визначали за зменшенням швидкості гідролізу синтетичного субстрату БАПА ферментом у присутності інгібітора, котрий екстрагували з контрольного та інфікованого зерна на 2 добу пророщування [5].

Лектини виділяли з зародків зерна, замоченого у воді на ніч (контроль) та в суспензії патогену. Активність лектинів визначали за їх здатністю агглютинувати трипсинізовані еритроцити білих пацюків (при кімнатній температурі). За лектинову активність брали величину, зворотною мінімальній концентрації білка, при якій відбувається агглютинація еритроцитів (мкг білка/мл)⁻¹. Еритроцити одержували та трипсинізували за методикою [6].

ФАЛ екстрагували з 4-добових проростків, вирощених на воді (контроль) та на суспензії патогену. Активність ФАЛ визначали за методичними принципами, які використані Цукерманом у нашій модифікації. Активність ФАЛ виражали відношенням одиниць екстинції на мг білка ($\Delta E/mg$) [7].

Нейтральну протеазу екстрагували з надземної частини 6-добових проростків пшениці, вирощених на воді та суспензії патогену. Активність нейтральної протеази визначали за допомогою реактиву Фоліна - за приростом в надосадовій рідині продуктів гідролізу 2% казеїну (рН 6,0), які не висаджувалися 5% ТХУ. Активність ферменту виражали в нанокаталах на 1г ліофільно висушеної маси проростків [8].

Вміст білка в екстрактах визначали за методом Лоурі.

Досліди проводили в 2-3-кратній для кожного сорту біологічній та 4-кратній аналітичній повторності.

Один із важливих захисних механізмів злакових культур при фузаріозі - зростання вмісту білків, які інактивують ферменти, виділені патогеном. До таких білків відносяться інгібітори протеаз. Генетичний аналіз показника інгібітора трипсину (ІТ) в насінні озимої пшениці, проведений шляхом схрещування контрастних за вмістом ІТ сортів, показав, що коефіцієнт успадкування ознаки досить високий ($H^2=0.81-0.91$). Була встановлений тісний кореляційний зв'язок між вмістом ІТ та стійкістю генотипів озимої пшениці до фузаріозу ($r=0.87$) [9]. Вивчення рівня інгібіторів трипсину (ІТ) в насінні генотипів пшениці, отриманих шляхом схрещування сорту ярої пшениці Superb з лініями озимої пшениці, що мають гени стійкості до фузаріозу, при зараженні збудниками фузаріозу показало, що найбільш високим рівнем індукції цього показника під дією патогену відрізнялася лінія 5/20-91 (збільшення активності ІТ в 2,45 рази відносно контролю). В гібридах, отриманих від схрещування сорту ярої пшениці Superb з лініями 5/20-91 та 1/74-91, середній показник активації ІТ сягав 111% до контролю. У сприйнятливих генотипах пшениці середній показник індукції ІТ на фоні патогену був 103% від контролю. За результати досліджень був встановлений позитивний кореляційний зв'язок ($r=0,57$ при $p=0,01$) між активністю інгібітора трипсину в насінні, вирощеному на інфекційному фоні, та показниками фітопатологічної оцінки, які характеризують стійкість генотипів до фузаріозу. Отримані результати підтвердили наші попередні дані про суттєвіше збільшення рівня ІТ у стійких генотипів у порівнянні зі сприйнятливими [9], але рівень відмінності активності ІТ на інфекційному фоні між досліджуваними гібридами та сприйнятливими генотипами пшениці був незначний.

У відповідних реакціях рослин при патогенезі беруть участь лектини - білки зі специфічними біологічними властивостями, які зворотно і вибірково зв'язують вуглеводи, не викликаючи їх хімічного перетворення. Дослідження активності лектинів зародків пшениці на інфекційному фоні виявило, що стійкі генотипи пшениці відрізнялися більш низькою активністю лектинів за дії патогену в порівнянні зі сприйнятливими генотипами. Так, активність лектинів при інфікуванні лінії 5/20-91 складала 21% від контролю. Середній рівень активності лектинів зародків пшениці на інфекційному фоні у вивчених стійких гібридах складала 57,1%, хоч у одного з гібридів - F6(Superb x 1/74-91) активність лектинів складала 17,2% відносно контролю. У сприйнятливих до фузаріозу генотипів пшениці середній рівень активності лектинів складав 98% від контролю. За результати досліджень був встановлений позитивний кореляційний зв'язок ($r=0,70$ при $p=0,01$) між активністю лектинів в насінні,

вирощеному на інфекційному фоні, та показниками фітопатологічної оцінки, які характеризують стійкість генотипів до фузаріозу. Ці дані свідчать про участь лектинів зародків у взаємостосунках рослина - патоген при патогенезі, що призводить до порушення метаболізму та, у підсумку, синтезу або пригніченню синтезу лектинів, і можливість використання цього показника при відборах стійких генотипів пшениці.

Адаптаційні можливості рослин значною мірою визначаються рівнем стабільності структури та кінетичних здатностей ферментів. Зокрема відомо, що протеолітичні ферменти беруть участь у формуванні стійкості до фітозахворювань [10]. Визначення активності нейтральної протеази в надземній частині проростків досліджуваних генотипів пшениці показав, що у лінії 5/20-91 рівень активності ферменту при дії фузаріозної інфекції зростає в 1,56 рази в порівнянні з контролем, а в гібридах активність нейтральної протеази практично не змінювалася. У сприйнятливих генотипів пшениці середній рівень активності нейтральної протеази складає 86% відносно контролю, але у деяких генотипів (Елегія Міронівська та Колективна 3) вона залишалася практично на рівні контролю. Ці результати свідчать про наявність тенденції до збільшення активності нейтральної протеази на інфекційному фоні у стійких генотипів пшениці в порівнянні зі сприйнятливими, але використовувати для добору в селекції цей показник неможливо.

Посилення утворення фенольних сполук та процесів лігніфікації при інфікуванні рослин патогенами в багатьох випадках пов'язане зі зростанням активності ключового ферменту фенольного метаболізму – фенілаланінаміакліази. ФАЛ бере участь в утворенні попередників саліцилової кислоти, фітоалексинів, мономерів лігніну, які зміцнюють механічні та хімічні бар'єри клітин рослин. Припускають, що підвищення стійкості рослин можна спробувати досягти шляхом посилення активності ферментів фенольного метаболізму, таких як ФАЛ [11]. Проведене визначення активності ФАЛ в надземній частині та коріннях проростків при інфікуванні збудниками фузаріозу показало, що у стійкої до фузаріозу лінії 5/20-91 активність ферменту зростала в 1,28 рази в надземній частині проростків та в 1,56 – у коріннях. Активність сумарної індукції ФАЛ складала 160 % відносно контролю. У стійких гібридів пшениці середній рівень індукції ФАЛ в надземній частині проростків складає 125,9%, а в коріннях - 139,5%, але серед гібридів зустрічалися генотипи, у яких спостерігалася різнохарактерна картина зміни активності ферменту в надземній частині та коріннях проростків. Сумарна активність ферменту на інфекційному фоні у стійких генотипів складала 119,7% відносно контролю. У сприйнятливих генотипів пшениці спостерігали зменшення активності ферменту на інфекційному фоні як в надземній частині, так і в коріннях проростків, за винятком надземної частини проростків сорту Дніпрянка. Сумарна активність ФАЛ у сприйнятливих генотипів була в 1,5 рази нижче в порівнянні з сумарною активністю стійких генотипів (середня активність складала 81% відносно контролю). Встановлений позитивний кореляційний зв'язок ($r=0,77$ при $p=0,03$) між сумарною активністю ФАЛ в проростках, вирощених на інфекційному фоні, та показниками фітопатологічної оцінки. З отриманих результатів можна зробити висновок, що визначення сумарної активності ФАЛ проростків на інфекційному фоні є більш інформативним для оцінки селекційного матеріалу.

Таким чином, в результаті проведених досліджень встановлені диференційовані зміни вивчених біохімічних показників у різних за стійкістю генотипів пшениці в залежності від стійкості до фузаріозу, що свідчить про їх участь в формуванні захисних реакцій рослин озимої пшениці при зараженні збудниками фузаріозу. Найбільш достовірні відмінності між даними генотипами, які відрізнялися за стійкістю до фузаріозу, були отримані за зміною активності лектинів у зародках пшениці при інфікуванні збудниками фузаріозу та сумарної активності ФАЛ в інфікованих проростках.

Література

1. *Євтушенко М.Д., Лісовий М.П., Пантелєєв В.К., Слюсаренко О.М.* Імунітете рослин. – К.: Колобiг, 2004. – 304 с.
2. *Ильинская Л.И., Васюкова Н.И., Озерецковская О.А.* Биохимические аспекты индуцированной устойчивости и восприимчивости растений //Итоги науки и техники. Серия Защита растений. - М: ВИНТИ, 1991.С. 4- 78.
3. *Мосолов В.В.* Ингибиторы протеолитических ферментов как защитные белки растений / Фитонциды.Бактериальные болезни растений: Материалы конф.Львов. 1990. С.50-51.
4. *Хайруллин Р.М., Шакирова Ф.М., Максимов И.В., Безрукова М.В., Ямалеев А.М.* Изучение содержания лектина, абсцизовой и индолилуксусной кислот в растениях пшеницы, инфицированных *Septoria S. nodorum*. Berk//Физиология и биохимия культурных растений. 1993. Т. 25. N 2. С. 138-144.
5. *Левицкий А.П.* Методы определения ингибиторов трипсина. Сб.научн.тр.“Биохимические методы исследования селекционного материала”. – Одесса:ВСГИ. 1979. – Т.15. – С. 68-72.
6. *Луцк М.Д.,Панасюк Е.Н., Луцк А.Д.* Лектины. -Львов:Вища школа, 1981.-155 с.
7. *Zucker M.* Induction of phenylalanine deaminase by light its regulation to chlorogenic acid synthesis in potato tuber tissue // Plant Physiology/ - 1965. - № 5. - V. 40. – P. 779-784.
8. *Вовчук С.В.* Определение активности протеолитических ферментов в зерне злаковых культур// Биохимические методы исследования селекционного материала. Тр.ВСГИ. – Одесса: ВСГИ, 1979. – 15. – С.59-67.
9. *Адамовская В.Г., Клечковская Е.А., Молодченкова О.О., Вовчук С.В.* Изменение протеиназно-ингибитор- ной системы озимой пшеницы под действием салициловой кислоты и *Fusarium* // Физиология растений. 2000. Т.47. N 2. С. 210-215.
10. *Серова З.Я., Юшко Л.С., Подчуфарова Г.М.* Функции белков в фитопатогенезе. – Минск.; Наука і техніка. 1992. – 34-45.
11. *Fellegrini L.* La phenylalanin ammoniac-lyase (PAL) et l’O-methyltransferase (OMT) de classe II du Tabac, des enzymes du metabolisme phenolique impliquees dans la defense antimicrobienne: clonage des cDNA et etude de la regulation spatio-temporelle des genes’//. These de l’Universite Louis Pasteur. Strasbourg.France. 1994.

Резюме

Вивчено комплекс біохімічних показників, що відповідають за стійкість до фітозахворювань (активність інгібітору трипсина, лектинів, фенілаланінаміакліази, нейтральної протеази), в генотипах пшениці, які достовірно відрізнялися за стійкістю до фузаріозу. Знайдені більш специфічні для пшениці біохімічні показники, за допомогою яких можливо оцінювати генотипи пшениці на стійкість до фузаріозу.

Изучен комплекс биохимических показателей, отвечающих за устойчивость к фитозаболеваниям (активность ингибитора трипсина, лектинов, фенилаланинаммиаклиазы, нейтральной протеазы), в генотипах пшеницы, достоверно различающихся по устойчивости к фузариозу. Найдены более специфичные для пшеницы биохимические показатели, с помощью которых можно проводить оценку генотипов пшеницы на устойчивость к фузариозу.

The complex of biochemical indexes responsible for resistance to phytodiseases (trypsin inhibitors' activity, lectins' activity, phenylalanineammonialyase activiyy, neutral protease activity) in the wheat genotypes which reliable differed for resistance to *Fusarium* is studied. More specific for a wheat biochemical indexes by which it is possible to conduct the estimation of wheat genotypes' resistance to *Fusarium* spp. was found.

МОРГУН В.В., ШАДЧИНА Т.М., ДМИТРИЕВА В.В., ПРЯДКИНА Г.А.
Институт физиологии растений и генетики Национальной академии наук Украины
Украина, 03022, Киев, ул. Васильковская, 31/1, e-mail: phot-ecol@ifrg.kiev.ua

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПОГЛОЩЕНИЯ И УТИЛИЗАЦИИ АЗОТА У ВЫСОКОУРОЖАЙНЫХ СОРТОВ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ УКРАИНСКОЙ СЕЛЕКЦИИ

Проблемы обеспечения роста объемов продовольствия темпами, соответствующими скорости роста численности населения на Земле, а также сохранение экологической чистоты окружающей среды на нашей планете, являются одними из наиболее актуальных для человечества. Решение их предусматривает выращивание высоких урожаев сельскохозяйственных культур, в том числе, зерновых, с использованием экологически чистых технологий, основанных на внесении удобрений в строгом соответствии с потребностями растений в течение вегетации, а также внедрении сортов с высокой эффективностью использования элементов питания, в частности, азота. Последний является одним из наиболее важных макроэлементов. Его недостаток приводит к существенному снижению урожая. В то же время дозы вносимого в почву азота должны быть оправданы с точки зрения экономии удобрений для обеспечения высокой экономической эффективности производства растительной продукции, а также предотвращения загрязнения почвы и вод нитратными формами неиспользованного азота.

В мире пшеница занимает особое место среди злаков. Ей принадлежит более четверти от общего объема производства зерновых и она является главным источником пищи для более чем 1,5 млрд. человек на Земле [8]. Благодаря успехам "зеленой революции" в 60-е годы прошлого столетия был сделан существенный скачок в повышении урожайности этой культуры. Созданные короткостебельные сорта отличались высоким коэффициентом хозяйственно-ценного урожая и способностью давать высокий урожай в условиях загущенных посевов. Особенностью современных сортов пшеницы является улучшенная эффективность использования азота [4, 7, 8], под которой понимают способность посева производить урожай зерна в расчете на единицу доступного азота в почве [5]. Эта эффективность определяется способностью растений поглощать азот почвы и превращать его в урожай зерна [7].

В Украине в последнее десятилетие достигнуты весомые успехи в селекции озимой пшеницы. Созданные совместными усилиями селекционеров Института физиологии растений и генетики НАН Украины и Мироновского Института пшеницы им. В.М. Ремесла новые сорта пшеницы позволяют получать урожай зерна свыше 100 ц/га. Исследования особенностей фотосинтеза и продукционного процесса у контрастных по продуктивности сортов озимой пшеницы выявили тесную взаимосвязь между зерновой продуктивностью и величиной хлорофилльного потенциала, который определяется величиной листовой поверхности, продолжительностью жизни зеленых листьев и содержанием хлорофилла в них [3]. Известно, что содержание хлорофилла зависит от обеспеченности растений азотным питанием, при этом между концентрацией общего азота и хлорофилла в листьях в пределах каждой фазы вегетации существует тесная корреляционная связь [2]. Линейная зависимость между этими параметрами сохранялась также и при одновременном рассмотрении разных сортов. Следует отметить, однако, что исследования были проведены на растениях, выращенных в разных условиях обеспеченности азотным питанием, и генотипические различия могли маскироваться фенотипическими, обусловленными различиями в уровне азотного питания. Поэтому вопрос генотипических особенностей взаимосвязи между содержанием азота и хлорофилла в листьях разных сортов до последнего времени оставался открытым. Не изучены также особенности поглощения и реутилизации азота, от

которых зависит эффективность его использования в растениях озимой пшеницы сортов отечественной селекции.

Целью данной работы было сравнение показателей эффективности использования азота у контрастных по зерновой продуктивности сортов озимой пшеницы отечественной селекции. Для решения этих задач исследования были проведены на растениях отличающихся по продуктивности сортов озимой пшеницы, выращенных в одинаковых почвенно-климатических условиях при идентичном уходе за посевами.

Материалы и методы

Объектами исследований были растения сортов озимой пшеницы отечественной селекции Фаворитка, Володарка, Смуглянка, Мироновская 808 и гибридной линии УК-273. Сорт Смуглянка – короткостебельный, высокоинтенсивного типа, среднеранний. Он внесен в реестр сортов Украины в 2004 году. Фаворитка – среднестебельный, степной, интенсивного типа, среднеспелый сорт. Внесен в реестр в 2005 году. Аналогичные характеристики и у сорта Володарка, отличающегося от предыдущего меньшей высотой стебля. Линия гибрида УК-273 - среднерослая, раннеспелая. Оригинаторами всех этих генотипов являются Институт физиологии растений и генетики НАН Украины и Мироновский Институт им. В.М. Ремесла УААН. В качестве контроля был использован созданный в 1963 г. в Мироновском Институте пшеницы сорт Мироновская 808. Это среднепоздний сорт с высотой растений выше средней.

Пшеницу выращивали на участках одного поля с дерново-подзолистой почвой. Площадь каждого из участков составляла 10 м² (2006 г.) и 3 м² (2007 г.), повторность – 3х-кратная. Норма высева семян составляла 5,5 млн. шт./га. Дозы минеральных удобрений, внесенных под посев каждого из сортов, в 2006 году составляли 90 кг азота, фосфора и калия на гектар, в 2007 - 120 кг азота и по 90 кг фосфора и калия.

Содержание хлорофилла в листьях определяли путем спектрометрирования экстрактов пигментов, полученных из высечек листьев известной площади, в диметилсульфоксиде [9]. Общий азот определяли методом Кьельдаля [1]. Полученные данные использовали для исследования корреляционной связи между этими параметрами.

В фазу восковой спелости зерна определяли сырую и сухую надземные массы растений на 1 м², количество общего азота в ней, а также массу зерна и количество накопленного в нем общего азота. На основании этих данных определяли различные индексы, характеризующие сорта по урожайности и эффективности усвоения и использования азота [6]. Эффективность поглощения азота оценивали по отношению общего количества азота в надземной массе к общему количеству доступного азота в почве. Эффективность утилизации азота рассчитывали как отношение урожая зерна к общему азоту в надземной биомассе; индекс урожая - отношение массы зерна к надземной массе растения; азотный индекс урожая – отношение количества азота в зерне к общей надземной массе; эффективность продукции биомассы – отношение общей надземной биомассы к общему количеству азота в надземной части растения.

Результаты и обсуждения

Данные по зерновой продуктивности сортов озимой пшеницы, полученные за два года исследований, приведены в таблице 1.

В целом зерновая продуктивность всех сортов в 2006 году была ниже, чем в 2007 году. При этом наиболее низкой урожайностью характеризовался сорт Мироновская 808, а наиболее высокой, близкой между собой - сорта Фаворитка и Володарка. Гибрид УК-273 в ранге величин зерновой продуктивности занимал промежуточное положение между ними и сортом Мироновская 808. Такой порядок в расположении сортов по продуктивности сохранился и во второй год исследований. Средняя за два года зерновая продуктивность в пересчете на центнеры с 1 га у сорта Фаворитка составила 93 ц/га, у сорта Володарка - 90, у гибрида УК-273 - 73 и, наконец, у сорта Мироновская 808 - 51 ц/га. По сравнению с Мироновской 808, зерновая продуктивность сортов Фаворитка и

Володарка была в среднем на 80% выше, а Смуглянки и УК-273 - на 40%. Таким образом, исследуемые генотипы условно можно разделить на 3 группы: высокопродуктивные сорта - Фаворитка и Володарка, продуктивные генотипы - Смуглянка и УК-273 и малопродуктивный сорт Мироновская 808.

Таблица 1.

Зерновая продуктивность и индекс хозяйственно ценного урожая у разных сортов озимой пшеницы.

Сорт	Зерновая продуктивность, г/м ²				Индекс хозяйственно ценного урожая			
	2006		2007		2006		2007	
	г/м ²	%*	г/м ²	%*	г/м ²	%*	г/м ²	%*
Фаворитка	824±72	196	1041±55	172	0,46	144	0,53	115
Володарка	788±68	188	1008±35	167	0,43	134	0,53	115
Смуглянка	-	-	850±38	141	-	-	0,49	107
УК-273В	644±36	153	823±11	135	0,47	147	0,49	107
Мироновская 808	404±30	100	605±11	100	0,32	100	0,46	100

* - % относительно сорта Мироновская 808.

Исследуемые сорта отличались также по величине индекса хозяйственно ценного урожая. В 2006 году наиболее высокие значения индекса урожая были у гибрида УК-273 (0,47) и Фаворитки (0,46). Самым низким индексом урожая, как и величиной зерновой продуктивности, характеризовался сорт Мироновская 808 - 0,39. В 2007 году индексы урожая наиболее высокими были у сортов Фаворитка и Володарка (0,53), затем шли сорт Смуглянка и гибридная линия УК-273 – 0,49. Самый низкий индекс урожая был у сорта Мироновская 808 (0,46). Средняя за два года величина индекса хозяйственно ценного урожая для Фаворитки составила 0,50, для Володарки, УК-273 и Смуглянки – по 0,48, а для Мироновской 808 – 0,39.

Отличия между сортами наблюдались и в величинах содержания хлорофилла и общего азота в листьях, особенно в репродуктивный период. В отдельные фазы вегетации отмечена тесная положительная корреляция между этими биохимическими параметрами. Так, например коэффициент корреляции между концентрацией общего хлорофилла и азота в листьях в фазу молочно-восковой спелости составил $r = 0,97$ (рис.1). Этот факт можно трактовать как свидетельство того, что зависимость между содержанием хлорофилла в листьях растений озимой пшеницы является видоспецифичной и не зависит от сорта. А отличия в содержании хлорофилла в листьях разных сортов являлись следствием разного азотного статуса растений, обусловленные не различиями в содержании азотного питания в почве, а разной эффективностью его усвоения из нее.

Данные по сухой биомассе надземной части растений, суммарному количеству накопленного азота в ней и в зерне, а также вычисленные на их основе показатели, позволяют оценить эффективность усвоения и реутилизации азота у отличающихся по продуктивности генотипов озимой пшеницы (табл. 2).

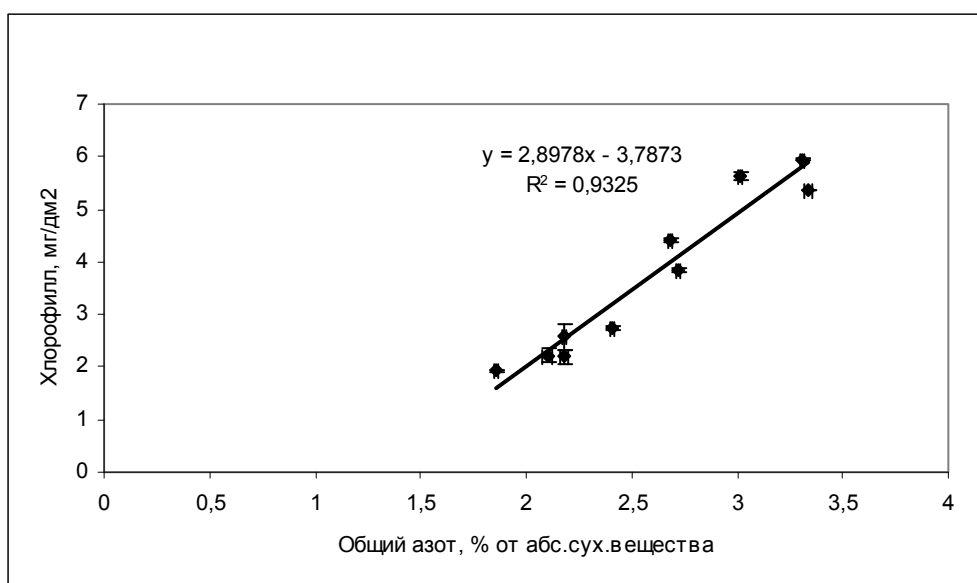


Рис. 1. Зависимость между содержанием хлорофилла и азота в листьях озимой пшеницы разных сортов в фазе молочно-восковой спелости.

Таблица 2.

Показатели использования азота у разных сортов озимой пшеницы.

Генотип		Фаворитка	Володарка	Смуглянка	УК-273	Мироновская 808
Показатели						
Абсолютно сухая надземная масса	г/м ²	1946±75	1908±70	1771±68	1711±65	1286,2±60
	% *	151	148	138	133	100
Общее количество азота в надземной массе	г/м ²	26,71±0,80	26,16±0,78	24,53±0,72	23,98±0,70	15,26±0,65
	%	175	171	161	157	100
Эффективность утилизации азота	г/г N	39,0±0,22	38,5±0,19	34,7±0,28	34,3±0,31	39,6±0,08
	%	98,5	97,2	87,6	86,6	100
Азотный индекс урожая		0,92±0,06	0,92±0,10	0,82±0,04	0,80±0,04	0,89±0,04
	%	103,4	103	92,1	89,9	100
Эффективность продукции биомассы	г/г N	72,9±0,63	72,9±0,50	72,2±0,66	71,4±0,63	84,3±0,34
	%	86,5	86,5	85,6	84,7	100

* - % относительно сорта Мироновская 808.

Масса надземной части растений пшеницы сортов Фаворитка и Володарка примерно на 50 % превышала таковую у сорта Мироновская 808, Смуглянка и УК-273 - на 30-40 %. По общему количеству накопленного азота в надземной биомассе различия были еще более выразительными. У сортов Фаворитка и Володарка общее количество азота было на 75-70 %, а у Смуглянки и УК-273 примерно на 60% выше, чем у сорта Мироновская 808. Учитывая то, что растения исследуемых сортов росли на делянках одного поля в одинаковых почвенно-климатических условиях, можно сделать

вывод о том, что более продуктивные сорта характеризуются и более эффективным поглощением азота из почвы. По отношению массы зерна к количеству азота в надземной массе можно оценить эффективность утилизации азота. По данным табл. 2 видно, что по этому показателю контрастные по зерновой продуктивности сорта Фаворитка, Володарка и Мироновская 808 практически не отличаются, тогда как у Смуглянки и УК-273, которые занимают промежуточное положение по зерновой продуктивности, эффективность утилизации азота примерно на 10% ниже.

Азотный индекс, который характеризует долю аккумулированного в зерне азота по отношению к общему ассимилированному азоту в надземной массе, также наибольшим был у Фаворитки, Володарки и Мироновской 808. По отношению к Мироновской 808 у Смуглянки и УК-273 этот показатель ниже примерно на 10%.

Эффективность продукции биомассы, которая определяется как отношение надземной массы к количеству азота в ней, оказалась наивысшей у сорта Мироновская 808. Для всех остальных более продуктивных по зерну генотипов пшеницы этот показатель практически одинаков и составлял около 86 % от его величины у Мироновской 808.

Выводы

1. Более высокопродуктивные генотипы озимой пшеницы Фаворитка, Володарка, Смуглянка и УК-273 характеризуются более эффективным поглощением азота из почвы.

2. Высокоурожайные генотипы пшеницы характеризуются более низкой эффективностью продукции надземной биомассы.

3. Селекция на высокую урожайность не привела к увеличению эффективности утилизации азота.

4. Не обнаружена связь между величиной азотного индекса урожая и зерновой продуктивностью у контрастных по этому показателю генотипов озимой пшеницы.

5. Взаимосвязь между содержанием хлорофилла и азота в листьях является видоспецифической и не зависит от сорта.

Литература

1. *Починок Х.Н.* Методы биохимического анализа растений. – Киев. – 1976.-334 с.
2. *Шадчина Т.М.* Наукові основи дистанційного моніторингу стану посівів зернових. – Київ. – 2001. – 220 с.
3. *Шадчина Т.М., Прядкіна Г.О., Моргун В.В.* Зв'язок між характеристиками фотосинтетичного апарату та зерною продуктивністю у різних сортів озимої пшениці /Досягнення і проблеми генетики, селекції і біотехнології. Збірник наукових праць. Т.2. – Київ. – 2007. –С. 410-415.
4. *Foulkes M.J., Sylvester-Bradley R., Scott R.K.* Evidence for differences between winter wheat cultivars in acquisition of soil mineral nitrogen and uptake and utilization of applied fertilizer nitrogen //J. Agric. Sci. – 1998. – v. 130. – P. 29-44.
5. *Moll R.H., Kamprath E.J., Jackson W.A.* Analysis and interpretation of factors which contribute to efficiency of nitrogen utilization // Agron. J. – 1982. – v. 74. – P. 562-564.
6. *Muurinen S., Slafer G. A., Peltonen-Sainio P.* Breeding Effects on Nitrogen Use Efficiency of Spring Cereals under Northern Conditions //Crop Sci. – 2006. – v. 46. – P. 561-568.
7. *Ortiz-Monasterio J.I., Sayre K.D., Rajaram S., McMahon M.* Genetic progress in wheat yield and nitrogen use efficiency under four nitrogen rates //Crop Sci. – 1997. – v. 37. – P. 898-904.
8. *Reynolds M.P., Rajaram S., Sayre K.D.* Physiological and genetic changes of irrigated wheat in the post-green revolution period and approaches for meeting projected global demand. //Crop Sci. – 1999. – v. 39. – P.1611-1621.

9. 9. *Wellburn A. R.* The Spectral Determination of Chlorophylls a and b, as well Total Carotenoids, Using Various Solvents with Spectrophotometers of Different Resolution //Journal of Plant Physiology. – 1994. – 144. – 3. – P. 307-313.

Резюме

Визначали надземну біомасу, зернову продуктивність, вміст загального азоту в надземній біомасі та в зерні сортів (Фаворитка, Володарка, Смуглянка, Миронівська 808) та гібридної лінії (УК-273) озимої пшениці української селекції, які відрізнялись за зерною продуктивністю. Показано, що більш висока ефективність використання азоту у високопродуктивних генотипів озимої пшениці Фаворитка, Володарка, Смуглянка та УК-273 визначається більш ефективним його поглинанням з ґрунту. При цьому контрастні за зерною продуктивністю сорти не відрізнялись за ефективністю утилізації азоту. В той же час накопичення надземної біомаси у високоурожайних генотипів було нижчим. Показано також, що взаємозв'язок між вмістом хлорофілу та азоту в листках є видоспецифічним та не залежить від сорту.

Определяли надземную биомассу, зерновую продуктивность, содержание общего азота в надземной биомассе и зерне у отличающихся по зерновой продуктивности сортов озимой пшеницы отечественной селекции Фаворитка, Володарка, Смуглянка, Мироновская 808 и гибридной линии УК-273. Показано, что более высокая эффективность использования азота у высокопродуктивных генотипов озимой пшеницы Фаворитка, Володарка, Смуглянка и УК-273 определяется более эффективным его поглощением из почвы. При этом контрастные по зерновой продуктивности сорта не отличались по эффективности утилизации азота. В тоже время накопление надземной биомассы у высокоурожайных генотипов было ниже. Показано также, что взаимосвязь между содержанием хлорофилла и азота в листьях является видоспецифической и не зависит от сорта.

The upground biomass, grain yield, total nitrogen content in the grain and upground biomass in contrast on grain productivity winter wheat cultivars (Favoritka, Volodarka, Smuglyanka, Myronivska 808 and hybrid line UK-273) has been estimated. It is shown, that higher nitrogen use efficiency in high yield genotypes of winter wheat plants Favoritka, Volodarka, Smuglyanka and UK-273 is defined by more effective nitrogen uptake from the soil, whereas there were no differences observed in nitrogen utilization efficiency in the cultivars. The high-yield genotypes had lower biomass accumulation. It is shown, also, that the interrelation between leave total chlorophyll and nitrogen contents is species-specific and is the same in different cultivars.

ПАЛАЧОВ С.В., ПРОСКУРНІН М.В.

*Харківський Національний Аграрний Університет ім. В.В. Докучаєва,
Україна, 62483, м. Харків, п/в "Комуніст – 1, учбове містечко, sergey-palachev@rambler.ru*

ВИКОРИСТАННЯ ГАММА-ПРОМЕНІВ ПРИ СТВОРЕННІ ЛІНІЙ ЯРОГО ЯЧМЕНЮ З ПІДВИЩЕНИМ РІВНЕМ ЗАГАЛЬНОЇ АДАПТИВНОСТІ

Сучасні підходи до управління генотиповою мінливістю в селекції рослин засновані на положеннях екологічної генетики про особливості формування і функціонування адаптивного потенціалу вищих організмів. У числі таких принципово нові погляди на роль мутацій і рекомбінацій у квіткових рослин, на генетичну природу структурної організації і функціонування кількісних ознак, на рослину як інтегровану систему генетичних детермінантів ядра і цитоплазми.

Можна вважати доведеним, що цілісність генома виду захищена каскадом генетичних систем, що каналізують процеси генетичної мінливості і обмежують спектр доступних природних і штучних відборів рекомбинантів.

Безперечно, ми ще дуже далекі від повного використання тієї генетичної мінливості, яка забезпечується за рахунок традиційних методів селекції. Проте необхідність розширення і якісної зміни спектру доступно відбору генотипової мінливості культурних рослин стала очевидною і невідкладною [2].

В природі, як відомо, відбувається мікро- і макромутації. Останні в своїй більшості знижують пристосованість організмів до умов середовища, хоча деякі з них можуть становити в подальшому цінний вихідний матеріал. Але найбільше значення, як переконані більшість дослідників, в утворенні нового вихідного матеріалу, пристосованого до умов середовища, мають мікромутації, які утворюються під дією малих доз мутагенних факторів. На підставі цього використання малих доз радіації вважається перспективним напрямком мутаційної селекції на адаптивну здатність.

Матеріали та методи

Експериментальна частина роботи проведена в 2002-2004 рр. на дослідному полі Харківського національного аграрного університету ім. В.В. Докучаєва, яке розташоване в межах землекористування навчально-дослідного господарства в передмісті Харкова.

Насіння сортів ярого ячменю Одеський 131, Джерело, Докучаєвський 15 та Свані оброблялось радіоактивним ізотопом Co^{60} в стаціонарній лабораторії молекулярної та прикладної біофізики Харківського національного університету ім. В.Н. Каразіна дозами 500, 1000, 2500 і 5000 Р. Інтенсивність опромінення 800 Р/хв., енергія випромінювання 1 Мев. Обрані дози були одноразові. Контроль – неопромінене насіння.

Мутаціями вважали лише ті зміни ознак рослин, які успадковувались у наступних поколіннях. За різні випадки мутування приймали рослини, які фенотипово відрізнялися від вихідної форми в межах однієї сім'ї. Фенотипово змінені рослини виділяли шляхом візуального огляду всіх сімей під час проходжень ними основних фаз росту і розвитку.

Родини M_2 аналізували шляхом візуальної оцінки з визначенням балів, рівень розвитку кожної з ознак оцінювали за п'ятибальною шкалою. На підставі аналізу родин M_2 вони були об'єднані в групи. Таким чином в M_3 по кожному варіанту було висіяно 3 групи родин: 1 – з низьким рівнем (1-2 бали), 2 – з середнім (3), 3 – з високим (4-5).

Математичну обробку одержаних даних проводили за загальноприйнятою методикою статистичної обробки експериментальних даних.

Результати та обговорення

До числа основних генетично детермінованих ознак, що зумовлюють високу адаптивність рослин, відносяться: скоростиглість, нейтральність до фотоперіоду, ефективне використання поживних речовин, вологи, стійкість до хвороб; архітектоніка рослин, що забезпечує стійкість до загушення і придатність до механізованого вирощування і збирання, стійкість до несприятливих факторів середовища тощо [1].

Вплив різних доз гамма-променів на сорти ярого ячменю різного еколого-географічного походження при доборі рослин в M_2 - M_3 ми вивчали по найбільш окомірно доступним господарсько-цінним ознакам і висоті рослин, стійкості проти грибкових хвороб та кількості зерен у головному колосі та інших при різних умовах вирощування.

Деякі дослідники і виробничники ставлять під сумнів доцільність зниження довжини стебла у зернових культур, вважаючи, що це може привести до зменшення продуктивності. Підстава для таких сумнівів є, так як урожай зерна у зернових культур набагато залежить від непродуктивної частки рослин – стебла і листя. [6]. За даними Манзюка і Козаченка [3], коефіцієнт кореляції між цими показниками для рослин ярого

ячменю в Лісостеповій зоні України досить високий і коливається від $\pm 0,65$ до $0,88$. Тому природно, що при укороченні стебла відбувається зниження урожаю зерна.

Показник довжини стебла у рослин в M_2 - M_3 змінювався від дози опромінювання, сорту і густоти стеблостою. В більшості варіантів досліду ми спостерігали незначне підвищення висоти рослин у варіантах з дозами 500 і 1000 Р у порівнянні з контролем і зниження цього показника у варіантах, які оброблені дозами 2500 і 5000 Р.

Висота рослин у варіантах з густиною посіву 250 шт/м² була дещо вища ніж у варіантах з густиною 450 шт/м², незалежно від дози опромінення, що обумовлено більшою площею живлення рослин в цих варіантах.

В порівнянні з довжиною стебла контрольних варіантів, найбільший розмах варіювання довжини стебла в M_2 відмічено у сорту Одеський 131 при обробці дозою 5000 Р при густоті 250 шт/м², та сорту Докучаєвський 15 при дозі 5000 Р при густоті 250 шт/м², різниця становить 2,5 і 2,2 см відповідно.

Найбільший показник коефіцієнту варіації по висоті рослин в M_2 був у сорту Джерело, він коливався від 6,9 на контролі до 16,3% при обробці дозою 5000 Р при густоті 250 шт/м² та 5,9 – 14,9% при густоті 450 шт/м² відповідно. Високі показники спостерігаються також у сорту Докучаєвський 15.

В M_3 спостерігалась дещо інша залежність варіювання висоти рослин, а саме розмах цього показника при обробках дозами 500 і 1000 Р був на рівні, або дещо перевищував контрольні значення, дози 2500 і 5000 Р знижували висоту рослин і розширювали розмах варіювання цього показника.

В M_3 найбільше варіювання по висоті відмічено у сорту Свані при обробці дозою 5000 Р при густоті 250 шт/м², різниця становить 1,66 см у порівнянні з контролем і 0,9 см при густині 450 шт/м². Сорт Одеський 131 відрізняється розширеним розмахом коефіцієнту варіації від 5,9% на контролі до 9,1% при обробці дозою 5000 Р при густоті 250 шт/м², і 5,4%– 8,9% при густині 450 шт/м² відповідно.

Для відбору найбільше значення мали рослини, які менше реагували на густоту і були майже однаковими. Це, насамперед, рослини сорту Джерело і Докучаєвський 15, які хоча і знизили довжину стебла, але менш реагували на умови вирощування, тобто були найбільш пристосовані до цих умов.

В M_3 спостерігається тенденція до зниження розмаху варіювання показника висоти рослин в порівнянні з M_1 і M_2 , що співпадає з класичними уявленнями про поступове зниження ефектів опромінення рослин в третьому і поступове зникнення цих ефектів після п'ятого покоління.

Борошниста роса (*Erysiphe graminis* D.C.F. sp. tritici em. Marchal) і сажка (*Ustilago nuda* Kell. Et. Swing u *Ustilago hordei* Kell/ et. Swing) поширені скрізь, де вирощуються зернові культури. Шкодочинність проявляється в ураженні листків, стебел, а також колосу. Прогресування хвороб, висока шкодочинність потребує посиленої уваги до цих хвороб і створення сортів, стійких до борошнистої роси, летючої та твердої сажки.

Найнижчий рівень поширеності хвороби відмічається у варіантах при обробці 1000 Р по всіх роках дослідження – 46,2 % у 2002 році, на контролі – 63,6%; у 2003 році – 26,8% і 41,2; у 2004 році – 46,2% і 60,6% відповідно. Така тенденція стосується і розвитку борошнистої роси. Взагалі доза опромінення 1000 Р знижувала поширеність та розвиток хвороби по всіх вивчаємих сортах

Серед них слід особливо відзначити сорт Докучаєвський 15 та сорт Свані з дозою обробки 1000 Р, це може бути пов'язано з тим, що доза обробки 1000 Р є сприятливою для формування відносно стійких рослин.

Більше всього уражувалися рослини борошнистою росою при обробці насіння гамма-променями в дозі 5000 Р, що можна пояснити більшим пошкоджуючим ефектом цієї дози.

Аналіз частоти і спектра індукованих форм, відібраних в результаті проведеного добору, які характеризуються позитивними змінами комплексу кількісних ознак продуктивності, свідчить про вплив гамма-променів на мінливість не лише якісних, але й кількісних ознак, включаючи ознаки по елементах продуктивності, а також ознак, пов'язаних зі змінами фізіологічного стану росту й розвитку рослин. Через відносно слабку мінливість у невеликій кількості пар альтернативних ознак, наприклад, безостість-остість, за змінами яких можна лише впевнено говорити про зміну генотипу, велике значення для міркування про ефективність застосування впливів в індукції життєвих мутацій має добір мутантних рослин за кількісними ознаками.

Результати структурного аналізу рослин ячменю свідчать про дійсність впливу гамма-опромінення на рослини сортів ячменю. Особливу увагу привертають до себе такі показники, як кількість та маса зерен у головному колосі. Достовірне підвищення їх, порівняно з контролем, знаходить своє пояснення в появі стерильних зон – як наслідок гамма-опромінення, більшість з виділених родин ячменю характеризуються вищим рівнем розвитку вивчених кількісних ознак в порівнянні з середніми значеннями в контрольних популяціях.

Важливо, що зміни торкаються не окремих складних ознак, а їх комплексу, що вказує на глибинну перебудову організації процесів всього епігенезу рослин ячменю.

Деякі дані структурного аналізу розділяють сорти за неоднорідністю їх реакції на дози опромінення. Так, кількість зерен у головному колосі по всіх вивчаємих сортах збільшується у порівнянні з контролем, найбільше ця тенденція виражена у сортів Джерело і Одеський 131 і найменше – у сортів Докучаєвський 15 і Свані. Можливо репаруюча система, що ефективніше діє у перших (на що вказують відхилення по показниках кількості та маси зерна з колоса та рослини) веде до стимуляції утворення додаткових колосків, кількість яких зростає за рахунок появи редукованих біля основи колосу. Про стимулюючий ефект можна говорити і по висоті рослин, загальної та продуктивної куцистості. Наприклад, загальна і продуктивна куцистість родини 20/29 (відібраної в популяції сорту Свані з дозою 5000 P) перевищувала середні значення родин контрольної популяції на 40 і 45% відповідно, родини 14/23 (відібраної в популяції сорту Докучаєвський 15 з дозою 2500 P) – 33 і 41% відповідно.

Висота рослин родини 19/16 (відібраної в популяції сорту Свані з дозою 2500 P) перевищувала середні значення родин контрольної популяції на 12%, 5/2 (відібраної в популяції сорту Одеський 131 з дозою 5000 P), 15/9 (відібраної в популяції сорту Докучаєвський 15 з дозою 5000 P) на 8 і 9% відповідно.

Характеризуючи елементи продуктивності мутантних рослин M_2 , отриманих при опроміненні малими дозами, можна зробити висновок про те, що в їх формуванні значну роль відіграла система репарації, активність якої залежить від генотипу організму.

Дія опромінення великими дозами має особливі молекулярні механізми, що формують реакцію-відповідь опромінення клітин. Малі дози опромінення по-різному можуть відбиватися на представниках біотики, стимулюючи їх розвиток в однакових випадках, а в інших – викликати небажані наслідки для організмів (поява “прихованих” пошкоджень геному в умовах великих доз опромінення, низької інтенсивності, аномальний морфогенез та інші віддалені наслідки) [5].

В другому пострадіаційному поколінні була виявлена значна міжродинна диференціація за рівнем загальної адаптивної здатності в експериментальних популяціях ячменю. Так, в популяціях з малими дозами спостерігалось значне підвищення відносної частоти родин з дуже високим та високим рівнем адаптивності порівняно з контрольними популяціями. Разом з тим для популяцій з великими дозами була характерною інша залежність – в їх структурі переважали родини з низьким та дуже низьким рівнем загальної адаптивності, а родини з дуже високим рівнем взагалі були відсутні.

Висновки

Підводячи підсумки, можливо констатувати, що гамма-опромінення в усіх дозах призводить до зростання гетерогенності структурної організації польових популяцій в ряду послідовних поколінь. При цьому між великими і малими дозами існувала принципова різниця в характері індукованих змін. Так, ефекти великих доз полягали в руйнуванні цілісної структури популяцій в першому та наступних поколіннях. Малі ж дози зумовлювали ускладнення внутрішньої структури польових популяцій ячменю з виділенням окремих “феноелементів”, які характеризувалися різним типами епігенетичної організації процесів онтогенезу і зумовлені змінами епігенетичного характеру.

Література

1. Гирко В.С., Волощук С.И. Наследование в ряду поколений некоторых признаков в расщепляющихся гибридных популяциях озимой пшеницы при мутагенезе *in vitro*// Докл.РАСХН. – 2002. – №4. – С.9-13.
2. Жученко А.А. Адаптивная система селекции растений (эколого-генетические основы). М., 2001, I и II.
3. Манзюк В.Т., Козаченко М.Р. Создание отвечающих современным требованиям сортов ярового ячменя при использовании индуцированных мутаций// Нетрадиционное растениеводство, экология и здоровье: Мат. Междунар.научн.-практ. Конф. – Симферополь, 19997. – С.224-245.
4. Проскурнін М.В., Криворученко Р.В., Палачов С.В. Адаптивність сортів ячменю під дією малих доз радіації//Сучасні технології селекційного процесу сільськогосподарських культур. Зб.тез.міжнар.наук.симпозіуму 7-8 липня 2004 року. – Харків, 2004. – С.105.
5. Соколов Н.В., Гродзинський Д.М., Сорочинський П.В. Роль поврежденных ДНК в процессе старения семян люпина (*Lupinus polyphyllus* L.), индуцируемого хроническим низкодозовым облучением// Доповіді НАН України. – К., 2000. - №8. – С.166-171.
6. Budak N., Yildirin M.B. Heritability, correlation and genetic gains irradiated with gamma rays // Cereal Res. Commun. – 2002. 30, №1-2. – P. 47-53.

Резюме

Проведення добору в експериментальних популяціях M_2 сортів ячменю дозволило одержати цінні в господарському значенні лінії зі зміненим комплексом ознак продуктивності і адаптивності, які можуть бути використані в подальшій селекційній роботі в якості вихідного матеріалу.

Проведенный отбор в экспериментальных популяциях M_2 сортов ячменя позволил получить хозяйственно-ценные линии с измененным комплексом свойств продуктивности и адаптивности, которые в дальнейшем могут быть использованы в селекционной работе в качестве исходного материала.

The conducted selection in experimental population of M_2 of sorts of barley allowed to get economic-valuable lines with the changed complex of properties of the productivity and adaptiveness, which in future can be utilized in plant-breeding work as a feedstock.

ПОЛЬСКАЯ П.И.

Институт животноводства степных районов им. М.Ф.Иванова «Аскания-Нова» – Национальный научный селекционно-генетический центр по овцеводству, Украина 75230 пгт. Аскания-Нова, ул. Красноармейская, 1, Чаплинского района Херсонской области (805538) тел-факс. 6-16-55; E-Mail: asknov@mail.ru

МЕТОДОЛОГИЯ ВЫВЕДЕНИЯ АСКАНИЙСКОЙ МЯСО-ШЕРСТНОЙ ПОРОДЫ ОВЕЦ С КРОССБРЕДНОЙ ШЕРСТЬЮ

Выдающийся законодатель научных основ породообразования академик М.Ф.Иванов, на основе изучения мирового опыта и проведения многочисленных генетических экспериментов, утверждал, что будущность имеют только мясо-шерстные овцы, т.к. они значительно выгоднее мясных или шерстных овец. Исходя из результатов опытов по метизации в овцеводстве, свидетельствовавших о низкой акклиматизационной способности импортных овец, М.Ф. Иванов особое внимание уделял выведению отечественных пород. Он предположил возможность создания на юге Украины черноголовых мясных овец путем использования английских гемпширов [1].

Спустя более 20 лет, вопрос создания в Украине мясо-шерстного овцеводства неоднократно дебатировался на государственном уровне. Ведь в Украине на протяжении десятилетий овец разводили в основном с целью производства шерсти. Академик Л.К. Гребень, ученик и последователь акад. М.Ф. Иванова, настоятельно доказывал, что на юге Украины в условиях орошаемого земледелия нельзя сочетать интенсивное кормопроизводство с экстенсивным овцеводством. Поэтому разрешение проблемы выведения интенсивных типов овец с использованием мирового улучшающего генофонда к 1960 году приобрело особую актуальность.

Однако, было известно, что эффект межпородных скрещиваний обусловлен сочетаемостью пород, отчего он весьма неоднозначен – от резкой выраженности до полного его отсутствия. По мнению Х.Ф. Кушнера вопрос сочетаемости пород должен решаться экспериментально, так как важную роль играет фактор взаимодействия генотип x среда. Это значит, что в одних природных и кормовых условиях лучшие сочетания дают одни породы, а в других условиях - иные [2].

Учитывая определяющую роль сочетаемости исходных пород, участвующих в породообразовательном процессе, нами в 1959-1965 гг., под руководством академика Л.К. Гребня, были проведены поисковые исследования по выявлению наиболее удачных породных сочетаний при скрещивании цыгайских и асканийских тонкорунных маток с английскими мясными баранами: линкольнами, ромни-маршами, гемпширами, шропширами, впервые использованными в Аскании-Нова суффолками и оксфорддаунами, а также типа корридель и частично курдючными – чунтуками и гиссарами.

В результате всестороннего изучения 15 породных сочетаний были выявлены наиболее эффективные как для производства ягнятины, так и успешного разрешения проблемы породообразования [3].

В период 1965-1975 гг. нами, совместно с акад. Л.К. Гребнем, на основе акклиматизационной способности овец импортных пород и характеристики полученных от них помесей, разработан принципиально новый метод выведения асканийских мясо-шерстных овец крепкой конституции с повышенной плодовитостью, высокой скороспелостью, мясной, молочной и шерстной продуктивностью, обладающих высокими племенными достоинствами [4]. В его основе ступенчатая синтетическая селекция, включающая следующие этапы:

- выявление улучшающих отцовских пород и использование их на цыгайских и асканийских тонкорунных матках для создания исходного селекционного материала;
- отбор полукровных помесей желательного типа и разведение их «в себе» до F_2-F_n с применением инбридинга;
- скрещивание между собой отселекционированных сходных по фенотипу и различных по генотипу двухпородных помесей F_2-F_n ;

- отбор трехпородных помесей желательного типа и разведение их «в себе» с применением инбридинга.

Установлено, что с целью создания на юге Украины интенсивного типа овец с кроссбредной шерстью целесообразно в качестве отцовских пород использовать английских и аргентинских линкольнов, для выведения скороспелых мясо-шерстных овец с целью производства ягнятины – английских суффольков и оксфорддаунов.

В результате целенаправленной селекции в опытном хозяйстве института были созданы селекционные стада асканийских мясо-шерстных овец – асканийские кроссбреды и асканийские черноголовые. В производственных условиях выявлена высокая эффективность их использования как для промышленного скрещивания, так и создания кроссбредного овцеводства.

В период 1976-1990 гг. нами разработан метод совершенствования интенсивных типов овец, обеспечивающий в малых закрытых популяциях гетерогенность и высокую эффективность синтетической селекции с применением инбридинга типа I-II, II-II, II-III и III-III. Установлено, что инбридинг при специальном подборе пар в условиях достаточного и полноценного кормления не вызывает явлений инбредной депрессии в механизмах, формирующих естественную резистентность организма и является эффективным селекционным приемом создания выдающихся генотипов [4].

Как свидетельствует наш почти 50-летний опыт научно-исследовательской работы и практической селекции, высокая результативность пороодообразовательного процесса базируется на использовании генотипов с рекордной продуктивностью. Их создание возможно лишь в оптимальных условиях кормления и содержания посредством непрерывной углубленной селекции, включающей многоступенчатый отбор, индивидуальный специальный подбор пар с учетом формирования и оптимизации генеалогической структуры, направленное выращивание молодняка, оценку баранов по качеству потомства и максимальное использование препотентных баранов.

Асканийские кроссбреды, выведенные путем сложного воспроизводительного скрещивания асканийских тонкорунных и цигайских овцематок с английскими и аргентинскими линкольнами, оптимально сочетают достоинство трех истотных пород: величину и специфические качества шерсти линкольна; многоплодие, величину и многошерстность асканийских мериносов; устойчивость и приспособленность к экстремальным условиям цигайских овец. Апробированы в 1990 году. Авторы доктор с.-х наук Польская П.И., академик Л.К.Гребень, Калашук Г.П., Шинкаренко М.Д. и др. Генеалогическая структура включает пять линий и 14 родственных групп.

Асканийский тип черноголовых овец с кроссбредной шерстью, выведенный путем сложного воспроизводительного скрещивания цигайских овцематок с английскими мясными баранами – суффольками и оксфорддаунами с дальнейшим «прилитием крови» асканийских кроссбредов, апробирован в 1995 году с тремя линиями и 12 родственными группами. Авторы: доктор с.-х наук Польская П.И., академик Гребень Л.К., Калашук Г.П., Шаламай Л.П. и др.

Асканийские кроссбреды и асканийские черноголовые в основном F₁₀-F₁₅ (поколений), крепкой конституции в оптимальных условиях кормления характеризуются:

- высокой производительной способностью: плодовитость овцематок 145-148% (макс. 183%), ранней половой зрелостью (первое ягнение в 13-14-месячном возрасте);

- крупной величиной: средняя живая масса производителей 126...137 кг, максимальная 161...178 кг, овцематок соответственно 77...80 и 122...132 кг, а также хорошо выраженными мясными формами;

- высокой технологичностью: они спокойного темперамента, легко стригутся, бараны комолые (безрогие), у овцематок хорошо выражен материнский инстинкт, а молока достаточно для выкармливания двух...четырех ягнят;

- высокой молочной продуктивностью: 209...215 кг за 120 дней лактации, максимальная 340...318 кг;

- высокой скороспелостью роста ягнят: их живая масса в 100-дневном возрасте составляет 32...40 кг (макс. 62 кг) при среднесуточном приросте 280...340 г, в 9-10-месячном возрасте 54...61 кг (макс. 87 кг), обеспечивающей производство мяса на овцематку в среднем 80...85 кг, максимально 160...192 кг при выращивании ягнят в числе троен до 9-10-месячного возраста

- высокой мясной скороспелостью при средней массе тушек в 4-месячном возрасте 17...20 кг, в 9-месячном – 27...32 кг, убойном выходе 48...54%, с отличными вкусовыми качествами и биологической полноценностью мяса;

- высокой шерстной продуктивностью при среднем настриге кроссбредной шерсти в чистом волокне с отличными технологическими свойствами: у баранов-производителей 8,12...9,3 кг (макс. 11,1...12,8 кг), овцематок 5,0...5,6 кг (максимальный 8,0...8,8 кг), длины шерсти 14...19 см (макс. 22...25 см), выходе чистого волокна 69...72% (максимальный 79...83%), а также отличными качествами меховых овчин;

- высокой адаптивной и реабилитационной способностью, а также стойкой передачей потомству присущих им наследственных свойств.

Показатели продуктивности овец выведенных интенсивных типов в сравнении с такими показателями в начале селекционного процесса (1965 год) свидетельствуют о выдающейся характеристике созданных генотипов.

На основе разработанных нами методических рекомендаций по использованию баранов интенсивных типов асканийской селекции в различных регионах Украины был создан массив кроссбредных овец, послуживший генетическим материалом для создания мясо-шерстной породы с кроссбредной шерстью [5, 6, 7, 8].

Путем широкомасштабного использования асканийских кроссбредных и асканийских черноголовых баранов-производителей на материнской основе различных пород созданы внутривидовые типы выводимой породы: одесский – автор профессор В.К. Чепур, буковинский - автор кандидат с.-х. наук Т.А.Черномыз, днепропетровский – автор профессор В.Т. Шуваев.

В 1991-2000 гг. нами обобщены результаты исследований по породообразовательному процессу за период 1965-2000 гг. и подготовлены материалы к апробации.

В 2000 г. созданная порода была апробирована Государственной комиссией и утверждена Министерством аграрной политики как новое селекционное достижение под названием «Асканийская мясо-шерстная порода овец с кроссбредной шерстью» с пятью внутривидовыми типами (Постановление секции Научно-технической совета Минагрополитики Украины от 22 декабря 2000 г., приказ Минагрополитики Украины и Украинской академии аграрных наук № 315/37 от 8 мая 2007 г.).

По заключению Государственных экспертных комиссий в 1990, 1995 и 2000 гг. внутривидовые интенсивные типы - асканийские кроссбреды и асканийские черноголовые по уровню комбинированной продуктивности: мясной, молочной и шерстной в сочетании с высокой скороспелостью и многоплодием не имеют аналогов в отечественной и мировой практике, они являются вершиной селекционной пирамиды новой породы и обеспечивают ее генетический прогресс.

О высокой генетической ценности интенсивных типов овец племзавода «Аскания-Нова» свидетельствуют результаты их использования в качестве улучшающего генофонда, изложенные в 18 кандидатских диссертациях.

Созданное высокоценное генетическое разнообразие асканийской мясо-шерстной породы овец с кроссбредной шерстью способствует восстановлению отрасли овцеводства в Украине на новой качественной основе и позволяет отказаться от

импорта баранов аналогичного направления продуктивности, избежать трудности их акклиматизации и экономит государственные валютные средства [9].

Итак, успешное выведение асканийской мясо-шерстной породы овец с кроссбредной шерстью обусловлено следующими факторами:

- новыми социально-экономическими условиями с особыми требованиями к создаваемой породе как эффективному средству производства;

- высокой результативностью поэтапных фундаментальных исследований научной школы академиков М.Ф. Иванова и Л.К. Гребня по пороодообразованию, обеспечившей разработку методов создания интенсивных типов овец на многопородной основе и их совершенствования в малых закрытых популяциях;

- созданием в опытном хозяйстве института животноводства «Аскания-Нова» путем ступенчатой синтетической углубленной селекции асканийских мясо-шерстных овец крепкой конституции с высокой адаптивной, реабилитационной и воспроизводительной способностью, продуктивным долголетием, рекордной мясной, молочной и шерстной продуктивностью, не имеющих аналогов в отечественной и зарубежной практике;

- широкомасштабным использованием в различных регионах Украины асканийских мясо-шерстных баранов, обладающих высокими племенными достоинствами в качестве улучшающего генофонда на всех этапах пороодообразовательного процесса, задолго до государственной апробации интенсивных типов;

- теснейшей интеграцией научных работников с руководителями и специалистами производства во главе с Министерством аграрной политики Украины.

Уникальное генофондное стадо асканийских кроссбредов и асканийских черноголовых племзавода «Аскания-Нова», являясь вершиной селекционной пирамиды новой созданной породы, - это неоценимый генетический капитал Украины, для сохранения которого в современной кризисной ситуации необходима адресная государственная поддержка.

Литература

1. *Иванов М.Ф.* Создание новых пород в СССР// Проблемы животноводства. – 1943. - № 2. – С. 37-48.
2. *Кушнер Х.Ф.* Наследственность сельскохозяйственных животных (с элементами селекции). Москва. - Урожай. – 1964. 487 с.
3. *Польская П.И.* Скрещивание цыгайских и асканийских маток с баранами скороспелых мясных пород для увеличения производства ягнатины// Автореф. дис... канд.с.-х. наук № 553/-МСХ СССР. Укр. сельхоз. акад. Киев. – 1968. – 31 с.
4. *Польская П.И.* Методы выведения, совершенствования и использования асканийскихмясо-шерстных овец// Автореф. дис... докт. с.-х. наук 06.02.06/ ВИЖ. Дубровицы Моск. обл. – 1990. – 35 с.
5. *Польська П.І.* Рекомендації по створенню кросбредного вівчарства в Україні// Київ. – 1977. 20 с.
6. *Польская П.И.* Методические рекомендации по разведению асканийских кросбренных овец в южной зоне УССР. – Херсон. – 1984. 27 с.
7. *Польская П.И., Калащук Г.П. и др.* Методические рекомендации по использованию асканийских черноголовых овец. – Херсон. – 1985. 33 с.
8. *Польская П.И.* Качественное преобразование овцеводства// Преобразование генофонда пород. – Киев. Урожай. – 1990. – С. 241-263.
9. *Польська П.І., Калащук Г.П., Чепур В.К., Черномир Т.О.* Асканійська м'ясо-вовнова порода овець з кросбредною вовною// Вівчарство України. - Київ. Аграрна наука. – 2006. – С. 155-215.

Резюме

Изложены методологический подход к пороодообразованию и результаты углубленной селекции в малых закрытых популяциях интенсивных типов, которые выведены в Аскании-Нова и обеспечили успешное создание нового мясо-шерстного направления овцеводства в Украине.

Викладено методологічний підхід щодо пороодоутворення і результати поглибленої селекції у малочисельних закритих популяціях інтенсивних типів, які виведені в Асканії-Нова і забезпечили успішне створення нового м'ясо-вовнового напрямку вівчарства в Україні.

There were reported about the methodological way of breed creating and results of deep selection in small closed population of intensive types which were created in Ascania-Nova and promoted to successful making of new meat-woolen sheep-breeding branch in Ukraine.

ПОЛЯКОВА Л.В., ЖУРОВА П.Т.

*Украинский НИИ лесного хозяйства и агролесомелиорации им.В.В.Высоцкого
Украина, 61024, Харьков, ул Пушкинская 86, e-mail: polyakova_lv@mail.ru*

ФЕНОТИПИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ДУБА ЧЕРЕШЧАТОГО ПО ВТОРИЧНОМУ БИОХИМИЧЕСКОМУ ПРИЗНАКУ В НАСАЖДЕНИЯХ, ИМЕЮЩИХ РЕКРЕАЦИОННОЕ НАЗНАЧЕНИЕ

Значительная деградация насаждений дуба черешчатого (*Quercus robur* L.) отмечается во многих странах Европы (7). Поиск причины повышенной восприимчивости к биотическим и абиотическим стрессам часто приводит исследователей к изучению особенностей накопления веществ вторичного обмена – фенольных соединений (ФС). Последние во многих случаях рассматривают как ключевые компоненты в защите растений против патогенов и вредителей (3), причем спектр активности этих веществ расширяется, за счет установленного влияния на углерод-азотный баланс растений (6). Трудности при изучении особенностей накопления ФС связаны со значительной вариабельностью их даже в пределах одного дерева (8). В связи с этим изучение ФС часто проводится на популяционном уровне при одновременном анализе 10-30 индивидуальных особей, что позволяет получить достоверные данные о характере изменчивости того или иного признака. Популяционный уровень отражает наиболее полно адаптивный потенциал вида в определенных местообитаниях, а также выявляет характер проявления признака, позволяющего особям получать селективное преимущество в процессе стабилизирующего отбора (1).

В качестве визуального признака, определяющего такой позитивный селективный показатель, как устойчивость к широко распространенному заболеванию всех возрастных категорий дуба – мучнистой росе (*Microsphaera alphitoides*) - использовали наличие в насаждениях как устойчивых (полностью или частично), так и восприимчивых к этому заболеванию деревьев (преобладающая часть насаждения). Анализировали насаждение дуба в окрестностях г. Харькова, которое представлено преимущественно 70-80-летними деревьями 3-го порослевого поколения с присутствием отдельных 100-120-летних экземпляров. В насаждении, выполняющем рекреационные функции, также как и в генетических резерватах, никаких видов рубок не проводится, что позволяет рассматривать его как панмиктичную популяцию вида.

Основанием для использования ФС в качестве маркерного признака послужили ранее выполненные исследования с сеянцами этого вида (2).

В задачу исследования входило сравнительное изучение по биохимическим фенотипам деревьев устойчивых и восприимчивых к инфекции мучнистой росой; выявление биохимического фенотипа, которому благоприятствует отбор.

Материалы и методы

Для насаждений дуба черешчатого является характерным высокая восприимчивость к инфекции мучнистой росой. Практически 80-90% деревьев всех возрастных категорий ежегодно поражаются этой инфекцией. Однако около 10-20% деревьев сохраняют устойчивость к патогену, что позволяет проводить сравнительный анализ и оценивать биохимические отличия обеих групп деревьев в насаждении.

Материалом для анализа служили листья нижнего яруса деревьев дуба черешчатого. Листья собирали с побегов южной экспозиции, фиксировали в кипящем этаноле, высушивали до воздушно-сухого состояния и использовали для анализа. Образцы собирали в конце июля, когда устойчивые и восприимчивые деревья визуально четко различались. Из литературных источников (8) известно, что в листьях дуба комплекс ФС представлен гидролизуемыми танинами и группой компонентов фенилпропаноидной структуры, причем последние относятся к функционально более активной группе веществ (2,6). К фенилпропаноидной группе относятся присутствующие в листьях флавонолы (преимущественно кверцетин в гликозилированной форме и форме свободного агликона), Присутствуют также вещества структуры флаван-3-ол, которые представлены мономерными катехинами и их конденсированными формами.

20 мг сухих листьев растирали с 4 мл 70%-ного этанола. Гомогенат центрифугировали в теч.20 мин. при 3000 об/мин. Надосадочную жидкость использовали для определения ФС.

1.Суммарное содержание катехинов определяли по реакции с ванилиновым реактивом (5), калибровочная кривая построена по (-)-эпигаллокатехингаллату, 500 нм, КФК-3.

2.Суммарное содержание флавонолов определяли по реакции с 2%-ным раствором $AlCl_3$ (5), калибровочная кривая построена по кверцетину (Chemapol), 425 нм, КФК-3.

Результаты и обсуждение

Выполненные ранее анализы устойчивых и восприимчивых к инфекции групп семян показали наличие достоверных различий в накоплении двух групп веществ: флавонолов и катехинов. Как правило, устойчивая группа синтезировала повышенное количество флавонолов и более низкое количество катехинов уже в период, предшествующий массовому расселению патогена на листьях. Далее это различие увеличивалось, особенно за счет возрастания уровня катехинов и снижения уровня флавонолов в пораженных инфекцией листьях семян (табл.1).

В 80-летнем насаждении, при несколько иных цифровых показателях, общий характер тенденции соотношения уровней синтезируемых в листьях катехинов и флавонолов сохраняется: уровень катехинов оказывается заметно более высоким в листьях восприимчивых деревьев, что выражается в пропорциях этих групп как 2.42, в то время как в устойчивой 1.6 (табл.1).

Таблица 1.

Содержание флавонолов, катехинов и их пропорции в листьях семян и взрослых деревьев дуба черешчатого, устойчивых и восприимчивых к мучнистой росе (мг/г сухой массы листьев)

Группа особей	Катехины $X \pm m$	Флавонолы $X \pm m$	К : ФЛ $X \pm m$
Сеянцы			
устойчивая группа (10 особей)	8.5 ± 1.6	10.1 ± 1.7	0.84 ± 0.17

восприимчивая гр.(10 особей)	9.0 ± 1.6	6.0 ± 0.9	1.5 ± 0.22
T st	0.5	2.7*	2.8*
80-летние деревья			
устойчивая группа (20 особей)	11.5 ± 1.4	7.1 ± 0.6	1.6 ± 0.14
восприимчивая гр. (22 особи)	16.5 ± 1.2	6.8 ± 0.4	2.42 ± 0.22
T st	2.4*	0.5	3.4*

Данные таблицы показывают, что во всех случаях, связанных с повышенной устойчивостью к инфекции имеет место относительно более низкий уровень накопления катехинов и более высокий – флавонолов. Следует отметить, что усредненные биохимические фенотипы, несмотря на достоверно различные количественные пропорции веществ, в целом сходны за счет заметно более высокого уровня катехинов по сравнению с флавонолами. Таких фенотипов в обеих группах деревьев оказалось 33 из 42 проанализированных, что составило 82%. Так как данный фенотип преобладает, он отнесен к 1-му биохимическому фенотипу.

Однако в пределах устойчивой группы присутствовали деревья, фенотипы которых по данному показателю совпадали с устойчивой группой сеянцев, то есть содержание катехинов было ниже или равно содержанию флавонолов (соответствующие пропорции от 0.6 до 1.02). Таких особей оказалось 9 - менее 20%. Они отнесены ко 2-му биохимическому фенотипу

Преобладание фенотипов с повышенным содержанием катехинов, вероятно, не случайно, так как разный уровень накопления каждой группы веществ может быть результатом воздействия элиситоров патогена на вторичный обмен. Для проверки этого предположения провели анализ листьев отдельно по зонам, покрытым мицелиальным налетом и свободным от него. Как правило, весь лист не бывает покрыт сплошным слоем мицелия, так как некоторые краевые зоны сохраняют здоровую зеленую поверхность до конца сезона (табл.2).

Таблица 2

Содержание флавонолов и катехинов в участках листа взрослого дерева, свободных от мицелиального слоя (зеленая зона) и покрытая им. (мг/г сухой массы)

Группа веществ	Зеленая зона X ± м	Зона, покрытая Мицелием X ± м	T st	% зоны мицелия от зеленой зоны
Катехины	2.1 ± 0.3	5.3 ± 1.2	2.8*	256.0
Флавонолы	4.0 ± 0.9	2.6 ± 0.4	1.43	68.0

Результаты анализа показали, что в зоне поражения мучнистой росой в тканях листа значительно возрастает синтез катехинов (256%) и снижается синтез флавонолов (68%). То есть воздействие патогена особенно сильно проявляется в возрастании содержания катехиновой группы веществ, что в итоге увеличивает их пропорциональное участие в общей сумме синтезируемых листом фенолпропаноидов. Наблюдаемые изменения могут указывать на эволюционно выработанное свойство патогена снижать уровень более токсичной для него группы флавонолов (4), что сопровождается усилением синтеза менее токсичной группы катехинов.

Несмотря на ослабление устойчивости к инфекции, 1-й биохимический фенотип преобладает в насаждении и, вероятно, создает дереву некоторое селективное преимущество по другим показателям. В частности, ранее нами (2) было отмечено, что сеянцы восприимчивой группы заметно выше сеянцев устойчивой группы по ростовой активности. Учитывая конкурентный характер синтеза фенолпропаноидов и синтеза

белка, а также их влияние на продуктивность древесных (б) пропорциональное соотношение катехинов и флавонолов 1-го биохимического фенотипа, вероятно, можно рассматривать как более «выгодное» для дерева.

В устойчивой группе деревьев пропорциональное соотношение складывается в пользу несколько повышенного уровня флавонолов и пониженного катехинов, что, возможно, становится одним из барьеров, препятствующих проникновению элиситоров патогена в ткани листа. Практически равное содержание катехинов и флавонолов в листьях – 2-й биохимический фенотип - встречается редко, однако именно такие фенотипы наиболее устойчивы и сохраняют потенциал деревьев с эффективной неспецифической защитой.

Выводы

1. В насаждении дуба черешчатого, отнесенного к панмиктичной популяции, выявлено два биохимических фенотипа, значительно различающихся по соотношению двух групп веществ фенилпропаноидной структуры. В 1-м фенотипе уровень катехинов значительно выше уровня флавонолов, во 2-м фенотипе содержание флавонолов выше уровня катехинов или практически одинаково. В насаждении преобладает 1-й биохимический фенотип. 2-й фенотип встречается в группе деревьев, устойчивых к мучнистой росе.
2. Поскольку восприимчивая группа деревьев составляет около 80-90% насаждения, рассматривается возможность обеспечения некоторого селективного преимущества 1-го биохимического фенотипа.

Литература

1. *Алтухов Ю.П.* Генетические процессы в популяциях.-Москва.-1989.-328с.
2. *Полякова Л.В.* Особливості мікроклонального розмноження сіянців дуба звичайного (*Quercus robur* L.) in vitro залежно від показників вторинного обміну // Лісівництво і агролісомеліорація.-2006.-в.109.-с.236-243.
3. *Шейн И.В., Андреева О.Н., Полякова Г.Г., Зражевская Г.К.* Изменение содержания фенольных соединений в каллусе сосны в ответ на элиситацию *Fusarium* разной степени патогенности // Физиол.раст.-2003.-Т.50.-В.5.-С.710-715.
4. *Covelo F., Gallardo A.* Temporal variation in total leaf phenolics concentration of *Quercus robur* in forested and harvested stands in northwestern Spain // *Can.J.Bot.*-2001.-V.79.-N11.-P.1262-1269.
5. *Julkunen-Tiitto R.* Phenolic constituents in leaves of northern willows: methods for the analysis of certain phenolics // *J.Agric.Food Chem.*-1985.-V.33.-P.213-217.
6. *Haukioja E., Ossipov V., Koricheva J., Hankanen T., Larsson S., Lempa K.* Biosynthetic origin of carbon-based secondary compounds: cause of variable responses of woody plants to fertilization ? // *J.Chemoecology.*-1998.-N3.-P.133-139.
7. *Oszako N., Woodward St.* Oak dieback. In: Possible limitation of decline phenomena in broadleaved stands// Warsaw, Poland.-2006.-P.7-20.
8. *Parker J.* Phenolics in black oak bark and leaves // *J.Chem.Ecol.*-1977.-V.3.-N5.-P.871-880.

Резюме

Изучали содержание веществ вторичного обмена (фенилпропаноидная группа) в листьях устойчивых и восприимчивых к заболеванию мучнистой росой деревьев дуба черешчатого. Выявлено присутствие двух биохимических фенотипов, различающихся пропорциональным соотношением синтезируемых в листьях катехинов и флавонолов. Преобладает фенотип, соответствующий восприимчивой группе деревьев.

Вивчали вміст сполук вторинного обміну (фенілпропаноїдна група) у листьях стійких і уразливих до борошністої роси деревах дуба звичайного. Знайдено наявність двох біохімічних фенотипів, різних за пропорційним відношенням синтезованих у

листьях катехинів і флавонолів. Фенотип уразливої групи переважає серед дерев насадження.

Content of second metabolites compounds (phenylpropanoid group) in oak leaves according their tolerance to mildew (*Microspheera alphitoides*) was studied. Two biochemical phenotypes were found. They differed with quantitative proportion of catechins and flavonols. The most widespread phenotypes were characteristic for susceptible oak trees.

ПОЛЯКОВА И.А.¹, ЛЯХ В.А.²

¹*Институт масличных культур УААН*

Украина, 70417, г. Запорожье, п. Солнечный, ул. Институтская, 1,

e-mail: Ira.Linum@mail.ru

²*Запорожский национальный университет*

Украина, 69600, г. Запорожье, ул. Жуковского, 66, e-mail: genetika@zsu.zp.ua

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ИНДУЦИРОВАННОГО МУТАГЕНЕЗА ДЛЯ РАСШИРЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ РЕСУРСОВ ЛЬНА

Известно, что мутагенез позволяет значительно расширять рамки формообразовательного процесса, построенного на спонтанных мутациях. В настоящее время во многих странах мира реализуются программы по использованию экспериментального мутагенеза в селекции растений [4]. Общее количество сортов, полученных методом экспериментального мутагенеза в мире, превышает 2000. Очень часто высокая продуктивность мутантных сортов обеспечивается принципиально новыми генами, детерминирующими отдельные ценные признаки и свойства растений [4]. Как отмечает И.А. Раппопорт [6], создание мутантных сортов базируется на большой частоте новых полезных мутаций, которые мобилизуют признаки недоступные другим методам селекции.

Лен является факультативным самоопылителем, поэтому увеличение генотипического разнообразия и обогащение генофонда является важной задачей при работе с данной культурой. Мутагенные факторы положительно влияют на формообразовательный процесс у льна и могут использоваться для изучения частной генетики культуры и для создания исходного материала для селекции, дополняя традиционные методы – отбор и гибридизацию [2, 5].

Материалы и методы

В опытах по индуцированному мутагенезу использовали линейный материал *Linum usitatissimum* L. из коллекции лаборатории селекции и генетики льна Института масличных культур УААН.

Воздушно-сухие семена линий обрабатывали γ -лучами в дозах 400 и 700 Гр. Во всех исследуемых поколениях проводили фенологические наблюдения и выделение измененных форм согласно существующих методик. Дальнейшее изучение выделенных растений и их описание проводили в соответствии с классификатором вида *Linum usitatissimum* L [3].

Математическую обработку проводили по общепринятым методикам статистической обработки экспериментальных данных.

Результаты и обсуждение

Использование экспериментального мутагенеза позволило значительно расширить наследственную изменчивость у льна масличного. В наших исследованиях спектр индуцированных гамма-лучами мутаций содержал такие наследственные изменения: нарушения синтеза хлорофилла (химера, *albina*, *xantha*, *viridis*, *virescent*, *xanthoviridis*, *striata*), окраски лепестков венчика (белая, бледно-бледно-голубая,

бледно-голубая, фиолетовая, лиловая, розовая) и пыльников, окраски семян (желтая и светло-коричневая), формы и размера цветка („нераскрывающийся венчик”, звездчатые, крупные, мелкие и гофрированные цветки), структуры стебля и листьев (утолщенные стебли и листья, высоко- и низкостебельные, карлики, многостебельные), различные проявления стерильности, скоро- и позднеспелые. Разнообразие мутантных линий льна с их подробным описанием представлено в каталоге [1].

Мутации с нарушением синтеза хлорофилла, окраски лепестков венчика и пыльников, окраски семян, а также формы цветка по возможности их использованию в селекционном процессе следует отнести к маркерным. Данные мутации составляют большую часть спектра наследственных изменений при обработке мутагеном семян льна масличного.

В современных условиях наличие маркерных признаков является неотъемлемым компонентом коммерческих сортов, поскольку значительно облегчает проведение апробации полевых посевов и ведение семеноводства. Еще Н.И. Вавилов, перечисляя требования к идеальному сорту пшеницы, в один ряд с признаками высокой продуктивности и качества урожая поставил также и наличие в данном сорте отличительных морфологических признаков.

До недавнего времени отличительные признаки сортов льна были незначительными. В основном отличия касались таких признаков как высота растений, количество стеблей на растении, количество завязавшихся коробочек. Преимущественными признаками цветка были голубая окраска лепестков венчика и пыльников, открытая форма цветка. Полученные нами с помощью мутагенеза признаки значительно расширили ряд маркерных, к которым, прежде всего, следует отнести признаки окраски цветка и семян, а также хлорофилльную недостаточность, не затрагивающую продуктивность растений.

Полученное разнообразие окрасок семян льна позволило начать исследования по их наследованию. Так, нами было установлено, что кремовая окраска, характерная для линии М-1, доминировала в F₁ над коричневой (М-12), а в F₂ наблюдалось расщепление в соотношении 3 кремовых и 1 коричневое. Кремовая окраска М-1 доминировала и над желтой, а в F₂ наблюдали расщепление по типу доминантного эпистаза, где 3/12 растений имели коричневую окраску семян (табл.1).

Таблица 1

Наследование кремовой окраски семян льна

Фенотип родителей		Фенотип гибридов		Модель расщепления F ₂
P ₁ ♀	P ₂ ♂	F ₀	F ₁	
М-1 кремовые	М-24, желтые	кремовые	кремовые	12:3:1 кремовые : коричневые : желтые
М-1 кремовые	М-12, коричневые	кремовые	кремовые	3:1 кремовые : коричневые

Часть мутантных линий составила коллекцию маркерных признаков. Ее используют как в генетических исследованиях, так и в селекционных программах. Мутантные линии характеризуются и высокими биохимическими показателями. Поэтому они находят широкое применение не только как источники маркерных признаков, но и представляют хозяйственную ценность.

Мутации структуры стебля и листьев, размера венчика, а также мутации по физиологическим признакам роста и развития были выделены с невысокой частотой. Однако они существенно затрагивают важные хозяйственно-ценные признаки и могут использоваться при создании принципиально нового сортового материала льна.

Необходимо отметить, что мутанты по морфологическим признакам часто несут изменения на биохимическом уровне. Такие линии особенно востребованы в селекции масличных культур, в том числе и льна. Так, нами был получен ряд морфологических мутантов с измененными биохимическими показателями, которые представляют интерес для селекции как высокомасличные, высокоолеиновые и высоколиноленовые линии (табл.2).

Таблица 2

Жирно-кислотный состав масла у выделенных по морфологическим признакам некоторых мутантов льна сорта Antares

Генотип	Жирные кислоты				
	C 16:0	C 18:0	C 18:1	C 18:2	C 18:3
Antares	2,9	3,0	22,1	7,5	64,5
№ 451	3,5	3,1	25,6***	10,1***	57,7***
№ 815	3,3	3,4	29,4***	8,9***	55,0***
№ 538	4,1***	6,2***	27,0***	12,3***	50,4***
№ 818	3,2	3,9	22,6	7,9	62,2
№ 830	3,8***	5,7***	22,8	10,8***	56,9***
№ 465	3,8***	5,6***	24,7***	7,9	58,0***
№ 835	5,7***	2,4	34,6***	11,3***	46,0***

Прим. *** - отличия от исходного образца существенны при $P < 0.001$.

Выделенные по хозяйственно-ценным признакам мутанты оказались интересными и как компоненты скрещиваний и как новый сортовой материал. Известно, что прямой отбор мутаций считается наиболее эффективным способом создания новых сортов. Поэтому, часть полученных нами мутантных линий были включены в селекционные программы лаборатории селекции и генетики льна и прошли оценку в различных селекционных питомниках (1999-2005 гг.). В результате созданы сорта Айсберг (М-12 – А.с.№ 1364), Золотистый (М-28 – А.с. № 05131), Кивика – (М-19 – А.с. № 07142, патент №07145). Использование данных линий как источников ценных признаков дало возможность начать изучение наследования ряда биохимических показателей и сформировать отдельные селекционные направления: М-12 – донор высокой масличности и скороспелости; М-28 – донор высокого содержания линоленовой кислоты и высокой масличности (технические масла); М-19 – донор высокого содержания олеиновой кислоты (пищевое использование масла).

Выводы

1. Индуцированный мутагенез с использованием гамма-лучей значительно расширил рамки формообразовательного процесса у льна и обеспечил получение мутантных сортов и новых маркерных признаков.
2. Установлено, что кремовая окраска семян доминировала над коричневой с расщеплением в F_2 в соотношении 3 : 1. При доминировании кремовой окраски над желтой в F_2 наблюдали расщепление по типу доминантного эпистаза.
3. Значительная часть морфологических мутантов характеризовалась измененными биохимическими показателями. Такие мутанты широко используются в селекции льна как высокомасличные, высокоолеиновые и высоколиноленовые линии.

Литература

1. Генетическая коллекция вида *L. usitatissimum* L. (каталог)» / В.А. Лях, Л.Ю. Мищенко, И.А. Полякова; под ред. В.А. Ляха. – Запорожье: Институт масличных культур, 2003 г. – 60 с.
2. Дынник В.П. Влияние некоторых химических мутагенов и условий

выращивания мутантных форм на изменчивость льна-долгунца: Дис... канд. с.-х. наук. – К., 1973. – 145 с.

3. Международный классификатор СЭВ вида *Linum. usitatissimum* L. – Ленинград: ВИР, 1989. – 28 с.

4. Моргул В.В. Спонтанна та індукована мутаційна мінливість і її використання в селекції рослин // Генетика і селекція в Україні на межі тисячоліть. – Київ: Логос, 2001. – Т. 2. – С. 144 – 174.

5. Полякова І.О. Спадкова мінливість у льону олійного індукована гамма-променями. Дис. канд. біол. наук: 03.00.15 / Ін-т фізіології рослин і генетики НАН України. – Київ, 2003. – 166 с.

6. Раппопорт И.А. Значение генетически активных соединений в фенотипической реализации признаков и свойств // Химический мутагенез в селекционном процессе. – М.: Наука, 1987. – С.3 – 53.

Резюме

Рассматриваются особенности формообразовательного процесса у льна при обработке семян гамма-лучами. Получен широкий спектр мутантных линий, которые используются как источники маркерных признаков и как готовые сорта. Установлено, что кремовая окраска семян доминировала над коричневой и желтой, а в F₂ наблюдали расщепление в соотношении 3:1 и 12:3:1, соответственно.

Розглядаються особливості формоутворювального процесу у льону при обробці насіння гамма-променями. Одержано широкий спектр мутантних ліній, які використовуються як джерела маркерних ознак і як готові сорти. Встановлено, що кремове забарвлення насіння домінувало на коричневим і жовтим, а в F₂ спостерігали розщеплення у співвідношенні 3:1 і 12:3:1, відповідно.

Peculiarities of induced genetic variability in flax after seed treatment with gamma-rays are examined. The broad spectrum of mutant lines, which are used both sources of marker traits and new varieties, was received. It is established that cream color of seeds dominates over brown and yellow colors. In F₂ segregation in ratio of 3:1 and 12:3:1 is observed, respectively.

ПРИБЛУДА І.В., ЧУГУНКОВА Т.В.

*Институт фізіології рослин і генетики НАН України
Україна, 03022, Київ, вул. Васильківська, 31/17*

ОСОБЛИВОСТІ ВПЛИВУ НИЗЬКИХ ДОЗ МУТАГЕНІВ НА ПЕРЕЗИМІВЛЮ ГІБРИДІВ ОЗИМОЇ ПШЕНИЦІ

Серед факторів, що забезпечують одержання високих і стабільних врожаїв сільськогосподарських культур, в сучасних умовах провідне місце займає генетико-селекційне поліпшення культури [1]. Одним із методів, що дозволяє більш повно реалізувати генетичні можливості рослин, є метод експериментального мутагенезу. Він дозволяє отримувати нові мутації і забезпечує поліпшення існуючих ознак і властивостей, що контролюються полігенно, зокрема, елементів продуктивності, кількісних і якісних характеристик білків. Можливо одержати позитивні зміни в адаптивному потенціалі сортів, стійкості до несприятливих умов середовища і патогенних організмів. Під впливом мутагенних факторів можливо забезпечити позитивні зміни існуючих негативних кореляційних залежностей, зокрема, між продуктивністю і вмістом білку, вмістом білку і його якістю, морозостійкістю та

короткостебловістю та інші [2]. Підтвердженням ефективності мутаційної селекції є факт реєстрації на кінець 2006 року в світі 2542 сортів культурних рослин створених за допомогою методів експериментального мутагенезу.

Важливою проблемою в галузі експериментального мутагенезу є виявлення шляхів підвищення частоти індукованих мутацій і відносного виходу практично цінних мутантів, зокрема морозо- та зимостійких. Це завдання, як правило, вирішують шляхом підбору найбільш ефективних мутагенних факторів, варіюванням їх доз та експозицій обробки експериментального матеріалу. Доза мутагенного фактору, при якій виживає 20-30% рослин, здатних утворювати насіння, вважається критичною. Однак практика мутаційної генетики і селекції показала недоцільність використання критичних доз внаслідок зростання частки летальних мутацій і значної загибелі мутантних клітин. Низькі дози, на відміну від високих, частіше змінюють кількісні адаптивні ознаки, що може відіграти позитивну роль в структурі популяцій [2, 3].

Ознаки зимо- і морозостійкості озимої пшениці знаходяться під полігенним контролем, але конкретні відомості про характер успадкування зазначених ознак досить суперечливі. Наукові дані багатьох досліджень показали, що для гібридів характерним є домінування більш зимостійких батьківських форм, проміжне успадкування, або інше.

Завданням нашої роботи був аналіз перезимівлі рослин гібридно-мутантних популяцій озимої м'якої пшениці оброблених хімічними мутагенами.

Матеріали та методи

Матеріалом для проведення досліджень були гібридно-мутантні популяції озимої м'якої пшениці $F_2 M_2 - F_3 M_3$, одержані шляхом гібридизації сортів та ліній вітчизняної та зарубіжної селекції. Рівень перезимівлі підраховували на початку відновлення весняної вегетації як відсоток від кількості рослин, що зійшли. Всього було проаналізовано 33 гібридних популяції. В кожній гібридній популяції підрахунки проводили на 3-5 ділянках площею 1 м^2 . Одержані дані обробляли статистично.

Результати та обговорення

Вживання рослин після обробки насіння мутагенами, як правило, знижується. Однак, є дані і про стимулюючу дію низьких і оптимальних доз хімічних мутагенів. В таблиці представлено результати перезимівлі рослин по окремих гібридно-мутантних популяціях у вегетаційний період 2007-2008 рр., які найбільш характерні для досліджуваного матеріалу.

В проаналізованих гібридно-мутантних популяціях, що вирости після обробки гібридного насіння F_1 НЕС 0,005% відсоток рослин після перезимівлі коливався від 72 до 93% і в середньому складав 82,2%. В досліджуваний період найкраще перезимували гібриди №5953, одержані від схрещування іноземного та вітчизняного сорту з підвищеною зимостійкістю. Перезимівля рослин в популяціях, оброблених НМС 0,005%, в середньому була дещо нижчою (78,4%) порівняно з контролем і популяціями обробленими НЕС 0,005%. Мінімальний рівень перезимівлі на рівні 66% спостерігали в гібридно-мутантній популяції №6019, батьківськими формами якої були сорти південного еко типу.

Таблиця

Результати перезимівлі гібридів озимої пшениці

Умовний номер гібриду	Мутагенний чинник, концентрація	Вживання після перезимівлі, % $X \pm S_x$
5919	Стандарт	81±1,9
5968	НЕС 0,005	79±2,2
6229-II	-//-	87±2,0
5951-II	-//-	80±1,8
5953	-//-	93±2,5

6231-II	-//-	72±2,8
середнє		82,2±2,2
6000	НМС 0,005	77±2,2
6008	-//-	80±1,8
6019	-//-	66±3,0
6027-II	-//-	78±2,2
6066	-//-	91±2,6
середнє		78,4±2,4

Висновки

Таким чином, аналіз рослин гібридно-мутантних популяцій озимої м'якої пшениці за використання НЕС 0,005% та НМС 0,005% засвідчує, що суттєвого зниження рівня перезимівлі в порівнянні з контролем не спостерігалось. Коливання показника перезимівлі по окремих комбінаціях схрещування залежали від генотипів рослин гібридних популяцій.

Література

1. *Моргун В.В., Логвиненко В.Ф.* Мутационная селекция пшеницы.-К.: Наукова думка, 1995.-626 с.
2. *Матвієць В.Г., Мошенко М.М., Шудря П.П.* Результати селекційної роботи з озимою пшеницею на Весело подільській дослідно-селекційній станції // Зб. наук. праць ІЦБ УААН.-К.-2004,-Вип.7.-С. 55-64.
3. *Якимчук Р.А., Моргун В.В.* Генетична активність низьких доз фізичних та хімічних мутагенних факторів на озимій пшениці// Наук. вісник Ужгородського державного ун-ту: Сер. Біологія.-2000.-№8.-С.167-171.
4. *Ковтун В.И., Гричаникова Т.А.* Селекция озимой пшеницы на морозозимостойкость и продуктивность // Сб. Селекция и технология возделывания озимой пшеницы, твердой и тургидной пшеницы, тритикале. Зерноград, 2001.- С. 106-110.

Резюме.

Представлено результати перезимівлі рослин гібридно-мутантних популяцій озимої м'якої пшениці другого-третього покоління після обробки хімічними мутагенами вихідних гібридних форм.

Представлены результаты перезимовки растений гибридно-мутантных популяций озимой мягкой пшеницы второго-третьего поколений после обработки химическими мутагенами исходных гибридных форм.

We report above spend the winter of hibrid plants second and third generation of different population winter soft wheat after influences chemical mutagens.

**РЕШЕТНИКОВ В.Н., СПИРИДОВИЧ Е.В., МАКЕДОНСКАЯ Н.В., ЧИЖИК О.В.
АНТИПОВА Т.В., БРЕЛЬ Н.Г**

*Центральный Ботанический сад Национальной Академии наук Беларуси,
Беларусь, 220012, Минск, ул. Сурганова 2В, belsyringa@mail.ru*

ИЗУЧЕНИЕ ГЕНОФОНДА СИРЕНИ В ЦБС НАН БЕЛАРУСИ

Коллекция сирени ЦБС НАН Беларуси, созданная методом прививки с 1954-1964гг., состоит из более 200 таксонов. Она является достаточно обширной по видовому, сортовому и гибриднему разнообразию и постоянно пополняется новыми сортами. Она также служит источником для селекционной работы и размножения перспективных и редких сортов.

В коллекции представлены 23 вида и 200 сортов разного срока цветения с простыми (60%) и махровыми (40%) цветками с широкой цветовой гаммой: белой (18%), лиловой (48%), розовой (14%), пурпурной и фиолетовой (20%). Идет пополнение новыми сортами корнесобственного происхождения, которые позволят омолодить коллекцию. Еще одним направлением работы с коллекцией сирени в ЦБС является сохранение генетического биоразнообразия в культуре *in vitro*. В настоящее время в коллекции *in vitro* сохраняется 30 сортов сирени. Оптимизируются биотехнологические приемы их эффективного микроклонирования. Ведется поиск лучших агротехнических приемов и методов адаптации клонированного растительного материала. Идет создание маточных плантаций оздоровленного сортового материала. Параллельно проводится молекулярно-генетическое маркирование клонов сирени, полученных в культуре *in vitro*.

Данные, полученные на основе многолетних фенологических наблюдений, изучения особенностей роста и цветения, нуждаются в систематизации и дополнении биохимическими характеристиками. Сложность генетической интерпретации морфологических признаков, связанная с полигенным наследованием и, как правило, сильным влиянием среды на фенотипическое проявление признака, зачастую ограничивает использование методов традиционного описания морфологических и цитологических характеристик растений.

Материалы и методы

Начиная с 2004 г. в ЦБС НАН Беларуси начаты работы по изучению генома сирени помощью RAPD-метода, позволяющего идентифицировать имеющиеся в коллекции дикорастущие виды и культурные сорта.

Молекулярно-генетические методы анализа, основанные на проведении полимеразной цепной реакции (ПЦР), за последние 20 лет стали одними из самых популярных и используются в настоящее время для изучения многих видов организмов. Они отличаются высокой эффективностью, производительностью, хорошей воспроизводимостью и относительной экономичностью. Все вышеперечисленные достоинства в полной мере относятся к RAPD-методу, основанному на изучении произвольно-амплифицированной полиморфной ДНК (RAPD) [1]. Простота этого метода обеспечивается тем, что он не требует предварительного знания специфической последовательности амплифицируемой ДНК, поэтому для его проведения используются праймеры, отобранные произвольным образом.

Для RAPD-анализа генома сирени из коллекции ЦБС НАН Беларуси были отобраны следующие представители: 4 вида *Syringa amurensis*, *S. pekinensis*, *S. chinensis*, *S. vulgaris* и следующие сорта сирени обыкновенной: Хорошее настроение, Павлинка, Лунный свет, Вера Хоружая, Президент Гречи, Лебедушка, Минчанка, Красавица Москвы, Радж Капур, Реомюр, Эстер Стейли, Нестерка, Президент Пуанкаре и сирень группы Престона -Роялти. Препараты суммарной ДНК получали по методике [2] из листьев растений. В работе использовали 10 олигонуклеотидных десятичленных праймеров. Продукты ПЦР разделяли и визуализировали по стандартным методикам [3].

Результаты и обсуждение

Первым этапом работы при использовании молекулярных методов исследования ДНК растений, является получение высокоочищенной геномной ДНК из различных растительных тканей. Несмотря на существование ряда опубликованных протоколов по выделению тотальной ДНК растений, при работе со сложными для исследования древесными культурами, к которым относится и сирень, необходима модификация этих методик. Это связано с наличием в клетках этих растений большого количества вторичных метаболитов, в том числе эндогенных полисахаридов и фенольных соединений, которые трудно отделить от ДНК. Образцы ДНК, полученные нами по

нескольким стандартным методикам [4, 5] содержали большое количество примесей и не могли быть использованы для дальнейшего RAPD-анализа. Модификация протокола выделения тотальной растительной ДНК с помощью СТАВ-буфера, позволила получить высококачественную тотальную ДНК сирени. В результате данного этапа работы также установлено, что наиболее подходящим растительным материалом являются молодые, активно растущие побеги и листья.

Следующий этап работы состоял в оптимизации RAPD-метода и идентификации праймеров, которые обнаруживают полиморфизм применительно к отобраным видам и сортам коллекции сирени. Испытано 10 произвольных десятичленных праймеров, различающихся по нуклеотидной последовательности и проценту G-C пар нуклеотидов. Проведенное электрофоретическое фракционирование продуктов полимеразной цепной реакции препаратов ДНК с этими произвольными десятичленными праймерами (RAPD) позволило выявить широкий спектр амплимерных зон. Следует отметить, что из 10 использованных праймеров, полиморфные спектры были получены по 6 из них для изучаемых образцов ДНК сирени. Анализ по данным праймерам у исследованных образцов обнаружил амплимерные зоны, 29 из которых были полиморфны. На основании полученных RAPD-спектров для всех исследованных сортов сирени были составлены многолокусные RAPD-паспорта. Следует отметить, что использовали амплимерные зоны, электрофоретическая идентификация которых была наглядна и легка, а генетическая детерминация не вызывала никаких сомнений. Для количественной оценки полиморфизма и определения уровня дивергенции между исследуемыми сортами сирени результаты RAPD-анализа были представлены в виде матрицы состояний бинарных признаков, где присутствие фрагмента принималось за 1, отсутствие – за 0. Величина размера каждой амплифицированной зоны вычислялась относительно электрофоретической подвижности маркеров с известной молекулярной массой. Обозначение зон производилось по названию праймера, использованного для полимеразной цепной реакции, и размера зоны (в парах нуклеотидов) в надстрочнике.

Показано, что популяции различаются по генетической вариабельности их представителей, которая выражалась не только в наличии полиморфных локусов в ДНК некоторых растений, но и в варьировании интенсивности гомологичных фрагментов в профилях амплификации ДНК у разных растений.

Для стабильного поддержания коллекции *in vitro* наряду с подбором оптимального состава питательных сред, используемого гормонального баланса немаловажным условием является сохранение целостности генотипа полученных микропобегов. Изменчивость среди растений, регенерированных *in vitro*, бывает очень высокой. Наиболее вероятными источниками генетической вариабельности могут быть мутации, хромосомные нарушения, а также возникновение полиплоидных клеток. Эти нарушения накапливаются главным образом при культивировании каллусных тканей. Следует отметить, что в нашем случае микропобеги сирени получали прямым органогенезом из апикальных и аксиллярных почек, без образования каллуса. Таким образом, этап при котором наблюдается накопление генетических отклонений, а именно – культивирование каллуса, отсутствует в разработанной нами технологии. Для подтверждения генетической идентичности полученных клонов с исходными генотипами проведено сравнение продуктов RAPD-PCR полученных клонов с продуктами RAPD-PCR исходных генотипов. Для анализа использовали праймеры показавшие наибольший полиморфизм на различных генотипах сирени .

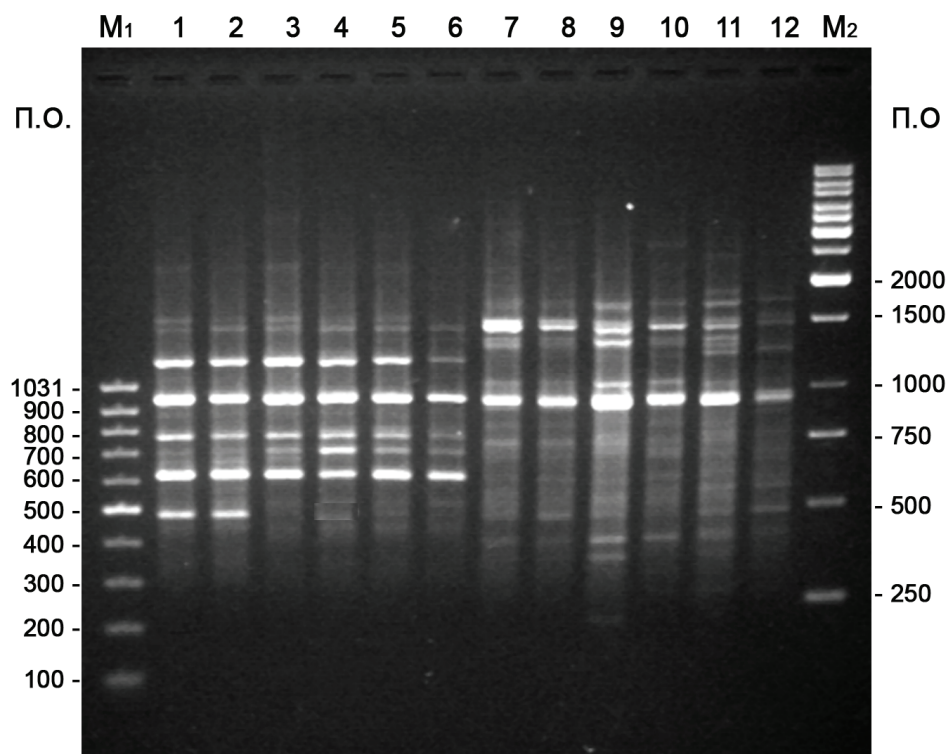


Рисунок 1 - RAPD-анализ ДНК исходных сортов и микроклонов сирени.

Оligo18: 1 - сорт М.Шолохов; 2 - микроклон М.Шолохов; 3 - сорт Флора; 4 - микроклон Флора; 5 - сорт Жемчужина; 6 - микроклон Жемчужина; **Оligo19:** 7 - сорт М.Шолохов; 8 - микроклон М.Шолохов; 9 - сорт Флора; 10 - микроклон Флора; 11 - сорт Жемчужина; 12 - микроклон Жемчужина; **M1** – маркеры размеров ДНК (100bp DNA Ladder, Fermentas); **M2** – маркеры размеров ДНК (1kb DNA Ladder, Fermentas).

При сравнении продуктов RAPD-PCR полученных клонов с продуктами RAPD-PCR исходных сортов различий не обнаружено, что может служить доказательством генетической идентичности полученных клонов и материнских сортов. Таким образом, разработанная система микроклонального размножения сирени может использоваться для получения генетически однородных побегов широкого спектра генотипов сирени.

Выводы

Проведенная работа позволила перевести исследования растений сирени на качественно новый уровень, систематизировать по ряду биохимических показателей. В результате проведенных исследований отработан метод выделения высокоочищенной геномной ДНК из листьев сирени, подобраны эффективные праймеры и оптимизированы условия проведения ПЦР, адаптирован метод RAPD-анализа для паспортизации сирени.

Изучение коллекции сирени ЦБС НАН Беларуси в рамках выполненных проектов позволила создать компьютерную базу данных, которая объединяет сведения по систематике, фенотипические признаки, геоботанические показатели, условия культивирования, биохимические характеристики, а также рекомендации по их использованию в различных отраслях народного хозяйства республики.

Литература

1. Сиволап Ю.М., Календарь М.Н., Чеботарь С.В. Генетический полиморфизм злаковых растений при помощи ПЦР с произвольными праймерами.- в: Цитология и генетика, – 1994, 28:54-61.
2. Doyle J.J., Doyle J.L. Isolation of plant DNA from plant tissue / Focus.— V.12.— 1990.— P. 13–15.

3. *Westermeyer R.* Electrophoresis in practice (Third Edition).—WILEY-VCH Verlag: Weinheim, 2001.— 349 p.
4. *Kim K.J., Jansen R.K.* A chloroplast DNA phylogeny of lilacs (*Syringa*, Oleaceae): plastom groups show a strong correlation with crossing groups // *Am. Bot.* 1998. V. 85. № 9. P. 1338-1351.
5. *Li J., Alexander J., Zhang D.* Paraphyletic *Syringa* (Oleaceae): evidence from sequences of nuclear ribosomal DNA ITS and ITS regions // *System. Botany J.* 2002. V. 27. №33. P.592-597.

Резюме

Найден быстрый и простой метод выделения ДНК из листовой ткани сирени, подобраны эффективные праймеры и оптимизированы условия проведения полимеразной цепной реакции. Адаптирован метод RAPD-анализа для популяционно-генетических исследований с составлением многолокусных RAPD-паспортов сирени. Подтверждена генетическая стабильность полученных микропоголов и материнских сортов.

The new milestone in selective-genetic investigation of syringa is to find molecular markers on DNA basis, which allow to carry out genotyping of cultivars of this culture. The rapid and easy method of DNA isolation from leaf tissue of syringa is found, effective primers are selected and the conditions for PCR are optimized. The method of RAPD analysis are adapted for population-genetic investigations and for syringa passportisation.

РЯБЧУН В.К.¹, КРИВОШЕЄВА О.В.¹, ВЕДМЕДЕВА К.В.²

¹ *Інститут рослинництва ім. В.Я. Юр'єва УААН,*

Національний центр генетичних ресурсів рослин України

² *Інститут олійних культур УААН*

61060, Харків, Московський проспект., 142, E-mail: ncpgru@kharkov.ukrtel.net

ФОРМУВАННЯ ТА ВЕДЕННЯ НАЦІОНАЛЬНОЇ БАЗОВОЇ КОЛЕКЦІЇ СОНЯШНИКУ В УКРАЇНІ

Наявність широкого генетичного різноманіття культури соняшнику і її диких родичів дозволяє ефективно вирішувати теоретичні і практичні питання створення нових більш досконалих сортів і гібридів. Ефективна селекційна робота базується на основі цілеспрямованого залучення нового вихідного матеріалу з визначеними донорськими властивостями.

Для довгострокового зберігання, забезпечення ефективного використання генетичного різноманіття соняшнику в селекційних, наукових, навчальних і інших програмах та обміну колекційними зразками із зарубіжними генбанками в Інституті рослинництва ім. В.Я. Юр'єва УААН та Інституті олійних культур УААН з 1992 року цілеспрямовано формується базова колекція цієї культури.

Основними напрямками роботи є пошук та інтродукція зразків, подальше їх вивчення за комплексом ознак та формування на цій основі ознакових колекцій, паспортизація зразків генофонду та створення інформаційної бази даних, зберігання зразків генофонду у життєздатному стані та генетичній стабільності, забезпечення селекційних та наукових установ, учбових закладів зразками та інформацією про генофонд культури.

Особлива увага має приділятися мобілізації та всебічному вивченню генетичних ресурсів з метою формування базової, ознакових, генетичних, спеціальних та інших колекцій.

Матеріали і методи

Колекція соняшнику України включає на 01.01.2008 р. 1090 зразків, з яких 22 – місцеві сорти і форми, 351 – селекційні лінії, 244 – селекційні сорти України і зарубіжних країн, 23 – синтетичні популяції, 283 – генетичні лінії, 130 – зразків диких видів та різновидів роду *Helianthus L.* Вони зосереджені в Інституті рослинництва ім. В.Я.Юр'єва УААН, м. Харків (394 зразки) та Інституті олійних культур УААН, м. Запорозжя (696 зразків). Зразки походять з 18 країн світу.

Вивчення колекційних зразків проводили відповідно до «Методических указаний по изучению мировой коллекции масличных культур. Подсолнечник» [1]. Опис морфологічних та біологічних ознак рослин соняшнику, їх класифікацію за господарськими, біологічними особливостями та хімічним складом насіння здійснювали за «Широким унифицированным классификатором СЭВ рода *Helianthus L.*» [2] і «Методикою проведення експертизи сортів рослин на відмінність, однорідність, стабільність (ВОС) (соняшник) [3].

Оцінку стійкості та ураженості колекційних зразків до збудників основних захворювань соняшнику проводимо в лабораторних і польових умовах на штучному і природному інфекційних фонах за загальноприйнятими методиками. Весь колекційний матеріал оцінено у лабораторних умовах експрес-методом на стійкість до несправжньої борошнистої роси (*Plasmopara helianthi Novot.*) - раси № 9 (330), № 4 (710) і в польових умовах - ураженість рослин расою № 9 (330) за класифікацією Т.Т.Гуліа [4]. При оцінці на стійкість рослин до *Orobancha cununa Wall.* брали суміш ізолятів (донецький, харківський, одеський).

Результати та обговорення

У якості цінного вихідного матеріалу інтерес для селекціонерів становлять місцеві сорти-популяції і дикі види роду *Helianthus L.*, що у своїх генотипах несуть адаптивність до біо- та абіотичних чинників навколишнього середовища. Вивчення колекційних зразків дозволило досить широко оцінити їх і виділити джерела цінних господарських ознак. Дані по 99 сортах-популяціях і 7 лініях представлено у каталозі «Господарсько-біологічна характеристика національної колекції соняшнику» [5]. Зразки, що виділено за окремими показниками наведено нижче.

Тривалість вегетаційного періоду. Інтерес для селекції на скоростиглість представляють зразки скоростиглої та ранньостиглої груп, яких у колекції НЦГРРУ нараховується по селекційних сортах відповідно 14,6 і 36,2%, по самозапилених лініях – 4,0 і 74,3%.

Найменшу тривалість періоду вегетації відзначено у сортів з Росії: Белгородский ультраскороспелый (UE0100053), Енисей (UE0100052), Саратовский 82 (UE0100147); з України: Ранок (UE0100143), Сур (UE0100281) – 90 діб, Харківський скоростиглий (UE010009) – 95 діб та інші. Самозапилені лінії - джерела скоростиглості Х 818В (UE0100423), Х 821В (UE0100424), Х 833В (UE0100433); Х 847В (UE0100443), Х 908А (UE0100269) та інші.

До групи пізньостиглих віднесено 24,6% сортів. Найбільш пізньостиглими (вегетаційний період більш 126 діб) є сорти силосного типу Місцевий 13 (UE0100122) з Росії, Місцевий 14 (UE0100123) з Німеччини, кондитерського типу Запорізький кондитерський (UE0100042) з України, Mezohegesi (UE0100115) з Угорщини й інші.

Продуктивність – одна з найбільш важливих господарських ознак. Для порівняння сортів за цим показником за стандарт узятий кращий районований сорт Харківський 7. Виділено групу зразків, що за трирічними даними за продуктивністю і масою 1000 насінин значно перевищили стандарт. Це сортозразки з Росії: Мастер (UE0100280), Бородинский (UE0100275) - вони перевищили стандарт за продуктивністю відповідно на 39,8 г, 40,1 г. Сорт Лакомка (UE0100279) має масу 1000 насінин на 38,6 г вище, ніж у стандарта.

Серед ліній в якості донорів високої продуктивності і крупнонасінності в гетерозисній селекції можуть використовуватись лінії X 908 (UE0100269), X 1006 (UE0100271), X 1007 (UE0100526); X 2552 (UE0100529), X 3848 (UE0100530), X 4353 (UE0100531).

Біохімічний склад насіння. За показниками якості насіння колекційні зразки розділено на 2 групи: з підвищеним вмістом олії та з підвищеним вмістом білка.

До групи високо олійних увійшли зразки з вмістом олії в сім'янці більш 48% і в ядрі - більш 67%: це сорти з Росії Вейделевський (UE0100020), Воронежський 272 (UE01000272), Саратовський 85 (UE0100085); з України Харківський 7 (UE0100013), Харківський скоростиглий (UE010009) та інші. Серед лінійного матеріалу в якості донорів високого вмісту олії можуть бути використані в селекції самозапильні лінії X 503 (UE0100525), X 908 (UE0100269), X 1002 (UE0100527), X 1006 (UE0100271), X1007 (UE0100526), X 2111 (UE0100272), X 2552 (UE0100529), X 3848 (UE0100530), X 4353 (UE0100531) та інші. Донор високого вмісту олеїнової кислоти – X 526 (UE0100072).

До групи високобілкових віднесено зразки з вмістом білка в ядрі сім'янки більше 28%: це сорти з Росії - ВНИИМК 1646 (UE0100078), ВНИИМК 8931 (UE01000106), Ермак (UE0100025); з України – Ранок (UE0100950), Місцевий 1 (UE0100029); з Казахстану – Кустанайський 91 (UE0100274) та інші.

За якістю олії виділено зразки – донори високого вмісту олеїнової кислоти, та зі зміненим складом токоферолів. Створено синтетичні популяції які мають одночасно вміст олеїнової кислоти більше 50 % та підвищений вміст β та γ токоферолів: СП-1 (UE0100651), СП-3 (UE0100652), СП-5 (UE0100653), СП-7 (UE0100654), СП-9 (UE0100655).

Стійкість до збудників хвороб. Створення стійких до захворювань сортів і гібридів соняшнику передбачає включення в їхній родовід джерел з генами стійкості до патогенів. Ознака стійкості вихідного матеріалу до збудників хвороб є одним з найбільш важливих, тому необхідно проводити оцінку колекційного матеріалу з метою виділення стійких до збудників хвороб форм соняшника.

Згідно з даними імунологічних досліджень виявлено зразки, стійкі до групи захворювань. Генетичну стійкість до збудника несправжньої борошністої роси (раса № 9 (330) і до вовчка (суміш ізолятів: харківська, донецька, одеська) мають 6 самозапильних ліній: X 720В (UE0100720), X 726В (UE0100389), X 738В (UE0100397), X 764В (UE0100401), X 767В (UE0100153).

Вивчення колекції соняшнику дозволило сформувати та зареєструвати:

- спеціальну ознакову колекцію генофонду соняшнику за ознаками відмінності (свідоцтво № 27 від 05.01.07) - до складу колекції входить 50 зразків з 13 країн світу, оцінених за 47 ознаками;
- навчальну колекцію генофонду соняшнику (свідоцтво № 33 від 12.03.07) - у складі колекції 66 зразків з 15 країн світу;

Генетичний контроль морфологічних маркерних ознак. В Інституті олійних культур УААН (м. Запорозжя) на базі світової колекції соняшнику Всеросійського інституту рослинництва (м. Санкт-Петербург, Росія), колекційного матеріалу Всеросійського НДІОК, а також власної ознакової колекції впродовж останнього десятиліття проводиться планомірне вивчення генетики морфологічних ознак (форма, забарвлення та розташування у просторі органів рослин: сім'ядолей, листків, черешків, стебел, кошиків, листків обгортки, язичкових та трубчастих квіток, пилку).

За результатами вивчення 197 зразків різних за морфологічними ознаками було описано й ідентифіковано зразки з 53 генами морфологічних ознак альтернативного прояву, виявлено зразки з трьома парами зчеплених генів [6]. Створені нові зразки генетичної колекції поєднують по 2, 3 і більше генів морфологічних ознак. За підсумками досліджень сформовано набір 33 зразків соняшнику – джерел 27

морфологічних маркерних ознак, до якого увійшли зразки з раніше відомими ознаками так і з 7 новими, вперше описаними: “світло-коричневе забарвлення листків” (ген *lb*), “нижні листки, що біліють” (ген *wl*), “деградація верхівки листової пластинки” (ген *rtl*), та ін. Колекція включає генетичні джерела ознак, перспективних для маркування ліній соняшнику в насінництві.

У Національному центрі генетичних ресурсів рослин України зареєстровано генетичну колекцію генофонду соняшнику за морфологічними ознаками (свідоцтво № 43 від 12.03.07.). До складу колекції входить 71 зразок з 12 країн світу, серед них 40% - лінії селекції ІОК УААН: КГ 118 (UE0100428), КГ-102 (UE0100416), КГ-104 (UE0100418), КГ-105 (UE0100419) та інші. До цієї колекції увійшли зразки з визначеним генетичним контролем морфологічних ознак. Загальна кількість представлених у колекції генів 47. За результатами досліджень з генетики морфологічних ознак соняшнику було виділено зразки для декоративного використання. Два з них: сорти Малиш (UE0100972) та Ніжність (UE0100971) включено до Реєстру сортів рослин України.

Міжвидова гібридизація. Дикі види соняшнику – джерело цитоплазматичної чоловічої стерильності та генів відновлення фертильності пилку, стійкості до патогенів та несприятливих абіотичних чинників, мають цінний біохімічний склад жиру. До складу колекції НЦГРРУ входить 130 зразків диких видів та різновидів одно- та багаторічного типу розвитку, представників ди-, тетра- та гексаплоїдних груп. Цей матеріал вивчається, залучається в міжвидові схрещування з використанням біотехнологічних методів.

Висновки

У НЦГРРУ сформовано базову, ознакову та генетичну колекції соняшнику, що включають генетичне різноматіття сортового і лінійного матеріалу за господарськими і морфологічними ознаками рослини. Виділено джерела цінних господарських та морфологічних маркерних ознак з метою використання в селекційних програмах для створення нових гібридів і сортів різних напрямів використання.

Література

1. Методические указания по изучению мировой коллекции масличных культур. Подсолнечник / Сост. А. Анащенко. – Л.: Изд. ВИР.-1976.– Вып. 2.– 40 с.
2. Широкий унифицированный классификатор СЭВ рода *Helianthus* L / Сост. А Анащенко, В. Корнейчук, А. Врынчану и др. – Л.: Изд. ВИР.-1987.– 25 с.
3. Охорона прав на сорти рослин. Методика проведення експертизи сортів рослин на відмінність, однорідність, стабільність (ВОС)(соняшник). К.: Алефа,-2003.-С.18-40.
4. *Gulia T.J.* Proposal for a revised system of classifying races of sunflower downy mildew / Proc. 17-th sunflower Res. Workshop, Fargo, ND.–1995.–12-13 January.–P.76-78. Natl. Sunflower Assoc., Bismark, ND.
5. *Петренкова В.П., Кривошеєва О.В., Рябчун В.К. та ін.* Господарсько-біологічна характеристика національної колекції соняшнику: Каталог.-Харків: ІР, 2003.-Вип. 1.-123 с.
6. *Ведмедева К.В.* Створення колекції джерел морфологічних маркерних ознак соняшнику і вивчення їх генетичного контролю: Автореф. дис. ... кандидата біол. наук / СГІ НЦНС УААН. – Одеса, 2004.–16 с.

Резюме

Изложены результаты формирования базовой коллекции подсолнечника по морфологическим, биологическим и другим хозяйственным признакам в условиях Украины. Выделены источники с высоким уровнем ценных хозяйственных признаков, доноры морфологических признаков, которые могут быть использованы как исходный материал в селекции сортов и гибридов.

There have been presented the data on the studies of the sunflower gene pool as to morphological, biological, economical traits and with resistance to pathogens causing major diseases of sunflower under the conditions of Ukraine. There have been identified the sources possessing a high level of the economical traits, of morphological marker traits, which can be used as the initial material for breeding varieties and hybrids.

САБАДИН В.Я., КОЧМАРСЬКИЙ В.С., ГУДЗЕНКО В.М.

*Миронівський інститут пшениці імені В.М. Ремесла УААН,
Україна, 08853, Київська область, Миронівський район, с. Центральне,
e-mail:mwheats@ukr.net;mironovka@mail.ru*

ВИКОРИСТАННЯ ГЕНЕТИЧНИХ РЕСУРСІВ ДЛЯ СЕЛЕКЦІЇ ЯЧМЕНЮ ЯРОГО В ПРАВОБЕРЕЖНОМУ ЛІСОСТЕПУ УКРАЇНИ

Ячмінь – одна з найважливіших сільськогосподарських культур із багатостороннім використанням. Зерно ячменю – це поживний концентрований корм для тварин та цінна сировина для харчової і пивоварної промисловості. Характерною рисою виробництва ячменю в Україні завжди були нестабільність врожаїв і валових зборів зерна через умови вирощування. Суттєвими є втрати від хвороб, які в Україні можуть становити до 2 млн. т зерна щороку. Тому в центрі уваги селекційних програм повинні переважати напрямки на зростання та стабілізацію врожаїв [1].

Одним із основних елементів збільшення урожайності ячменю є селекція нових, екологічно пластичних, стійких до хвороб сортів. Успіх селекційної роботи у створенні стійких сортів визначається використанням перевірених в умовах регіону джерел і донорів стійкості ячменю до основних хвороб. Сорт з комплексною стійкістю може дати приріст урожаю в 1-1,5 т/га умовних зернових одиниць без застосування засобів захисту [2].

Виходячи з стану розвитку біотехнологічних методів поліпшення геному ячменю, ще немає підстав стверджувати, що вони в найближчому майбутньому будуть відігравати головну роль в створенні генетичного різноманіття і стануть „постачальником” цінних генів для селекції. Джерелом цих генів ще тривалий час буде генетичне різноманіття *Hordeum vulgare*, оскільки воно далеко не повністю використане в практичній селекції [3].

Матеріали та методи

Фенологічні спостереження та оцінки сортів ячменю ярого проводили згідно міжнародного класифікатора роду *Hordeum* і методики польового дослідження [4-5], та методичних вказівок по вивченню світової колекції ячменю і вівса [6]. Обліки ураження збудниками хвороб проводили згідно методики селекції і оцінки пшениці і ячменю до хвороб [7]. Інтенсивність ураження збудником борошнистої роси в польових умовах оцінювали на провокаційному фоні, в лабораторії – при штучному зараженні за методикою Кривченка В.І. [8].

Для визначення дії кліматичних факторів застосовували гідротермічний коефіцієнт – ГТК [9]. За результатами урожайності сортів вираховували статистичні показники згідно методичних рекомендацій по розрахунку параметрів екологічної пластичності [10].

Результати досліджень

Миронівський інститут пшениці імені В.М. Ремесла (МІП) є одним із співвиконавців у формуванні генетичного банку ячменю в Україні. В колекції ячменю ярого нараховується 1170 сортозразків різного еколого-географічного походження, які представлені 18 різновидностями із 45 країн світу. Найбільша кількість сортозразків із Росії, України, Німеччини, Чехії, Данії, Швеції та ін.

Вивчали сортозразки колекційного розсадника протягом 2003-2007 рр. Враховуючи те, що фактор вологості повітря відігравав вирішальну роль у розвитку хвороб, визначали гідротермічний коефіцієнт за травень-липень. Цей показник мав таке значення: в епіфітотійний 2006 р. ГТК становив 1,7 – рівень зволоження був надлишковим, 2004, 2005 рр. – 1,2–1,3 – оптимальне зволоження, недостатнє зволоження було у 2003, 2007 рр. ГТК – 0,9.

Найбільш поширеним і шкодочинним на ячмені ярому, в умовах МПП, є збудник борошнистої роси. Розвиток збудників смугастої, темно-бурої плямистостей і карликової іржі спостерігається в роки оптимального або надлишкового зволоження. В результаті виділено сорти, які характеризувалися помірною стійкістю та стійкістю щодо збудників борошнистої роси, карликової іржі, смугастої і темно-бурої плямистостей. Селекційну цінність та стійкість до хвороб мають сортозразки 15-А-153, Лінія 1027, Плутон, Європрестиж (Україна), Задонський, Якуб (Росія), Eunova, Secuwa (Австрія), Madeira, Danuta, Ria, Adonis, Barke, Serva (Німеччина), Dominique (Нідерланди), Delta (Франція) і Nansy (Швеція), які протягом 3-х років формували урожайність на рівні 106-182% до стандарту Одеський 100. Слід відмітити зразки Європрестиж і Якуб, які характеризувалися в середньому за 3 роки стійкістю та високою стійкістю щодо збудників 4-х хвороб і формували урожайність 126-155% до стандарту були стійкими до вилягання.

Створення стійких сортів значною мірою пов'язано з особливостями поширення рас збудників хвороб. Для досягнення ефекту слід ретельно вивчати фізіологічні форми та стійкість сортів ячменю. У співробітництві селекціонерів МПП з імунологами лабораторії імунітету сільськогосподарських рослин до збудників хвороб Інституту захисту рослин вивчено стійкість колекційних зразків, проведено аналіз вірулентності популяції збудника борошнистої роси ячменю ярого та визначено ефективність відомих генів стійкості у правобережному Лісостепу України. Зразки, які характеризувалися стійкістю та високою стійкістю до збудника борошнистої роси протягом 3-х років на провокаційному фоні, перевірено в лабораторних умовах на стійкість при штучному зараженні. Проростки рослин ячменю уражували найбільш вірулентними расами В – 100, 101, А – 82, С – 9, 44, 63, 76, 85, 91, 95. В результаті виділено сортозразки ячменю Європрестиж, Суздалець, Eunova, Dominique, Adonis, Barke, Madeira, Landora, Ria, які виявили високу стійкість до усіх рас. Сорти Nansy, Secuwa, Meton уражувалися в незначній мірі.

В колекційному розсаднику МПП виділено 9 донорів ячменю ярого з генами Mlo: Sara (Швеція), Eunova (Австрія), Adonis, Alexis, Aspen, Barke, Danuta, Madeira, Salome (Німеччина). Всі ці зразки характеризувалися стійкістю (7-8 балів) протягом 3-х років на провокаційному фоні. У сортів Європрестиж (Україна), Nansy (Швеція), Secuwa, Eunova (Австрія), Meton (Словаччина), Dominique (Нідерланди), Adonis, Barke, Madeira, Landora, Ria (Німеччина) підтверджено стійкість в лабораторних умовах при штучному зараженні.

Використання генетичного різноманіття світової колекції ячменю ярого є невід'ємною складовою створення сортів у лабораторії селекції ячменю МПП. Сім сортів занесених до Реєстру сортів рослин придатних до поширення в Україні створено методом внутрішньовидової міжсорткової гібридизації. Серед них методом складних схрещувань створено сорти: *Миронівський 86* – F₃[Славутич х (МК-42 х Ельгіна)] х Рупее, *Персей* – (Одеський 115 х Magnif 104) х Сара, *Сонцедар* – (Vanja х Pavel) х Roland; простих парних схрещувань: *Миронівський 92* – (11/21/77 х Миронівський 66), *Цезар* – (Серпанок х Georgie), *Аскольд* та *Соборний* – (Hockey х Романтик), *Авгій* – (Severa х Тропhee).

При створенні нових сортів поєднували метод гібридизації та експериментального мутагенезу. Ним створено сорт *Юкатан* (69703/71 х Істринський 2) + НЕС 005 (занесений до Реєстру), та сорти, що знаходяться на державному

сортовипробуванні *Хадар* – (Sara x Atem), *Псьол* – (Asimut x Каштан), *Лучезарний* – (Миронівський 92 x Цезар), *Триполь* – (Каштан x Мересі).

Аналізуючи родоводи сортів Миронівської селекції слід зазначити їх доволі широку географію за батьківськими формами. Так хоча переважну більшість сортів створено на основі еколого-географічного принципу підбору пар для схрещування, що включають сорти лісостепоного та степового екотипів, створено ряд сортів шляхом гібридизації лише сортів західноєвропейської селекції. При створенні сорту *Сонцедар* використали три шведських сорти, *Авгій* – сорти німецької та французької селекції, *Хадар* – шведської та нідерландської.

При вивченні історії створення сортів пивоварного ячменю, як вітчизняних так і західноєвропейських, звертає увагу на себе той факт, що переважна більшість сортів з високими пивоварними властивостями має в своєму родоводі сорт *Hanna*. Це пов'язано з тим, що цей сорт володів широкою екологічною адаптацією, відносно високою врожайністю і відмінними пивоварними властивостями і як наслідок 2/3 сортів на європейському континенті створено за участю цього сорту [11]. Два сорти МП *Псьол* і *Триполь* створено шляхом використання сорту *Каштан* виведеного на Вінницькій дослідній станції. Батьківськими формами якого є сорти *Berenice* та *Вінницький 7*. На особливу увагу заслуговує сорт *Вінницький 7*, який створено гібридизацією сортів *Herta* x *Ільїнецький 43*. Останній у 1963 році при вивченні в міжнародному випробуванні, що проводилась в Чехословаччині, зайняв друге місце за пивоварною якістю зерна після сорту *Вальтицкий* [12] і є результатом схрещування сортів *Hanna Loosdorfer* і *Heines Hanna*, які виведені добром з сорту *Hanna* [11]. Сорт *Вінницький 7* увійшов до родоводу сорту *Цезар* через батьківські форми – *Серпанок* (*Паула* к. 19567 x *Вінницький 7*), а через сорт *Цезар* до сорту *Лучезарний*. До сортів *Аскольд* і *Соборний* *Hanna* увійшла через *Романтик* (*Первенец* x *Trumpf*) x *Sandes*. У створенні сорту *Trumpf* брали участь сорти *Union* та *Alsa*, які також несуть гени *Hanna*. До сорту *Миронівський 86* *Hanna* увійшла через сорт *Elgina*, однією з батьківських форм якої також є сорт *Alsa* (*Hanna* x *St. 7813 – Kneifgerste*) [3].

До родоводу фуражного сорту селекції МП – *Персей*, через батьківську форму *Одеський 115*, увійшов інший широковідомий сорт, що відіграв важливе значення в селекції кормових сортів – *Spartan* [11].

Сорти *Персей* і *Хадар* створено за участю сорту *Sara*, що є носієм рецесивного гену *mlo*, який є ефективним до збудника борошнистої роси в Лісостепу України.

Характеризуючи показники продуктивності новостворених сортів ячменю ярого селекції МП, за період 2005-2007 рр., слід відмітити, що найвищою вона була в 2005 році, що характеризувався наближеними до оптимальних умовами зволоження і температурою. Найнижчою – в 2007 році, що був екстремально несприятливим для вирощування ярих культур за гідротермічним режимом. В результаті вивчення встановлено, що максимальною продуктивністю в екологічному сортовипробуванні володів сорт *Сонцедар*, який мав найвищу середню продуктивність за три роки. За показником гомеостатичності, селекційної цінності та показником рівня і стабільності урожайності сорту (*Пусс*) кращими були сорти *Лучезарний* і *Триполь*, вони характеризувалися вищою урожайністю серед інших сортів у 2007 році (табл. 1).

Таблиця 1

Характеристика нових сортів ячменю ярого за продуктивністю, Миронівський інститут пшениці імені В.М. Ремесла, 2005-2007 рр.

Сорт	Середнє, ц/га	Мінімум, ц/га	Максимум, ц/га	Розмах варіювання, ц/га	Гомеостатичність	Селекційна цінність	Коефіцієнт варіації, %	Пусс, %
Зоряний St	41,8	27,3	52,2	24,9	134,8	21,9	31,0	100
Галактик St	38,7	25,4	46,5	18,7	129,7	22,3	29,9	88,9
Сонцедар	50,4	30,7	65,1	34,4	143,2	23,8	33,2	121,2

Триполь	47,8	33,6	59,6	26,0	173,7	26,9	27,5	133,6
Юкатан	43,5	27,8	57,5	29,7	132,6	22,1	34,5	107,9
Лучезарний	46,6	33,6	56,3	22,7	185,3	27,8	25,1	153,5
Хадар	44,9	29,2	57,3	22,6	140,7	25,3	31,9	112,1
Авгій	45,1	28,3	55,4	27,1	138,4	23,0	32,6	110,7
Псьол	46,5	29,6	56,2	26,6	147,4	24,5	31,6	121,4

Висновки.

1. В результаті вивчення колекції виділено сімнадцять сортозразків ячменю ярого за стійкістю до основних грибкових захворювань, та з комплексом господарсько-цінних ознак у правобережному Лісостепу України. З них слід відмітити зразки Європрестиж і Якуб, які крім стійкості до збудників 4-х хвороб формували урожайність 126-155% до стандарту та були стійкими до вилягання.

2. Виділено зразки, які характеризувалися високою стійкістю до збудника борошнистої роси протягом 3-х років на провокаційному фоні та в лабораторних умовах при штучному зараженні: Європрестиж, Суздаlecь, Eunova, Dominique, Adonis, Barke, Madeira, Landora, Ria.

3. На основі використання генетичних ресурсів ячменю ярого створено нові сорти, які крім високої продуктивності характеризуються підвищеною стійкістю до несприятливих умов навколишнього середовища. Сорти Сонцедар, Юкатан та Авгій занесено до Реєстру сортів рослин придатних до поширення в Україні. Хадар, Псьол, Триполь і Лучезарний знаходяться на державному сортовипробуванні.

Література

1. *Лінчевський А.А.* Теоретичні основи та селекція ячменю. В кн. Генетика і селекція в Україні на межі тисячоліть: У 4 т./ Редкол.: В.В.Моргун (голов. ред.) та ін. – К.: Логос, 2001. – Т. 2. С. – 528-551.
2. *Трибель С.О.* Стійкі сорти. Зменшення енергомосткості і втрат урожаїв від шкідливих організмів за допомогою селекції // Насінництво. – К., 2006. – № 4 – С. 18-20.
3. *Трофимовская А.Я.* Ячень. – Л.: Колос, 1972. – 296 с.
4. Международный классификатор СЭВ рода *Hordeum* L. – Ленинград, 1983. – 56 с.
5. *Доспехов Б.А.* Методика полевого опыта. М.: Колос, 1985. – 315 с.
6. *Методические указания по изучению мировой коллекции ячменя и овса.* – М.: Колос, 1981. – 14 с.
7. Методика селекции и оценка пшеницы и ячменя к болезням в странах-членах СЭВ. Л. Бабаянц, А. Мештерхази, Ф. Вехтер и др. – Прага, 1988. – 321 с.
8. *Кривченко В.И.* Изучение устойчивости злаковых культур к мучнистой росе // Ленинград, 1980. – 80 с.
9. Методики випробування і застосування пестицидів // С.О. Трибель, Д.Д. Сігарьова, М.П. Секун, О.О. Іваненко та ін. За ред. проф. С.О.Трибеля. – К.: Світ, 2001. – 448 с.
10. Параметры экологической пластичности сельскохозяйственных растений, их расчет и анализ. Методические рекомендации // В.А. Зыкин, В.В. Мешков, В.А. Сапега. – Новосибирск, 1984. – 25 с.
11. *Манзюк В.Т., Рябчун В.К., Манзюк Ю.О.* Історія використання генетичних ресурсів ячменю в Інституті рослинництва ім. В.Я.Юр'єва УААН // Генетичні ресурси рослин. – Харків, 2006. – № 3. – 87-93.
12. *Аврамчук Н.Г.* Селекція ярого ячменю на Вінницькій обласній державній сільськогосподарській дослідній станції. В кн. Генетика і селекція в Україні на межі тисячоліть: У 4 т. / Редкол.: В.В.Моргун (голов. ред.) та ін. – К.: Логос, 2001. – Т. 2. – С. – 528-551.

Резюме

Виділено з колекції ячменю ярого 17 сортів стійких до основних грибкових захворювань та з комплексом господарсько-цінних ознак в правобережному Лісостепу

України. Створено нові сорти, які крім високої продуктивності характеризуються підвищеною стійкістю до несприятливих умов навколишнього середовища: Сонцедар, Юкатан, Авгій, Хадар, Псьол, Триполь і Лучезарний.

Из коллекции ячменя ярового выделено 17 сортов устойчивых к главным грибковым заболеваниям и комплексом хозяйственно-ценных признаков в правобережной Лесостепи Украины. Создано новые сорта, которым кроме высокой продуктивности характеризуются повышенной устойчивостью к неблагоприятным условиям окружающей среды: Сонцедар, Юкатан, Авгий, Хадар, Псел, Триполь и Лучезарный.

17 spring barley cultivars being resistant against main fungal diseases and having complex of agronomic traits under environments of right-bank Forest-steppe of Ukraine were distinguished from collection. Novel cultivars characterized with increased resistance to unfavorable environments besides high productivity: Sontsedar, Yucatan, Avhy, Khadar, Psyol, Trypol' and Luchezarny have been developed.

САГАЙДАК С.І.

*Національний аграрний університет,
Україна, м. Київ, вул Генерала Родимцева, 19*

ОСОБЛИВОСТІ ЖИТТЄЗДАТНОСТІ СОСНИ ЗВИЧАЙНОЇ У ЕКОЛОГО-ГЕОГРАФІЧНИХ КУЛЬТУРАХ КИЇВСЬКОГО ПОЛІССЯ

Селекційна оцінка сосни звичайної (*Pinus silvestris* L.) як головної лісоутворюючої породи, дослідження особливостей її філогенезу та онтогенезу є дуже актуальними на теренах сучасної України. Ці питання вивчаються класичними генетико-селекційними методами, які базуються на прямій оцінці морфо-анатомічних, фізіологічних та біохімічних показників [2]. Відомо, що господарчо-цінні характеристики виду повністю залежать від повноцінності генеративних органів. Процеси розвитку та накопичення поживних речовин генеративними органами сосни звичайної (*Pinus silvestris* L.) залежать від умов місцезростання, що зумовлює інтерес до вивчення особливостей формування і розвитку пилку сосни звичайної (*Pinus silvestris* L.) у еколого-географічних культурах.

Матеріали та методи

Особливості пилку сосни звичайної (*Pinus silvestris* L.) різного географічного походження досліджувались з різних аспектів.

Розглядалися репродуктивні та біохімічні властивості [3; 4], морфометричні і морфологічні показники [5]. Наші дослідження були присвячені вивченню повноцінності пилку сосни звичайної (*Pinus Silvestris* L.) у еколого-географічних культурах за показниками фертильності і життєздатності.

Збір зразків пилку проводився у еколого-географічних культурах сосни звичайної (*Pinus Silvestris* L.) у Дзвінківському лісництві Боярської ЛДС Національного аграрного університету в умовах свіжого субору [1]. Цвітіння у еколого-географічних культурах сосни звичайної в 2006 році розпочалось 21 травня, закінчилось 27 травня, збір пилку проводили безпосередньо перед висипанням пилку з чоловічих стробілів.

Досліджувався пилок всіх представлених, у еколого-географічних культурах, походжень: Волинське (Західне Полісся); Житомирське (Центральне Полісся); Чернігівське (Східне Полісся); Львівське (Західний Лісостеп); Черкаське (Правобережний лісостеп); Київське (Східне Полісся); Сумське (Лівобережний

Лісостеп); Луганське (Степ); Білоруське (Гомель, Північне Полісся); Росія (Вороніж, Центральний Лісостеп Росії);

На пророщеному пилку визначали його життєздатність та фертильність.

Зразки пилку пророщували у двох повторностях, в травні та серпні на штучному середовищі (1% розчин агар-агару + 10% розчин сахарози) при температурі +25 °С на спеціально підготовлених для цього предметних скельцях з целофаном.

Життєздатність пилку визначали за відсотком пророслих на штучному середовищі пилкових зерен в динаміці – через 48, 52 та 72 години після висіву. Для визначення середнього показника життєздатності було проглянуто по 1000 пилкових зерен кожного походження. Фертильність визначали за довжиною пилкових трубок, через 72 години після висіву, вимірювали по 100 пилкових трубок у кожному походженні.

Результати та обговорення

При порівнянні енергії проростання у першій та другій повторностях при першому (травневому) пророщуванні суттєвої різниці між повторностями не виявили (таб. 1). Найбільша різниця у виявилась у пилкових зерен львівського походження 4%.

Таблиця 1

Енергія проростання пилку *Pinus silvestris* L у еколого-географічних культурах (травень 2006 р.), %

Походження	Повторність I			Повторність II		
	48 год	52 год	72 год	48 год	52 год	72 год
1 волинське	90,2	92,2	92,9	88,1	89,6	90,2
2 житомирське	88,1	90,4	91,1	88,0	88,5	88,7
3 чернігівське	89,6	90,3	90,9	87,0	88,8	89,3
4 львівське	87,6	89,5	90,6	82,3	82,6	86,9
5 черкаське	92,7	92,9	93,4	89,7	90,7	91,6
6 київське	93,1	93,9	95,1	92,1	92,8	93,6
7 сумське	89,5	91,6	93,4	89,2	90,2	91,6
8 луганське	90,7	93,4	94,6	87,2	88,4	88,6
9 гомельське	92,8	94,2	95,9	89,4	92,2	92,1
10 воронезьке	89,9	90,8	90,8	88,6	90,4	90,4

Всі походження мають високий відсоток життєздатного пилку від 86,9 % до 95,1%, найбільша енергія проростання пилку, і в першій, і в другій повторності, виявилась у місцевого - київського походження (95,1%; 93,6%), а найнижча у львівського (90,6%;86,9%).

З метою визначення яке походження максимально зберігає життєздатність, у серпні 2006 року провели друге пророщування (таб. 2).

Різниця між енергією проростання пилку сони звичайної в межах окремого походження коливалась від 1% до 4%. Найбільша енергія проростання виявилась у пилкових зерен черкаського (94,1%; 92,4%) та місцевого київського походження (93,5%; 92,8%), а найнижча у львівського (85,3%; 83,6;). Енергія проростання пилку при повторному пророщуванні нижча, в межах одного походження цей показник коливається від 1% до 4%.в цілому можна відзначити що представлені в еколого-географічних культурах кліматипи добре зберігають свою життєздатність протягом двох місяців.

Таблиця 2

Енергія проростання пилку *Pinus silvestris* L у еколого-географічних культурах (серпень 2006 р.), %

Походження	Повторність I			Повторність II		
	48	52	72	48	52	72
1 волинське	89,7	89,9	89,9	85,1	85,9	86,4
2 житомирське	90,2	90,4	90,4	89,2	89,6	89,6
3 чернігівське	89,1	89,3	89,5	86,4	87,2	87,3
4 львівське	84,9	85,2	85,3	82,9	83,3	83,6
5 черкаське	93,4	92,6	94,1	90,2	91,1	92,4
6 київське	93,2	93,4	93,5	91,3	92,8	92,8
7 сумське	89,1	88,9	89,6	87,7	87,6	88,3
8 луганське	89,3	89,8	89,6	86,2	86,6	87,2
9 гомельське	93,1	93,2	92,9	91,1	92,0	92,4
10 воронезьке	87,7	89,1	88,5	82,6	84,3	85,3

Фертильність – здатність зрілого організму давати життєздатних нащадків, у сосни звичайної, також обумовлена впливом навколишнього середовища. Здатність організмів пристосовуватись саме за цим показником має вирішальне значення для збереження виду (таблиця 3).

Таблиця 3

Фертильність пилку сосни звичайної різного географічного походження (травень 2006)

Походження	Середня довжина пилкових трубок, мкм.	±	м, мкм	V, %
1. волинське	73,13	±	1,45	19,84
2. житомирське	87,34	±	1,24	15,51
3. чернігівське	81,76	±	1,21	14,91
4. львівське	74,96	±	1,30	17,41
5. черкаське	83,76	±	1,37	16,37
6. київське	91,53	±	1,34	15,26
7. сумське	84,15	±	1,43	17,01
8. луганське	72,98	±	1,80	24,75
9. гомельське	86,86	±	1,41	16,33
10. воронезьке	68,73	±	1,81	26,45

Найбільша довжина пилкових трубок виявилась у дерев місцевого київського походження - 91,53мкм, а найменша у воронезького 68,73мкм. Коефіцієнт варіації високий від 15,26% у Київського походження до 26,45% у воронезького.

Виконавши статистичний аналіз виявили пряму кореляційну залежність між життєздатністю та фертильністю (коефіцієнт кореляції у першій повторності - 0,86, у другій повторності – 0,65).

Висновки

Життєздатність пилку у еколого-географічних культурах висока від 85% до 95%, найбільша енергія проростання виявилась у місцевого Київського та Черкаського походжень, а найнижча у Львівського. Найбільша довжина пилкових трубок виявилась у місцевого Київського походження, а найменша у Вороніжського. Між життєздатністю та фертильністю існує пряма кореляційна залежність. Отримані результати для даних еколого-географічних культур не є остаточними, оскільки дослідження даних питань плануються на наступні роки.

Література

1. Вакулук П.Г., Самоплавський В.І., Лісовідновлення і лісорозведення в рівнинних районах України. – Фастів; Поліфаст, 1998. – 508с.

2. Гут Р.Т., Радченко М.В., Криницький Г.Т. Молекулярно-генетичні маркери та їх використання у лісовому господарстві. // Лісівництво і агролісомеліорація – Харків – 2003, вип. 104, стр. – 58-65.
3. Кириченко О.І., Дешико Л.О. Вивчення сосни звичайної у географічних культурах// Лісівництво і агролісомеліорація – Харків – 1999, вип. 96, стр. – 47-51
4. Манжос А.М. Жизнеспособность пыльцы сосны при разных способах хранения//Труды Института леса АН СССР. – Т. XXXVII. – С.171-174.
5. Третьякова И.Н., Носкова Н.Е. Пыльца сосны обыкновенной в условиях экологического стресса// Экология. - №1 – Москва. – 2004. – С.26-33

Резюме

Розглянуті питання повноцінності пилку сосни звичайної (*Pinus Silvestris* L.) у еколого-географічних культурах за показниками фертильності і життєздатності. Найбільша енергія проростання виявилась у місцевого Київського та Черкаського походжень, а найнижча у Львівського. Між життєздатністю та фертильністю знайшли пряму кореляційну залежність.

Рассмотрены вопросы полноценности пыльцы сосны обыкновенной (*Pinus Silvestris* L.) в эколого-географических культурах по показателям фертильности и жизнеспособности. Наибольшая энергия прорастания оказалась у Киевского и Черкасского происхождений, а наиболее низкая у Львовского. Между жизнеспособностью и фертильностью нашли прямую корреляционную зависимость.

The considered questions of full value of pollen of pine-tree of ordinary (*Pinus Silvestris* L.) in ecology-geographical cultures after the indexes of fertile and viability. Most energy of germination turned out at local in the Kiev and Chercascki rigins, and below only at Lvov. Between viability and fertile founded direct correlation dependence.

САМЧУК В.А.¹, СТЕКЛЕНЬОВ Є.П.², СКРИПНИК Н.М.³

¹Луганський національний педагогічний університет імені Тараса Шевченка, Україна, 91011, Луганськ, вул. Оборонна, 2, e-mail: anatomic@mail.dsip.net

²Біосферний заповідник „Асканія-Нова”

Україна, 75230, смт. Асканія-Нова, Херсонська обл.

³Луганський національний педагогічний університет імені Тараса Шевченка, Україна, 91011, Луганськ, вул. Оборонна, 2, e-mail: anatomic@mail.dsip.net

ОСОБЛИВОСТІ БУДОВИ ДВНАДЦЯТИПАЛОЇ КИШКИ У БІЗОНІВ І БАНТЕНГІВ ТА ЇХ ГІБРИДІВ ІЗ СВІЙСЬКИМИ БИКАМИ

Тварини із спеціалізованим харчуванням звичайно різняться за своїми властивостями перетравлювання їжі. Основні типи харчування склались ще до появи сучасних тварин. Харчові потреби тварин суттєво залежать від того, які поживні речовини організм може синтезувати, і які повинні надходити зовні. Багато тварин, зокрема жуйні, отримують найважливіші поживні речовини від симбіотичних бактерій.

Унікальна травна система жуйних зумовлює їх здатність засвоювати багату целюлозою їжу і підтримувати високий рівень своєї життєдіяльності. Властивий жуйним шлунково-кишковий тип травлення у диких жуйних більш виразний порівняно із домашніми. Справжні жуйні тварини мають багатокамерний шлунок, у рубці і сітці якого мікроорганізми перетравлюють целюлозу та інші полісахариди, а продукти, які утворюються, піддають бродінню з утворенням летючих жирних кислот. Ці кислоти всмоктуються безпосередньо через епітелій рубця. Мікроорганізми безпосередньо

надходять в сичуг де й починається процес їх перетравлення, який закінчується у кишечнику.

Складні перетворення генома міжвидових гібридів, їх наслідки і вплив на організм гібридизанта потребують комплексного вивчення. ДНК – фінгерпринтинг представників окремих видів, міжродових й міжвидових гібридів родів *Bos* і *Bison* виявив високий поліморфізм за кількістю і розміром гібридизаційних фрагментів [1], перехід з молока на рослинну їжу у жуйних супроводжується значною онтогенетичною перебудовою й перерозподілом процесів травлення, особливо в умовах акліматизації. Результати досліджень морфометричних показників передшлунків і сичуга бізонів, бантенгів, домашньої корови та їх гібридів різних поколінь й визначення співвідношення оболонок і шарів стінок їх рубця, сітки, книжки й сичуга вказують на видові відмінності та вплив поєднання геномів різних видів биків на варіювання цих показників [3,4].

Метою роботи є дослідження особливостей будови дванадцятипалої кишки бізонячих і бантенгових гібридів та їх вихідних форм.

Матеріали і методи

Матеріалом для дослідження послужили зразки дванадцятипалої кишки, які були відібрані у 36 дорослих тварин: бізонів, диких бантенгів, червоної степової та сірої української порід, гібридів бантенга із червоною степовою та сірою українською породами й гібридів бізона із сірою українською породою. Матеріал відбирався відразу після забою тварин у межах перших 30-40 хвилин. Визначали абсолютну масу (г) і довжину (см) та індекси забезпечення маси тіла в проміле (‰) й відносного розвитку дванадцятипалої кишки в процентах (%) від загальної маси і довжини кишечнику. Відібрані для гістологічного дослідження шматочки стінки органу фіксували в 10%-му нейтральному формаліні, рідині Карнуа, обезводнювали та заливали в целоїдин і парафін. Зрізи товщиною 6-10 мкм фарбували гематоксилином Ерліха та еозином, пікрофунксином й за Домініче-Кедровським. Отримані мікропрепарати використовували для загальної гістологічної характеристики та визначення морфометричних показників [2]. У бантенгів, червоної степової породи та їх гібридів проведені гістохімічні реакції на лужну фосфатазу, глікопротеїни [2].

Результати та обговорення

Забезпеченість маси тіла масою дванадцятипалої кишки виявилась найменшою у бізонів (0,6‰) і бізонячих гібридів із сірою українською (0,5‰), особливо у порівнянні із бантенгом (0,8‰) та гібридами $F_b \frac{3}{4} + \frac{1}{4}$ домашня корова (0,7‰).

Відносна маса дванадцятипалої кишки бізона склала 4,5 % від загальної маси кишечнику, у бантенга – 5,1%, червоної степової – 3,8%, сірої української – 4,0%, гібридів $\frac{1}{2}$ бантенга + $\frac{1}{2}$ червоної степової – 4,4%, гібридів $F_b \frac{3}{4}$ червоної степової + $\frac{1}{4}$ бантенга – 4,0%, гібридів $F_b \frac{3}{4}$ бантенга + $\frac{1}{4}$ червоної степової – 4,3%, гібридів $\frac{1}{2}$ бантенга + $\frac{1}{2}$ сірої української – 4,7% і гібридів $\frac{1}{2}$ бізона + $\frac{1}{2}$ сірої української – 4,2%. Суттєвих відмінностей абсолютної і відносної довжини дванадцятипалої кишки у досліджених тварин не встановлено.

За результатами мікроскопії виявилось, що стінка дванадцятипалої кишки у бізона була найтоншою (1101,8 мкм) у порівнянні з бантенгом (1976,0 мкм), червоною степовою (1837,4 мкм) і сірою українською породою (2112,6 мкм), $P < 0,05$.

У бантенгових і бізонячих гібридів показники дещо відрізнялися залежно від кровності гібрида. Так у гібридів $F_1 \frac{1}{2}$ бантенга + $\frac{1}{2}$ червоної степової товщина стінки дванадцятипалої кишки склала – 1597,5 мкм, у $F_1 \frac{1}{2}$ бантенга + $\frac{1}{2}$ сірої української 1456,8 мкм, у $F_b \frac{3}{4}$ червоної степової + $\frac{1}{4}$ бантенга – 1636,8 мкм, у $F_b \frac{3}{4}$ бантенга + $\frac{1}{4}$ червоної степової – 1883,7 мкм, у гібридів $\frac{1}{2}$ бізона + $\frac{1}{2}$ сірої української – 1280,4 мкм.

Ворсинок на 1 мм² слизової оболонки дванадцятипалої кишки було у бізона 12,2, бантенга 17,0, червоної степової – 16,7, сірої української – 10,8, гібридів $\frac{1}{2}$ бантенга + $\frac{1}{2}$ червоної степової – 16,4, гібридів $\frac{1}{2}$ бантенга + $\frac{1}{2}$ сірої української – 16,4,

гібридів $F_b \frac{3}{4}$ червоної степової + $\frac{1}{4}$ бантенга – 17,0, гібридів $F_b \frac{3}{4}$ бантенга + $\frac{1}{4}$ червоної степової – 13,0, гібридів $\frac{1}{2}$ бізона + $\frac{1}{2}$ сірої української – 12,6. За співвідношенням кількості ворсинок і крипт відмінності виявились незначними. У бізона цей показник склав 1:3,8, бантенга 1:3,9, червоної степової 1:3,2, сірої української 1:2,8, а серед досліджених гібридів він був найбільшим у $F_b \frac{3}{4}$ бантенга + $\frac{1}{4}$ червоної степової – 1:5,3.

Відносна товщина слизової оболонки в процентах (%) від товщини стінки дванадцятипалої кишки у бізонів, бантенгів та їх гібридів була більшою, а м'язової оболонки меншою, особливо у порівнянні із сірою українською породою.

Відносна товщина власної пластинки слизової оболонки дванадцятипалої кишки в процентах (%) від загальної товщини стінки у бізона (68,4%) значно переважала цей показник у бантенга (19,5%), червоної степової (31,1%) і сірої української порід (27,7%), $P < 0,05$. У гібридів $F_1 \frac{1}{2}$ бантенга + $\frac{1}{2}$ червоної степової цей показник становив 39,5%, у $F_1 \frac{1}{2}$ бантенга + $\frac{1}{2}$ сірої української 36,2 %, у $F_b \frac{3}{4}$ червоної степової + $\frac{1}{4}$ бантенга – 43,3 %, у $F_b \frac{3}{4}$ бантенга + $\frac{1}{4}$ червоної степової 37,9%, у $F_1 \frac{1}{2}$ бізона + $\frac{1}{2}$ сірої української – 48,6%.

Співвідношення дуодентальних залоз і сполучної тканини в основі слизової оболонки середини дванадцятипалої кишки склали, відповідно, у бізона 56,4 і 43,6%, бантенга – 61,6 і 38,4%, червоної степової – 24,4 і 78,6%, сірої української 32,8 і 67,2%, гібридів $F_1 \frac{1}{2}$ бантенга + $\frac{1}{2}$ червоної степової – 71,4 і 28,6%, гібридів $F_1 \frac{1}{2}$ бантенга + $\frac{1}{2}$ сірої української 59,8 і 40,2%, гібридів $F_b \frac{3}{4}$ червоної степової + $\frac{1}{4}$ бантенга 30,0 і 70,0%, гібридів $F_b \frac{3}{4}$ бантенга + $\frac{1}{4}$ червоної степової 66,7 і 33,3 %, гібридів $F_1 \frac{1}{2}$ бізона + $\frac{1}{2}$ сірої української 58,6 і 41,4 %.

Слід відзначити, що у проксимальній частині дванадцятипалої кишки у червоної степової породи дуодинальні залози і сполучна тканина склали, відповідно, 82,2 і 17,8%.

Ворсинки дванадцятипалої кишки бантенга, бізона і гібридів переважно невисокі, пальцеподібні. У домашніх тварин зустрічались й листоподібні ворсинки. Дуоденальні залози у всіх досліджених тварин трубчасто-альвеолярні. У бантенга і бізона їх кінцеві відділи дрібніші, а цитоплазма клітин більш базофільна у порівнянні із залозами інших досліджених тварин. У досліджених бантенгів і червоної степової активність лужної фосфатази виявлено на поверхні стовпчастих епітеліоцитів ворсинок й епітеліоцитів крипт, які розташовані біля основи ворсинок, а нейтральні мукополісахариди містились в епітеліоцитах дуоденальних залоз, келихоподібних екзокриноцитах крипт і ворсинок.

Висновки

Таким чином, дванадцятипала кишка у досліджених диких і домашніх биків та їх гібридів, які були отримані у міжвидових та міжпідродових схрещуваннях мала принципову схожість за своєю будовою, що не виключає значного варіювання її кількісних і якісних показників. Забезпеченість маси тіла дванадцятипалої кишки та її відносна маса, кількість ворсинок на 1 мм² слизової оболонки, кількість дуоденальних залоз у досліджених бантенгів переважали ці показники у домашніх тварин і бізонів, а відносна товщина власної пластинки слизової оболонки цього органу виявилась більшою у бізонів. У гібридів F_1 усіх варіантів схрещувань цей показник переважав його значення у домашніх вихідних форм і бантенга, що вказує на більшу активність процесів травлення в їхньому кишечнику.

Значне варіювання показників у досліджених групах тварин вказує на значну мінливість в межах видів і порід.

Література

1. Васильев В.А., Стекленив Е.П., Морозова Е.В., Семенова С.К. ДНК – фингерпринтинг представите лей отдельных видов, межродовых и межвидовых

- гібридов родів *Bos* і *Bison* підсеме́йства *Vovidae*// Генетика, 2002, том 38, №4. – С. 515-520.
2. Давлетова Л.В., Капралова Л.Т., Термелева А.Г. Морфофункціональне вивчення органів травлення у копитних: Методическі рекомендації. – М.: Наука, 1986. – 60 с.
 3. Самчук В.А., Стекленков Є.П. Особливості епітелію сичуга при гібридизації домашньої корови з бантенгом // Фактори експериментальної еволюції організмів: Зб.наук.пр. – К.: Логос, 2006. – С. – 293-297.
 4. Самчук В.А., Стекленков Є.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.

Резюме

Изучены особенности строения двенадцатиперстной кишки бизона, бантенга, домашней коровы и их гибридов. Полученные результаты указывают на изменчивость ее строения у диких и домашних быков и их гибридов.

Вивчені особливості будови дванадцятипалої кишки бізонів, бантенгів і домашньої корови та їх гібридів. Отримані результати вказують на мінливість її будови у диких і домашніх биків та їхніх гібридів.

The features of structure of duodenum of bison, banteng, domestic cow and their hybrids are studied. The got results specify on changeability of its structure at wild and domestic bulls and their hybrids.

СИДОРЧУК В.І.¹, СИНЬОГУБ С.В.¹, ПЕТРИЧЕНКО С.М.²

¹Білоцерківська дослідно-селекційна станція,

Україна, 09176, Київська обл., Білоцерківський р-н, п.в. Мала Вільшанка, 1

²Інститут цукрових буряків УААН,

Україна, 03141, м. Київ-141, вул. Клінічна, 25.

МЕТОДИКА КОНТРОЛЮ ОДНОРІДНОСТІ ТА СТАБІЛЬНОСТІ ВИСОКОПРОДУКТИВНИХ СЕЛЕКЦІЙНИХ ЛІНІЙ ЗА ОЗНАКОЮ ЗАБАРВЛЕННЯ НАСІННЯ В СЕЛЕКЦІЇ ГОРОШКУ ВИКИ ЯРОЇ

Особливістю селекційного процесу у самоzapильних культур на сучасному етапі є значне відтермінування у часі формоутворення гомогенних ліній внаслідок більш тривалого рекомбіногенезу.

Якщо відбір елітних рослин, що давали початок створення районуваних у семидесяті роки сортів вики ярої Білоцерківська 222 (національний стандарт), Білоцерківська 623, Білоцерківська 50 проводився в другому або третьому гібридному поколінні, то виведений у дев'яностих роках сорт Білоцерківська 7 (національний стандарт) відбір елітної рослини здійснено у восьмому поколінні.

До факторів, що впливають на тривалість рекомбіногенезу і термін відбору гомогенних форм, можна віднести складну генеалогію вихідних форм, яка включає п'ять і більше циклів схрещування. Іншим фактором може бути використання в процесі гібридизації географічно та генетично віддалених форм [1], а також застосування складних схрещувань.

В той же час дані фактори є важливою складовою сучасної селекції і завдання полягає в тому, щоб запропонувати способи стабілізації гібридної популяції, одержаної в наслідок застосування різних типів схрещування.

Існує еволюційний спосіб подолання гетерогенності в межах селекційної лінії, виділеної із гібридної популяції, коли більш продуктивні і адаптовані форми в процесі репродукування витісняють менш продуктивні. Цей спосіб ефективний при невисокій гетерогенності гібридної популяції. Однак процес стабілізації селекційної лінії може виявитися недостатньо продуктивним через вирівнювання коефіцієнтів розмноження різних генотипів, що утворюють селекційну лінію.

Запропонована методика передбачає в процесі вивчення селекційної лінії на етапі конкурсного сортовипробування дозволяє виявити гомозиготні високопродуктивні форми, розмножити їх і відкрити шлях до формування нового сорту.

Матеріали і методи

У дослідженні використано перспективні селекційні лінії, створені методом гібридизації, які виділилися за кормовою та насінневою продуктивністю у конкурсному сортовипробуванні.

Запропонована триступенева модель контролю однорідності і стабільності морфо-біологічних ознак високопродуктивних селекційних ліній вики ярої базується на використанні забарвлення насіння як маркерної ознаки для відбору гомогенних генотипів в цілому лінії або її складових. Для виду вики посівної *Vicia sativa* L характерний широкий спектр основного забарвлення насінневої оболонки і різного ступеня вираженості кольору орнаментации. Забарвлення насіння є основою для систематики виду, генетичних досліджень, практичної селекції [2]. Із забарвленням насіння може бути пов'язаний прояв окремих морфологічних і біологічних ознак [3]. Для визначення статистичних показників використано цифровий код забарвлення насіння [4].

Результати та обговорення

Робота з оцінки однорідності та стабільності високопродуктивних селекційних ліній у перший рік досліджень передбачає відбір в малому селекційному розмноженні типових (елітних) рослин та визначення характеру забарвлення насіння всіх відібраних рослин. У 2005-2007 рр. у вивчення включали по дві селекційні лінії кожного року відтворення. Відібрані рослини за забарвленням розділяли на основну, проміжну і гібридну групу відбору.

При виведенні трьох селекційних ліній застосовували методику використання агроценозу як фактору природного добору в гібридній популяції [5] з відбором елітної рослини в F_4 - F_6 . Решта ліній відібрані із застосуванням методу педігрі.

Оцінка селекційних ліній вики ярої на однорідність та стабільність забарвлення насіння у елітних рослин засвідчила, що частка сімей з основним забарвленням знаходиться на рівні 70-90% з часткою сімей з гібридним забарвленням від 3 до 8%. Слід зазначити що оцінку проводили у 10-14 поколіннях. Цілком очевидним є той факт, що селекційний матеріал, який надходить на вивчення у сортовипробування, недостатньо однорідний за морфобіологічними ознаками, що знаходить відображення у ступені однорідності забарвлення насіння.

Для отримання гомогенності селекційних ліній ефективним є повторні індивідуальні добори в F_4 - F_6 , особливо при застосуванні природного добору на тлі звичайних агроценозів.

Селекційна лінія 849/01, відібрана із гібридної популяції на тлі використання природного добору після попереднього вивчення у 2005,2006 рр. на однорідність та стабільність, передана на Державне сортовипробування під назвою Ліла. На 2008 р. сорт внесено до списку перспективних у зоні Полісся України.

В той же час селекційна лінія, відібрана з гібридних матеріалів, одержаних по взаємобміну від Тернопільської ДСС, попри позитивну оцінку продуктивності в умовах засухи 2007 р., у чотирнадцятому поколінні мала лише 69% сімей з однорідним забарвленням насіння, а коефіцієнт варіації за цифровим кодом становив 29 одиниць.

Це є наслідком захоплення складними схрещуваннями та залучення в гібридизацію географічно віддалених форм із колекції.

Слід вказати на недостатньо високу вірогідність оцінки однорідності забарвлення насіння по елітних рослинах за наслідками першого року вивчення. При випробуванні потомств на другий рік вивчення попри висів сімей із однорідним забарвленням, відсоток родин з основним типом забарвлення насіння знизився до 60-70, а коефіцієнт варіювання ознаки зріс до 30. Очевидно, суть - у розмірі виборки, яка в перший рік складається всього із 60 насінин, а на другий рік більше 2 тисяч.

У заключному третьому році досліджень ведеться розмноження найбільш типових і високопродуктивних родин та формується партія насіння для розсилки на Державне сортовипробування.

Таким чином, вимоги, що постають в селекції вики ярої щодо забезпечення однорідності та стабільності морфобіологічних ознак нових сортів при передачі їх на державне сортовипробування, можуть бути успішно виконані шляхом застосування методики контролю за однорідністю та стабільністю за ознакою забарвлення насіння.

Висновки

Використання в гібридизації вики ярої сортів із складною генеалогією та географічно і генетично віддалених колекційних зразків є основною причиною тривалого рекомбіногенезу в гібридній популяції, що значно ускладнює відбір гомогенних форм.

Зниженню гетерогенності гібридної популяції сприяють повторні добори в F_4 - F_6 , особливо в поєднанні із застосуванням природного добору на тлі звичайних агроценозів.

Запропонована триступенева модель здійснення контролю за однорідністю та стабільністю морфобіологічних ознак високопродуктивних селекційних ліній базується на використанні забарвлення насіння як маркерної ознаки для відбору гомогенних форм.

Література

1. *В.И. Сидорчук.* Использование образцов ярой вики коллекции ВИР в гибридизации и методы работы с исходным материалом. Научно-технический бюллетень ВИР, выпуск 190, Ленинград 1989 с.49-51.
2. *Е.И.Харечко-Савицкая.* Окраска семян в семействе Papilionaceae. Труды Білоцерківської селекційної станції том II Вип. Біла Церква 1927 с.238.
3. *Яшовский И.В. Гармаш Е.С.* Характеристика наследования окраски семян у гибридов вики посевной (*Vicia sativa* L), Генетика том XIУ №8 1978 Изд. «Наука» Москва с.1423-1431.
4. Широкий унифицированный классификатор СЭВ и международный классификатор СЭВ вида *Vicia sativa* L., с.40.
5. *Сидорчук В.И.* Использование факторов естественного отбора в работе с исходным материалом при селекции ярой вики. Сб. научных трудов. Направление и методы совершенствования селекции зерновых и зернобобовых культур. Киев, 1994 с. 19-24.

Резюме

Впродовж трьох років вивчено 6 високопродуктивних селекційних ліній вики ярої за ступенем однорідності і стабільності забарвлення насіння відібраних елітних рослин і їх нащадків. Незважаючи на те що, відбір елітних рослин проводився в 10-14 поколіннях, частка сімей з однорідним забарвленням насіння становила від 70-90%. Запропонована методика добору гомогенних за морфобіологічними ознаками форм в межах селекційної лінії з використанням в якості маркерної ознаки забарвлення насіння.

В течении трёх лет изучено 6 высокопродуктивных селекционных линий вики яровой по степени однородности и стабильности окраски семян отобранных элитных растений и их потомств. Хотя отбор элитных растений проводился в 10-14 поколениях доля семей с однородной окраской семян составляла от 70 до 90%. Предложена методика отбора гомогенных по морфобиологическим признакам форм в пределах селекционной линии, с использованием в качестве маркерного признака окраски семян.

During three years, six high-producing breeding lines of spring vetch were analyzed from the point of view of the level of uniformity and stability of seed color of selected elite plants and their progenies. Selection of elite plants was carried out in 10-14 generations and the portion of seeds with uniform seed color amounted to 70-90 %. There were suggested methods of selection of the forms homogeneous for morphological characters within a breeding line, with the use of seed color as a marker character.

СИЗЫХ О.А., МУРАТОВА Е.Н.

*Институт леса им. В.Н. Сукачева СО РАН, Россия,
Россия, 660036, Красноярск, Академгородок,, e-mail: olesia-s@narod.ru*

ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ЛИСТВЕННИЦЫ СИБИРСКОЙ (*LARIX SIBIRICA* LEDEB.) НА ЮГЕ СИБИРИ

Лиственница сибирская (*Larix sibirica* Ledeb.) является одним из лесообразующих видов, представленных на территории юга Сибири. Условия Ширинской степи крайне неблагоприятны для роста древесных растений, в первую очередь из-за недостатка влаги, интенсивных ветров, резких перепадов температуры. Немногие виды древесных растений способны произрастать здесь. Опыт степного лесоразведения показал, что одним из наиболее перспективных видов для условий сухой степи является лиственница сибирская.

Изучение генетических особенностей и кариологический анализ лиственницы сибирской в искусственных и естественных популяциях позволит изучить механизмы и генетические процессы, лежащие в основе успешного приспособления и выживания лиственницы в неблагоприятных условиях обитания.

Материалы и методы

В качестве материала для исследований использовались семена лиственницы сибирской, собранные в природных популяциях и искусственных насаждениях лиственницы сибирской в Хакасии. Семена очищали от крылаток, проращивали в чашках Петри. Кариологический анализ проводился на меристематических тканях кончиков корешков проросших семян. Обработка материала, окрашивание, приготовление препаратов производились по общепринятой для хвойных методике (Правдин, 1972). После предварительной обработки 1%-ным раствором колхицина в течение 4-6 часов проростки фиксировали спиртово-уксусной смесью (3:1), окрашивали ацетогематоксилином и готовили давленные препараты стандартным способом. Ядрышки окрашивали 50%-м раствором азотнокислого серебра при температуре 60° С в течение 5-6 часов (Муратова, 1995). Цитологические препараты просматривали под микроскопом МБИ-6. Пластинки с хорошим разбросом хромосом фотографировали в иммерсионной системе, определяли число хромосом. Хромосомы измеряли на микрофотографиях: определяли абсолютную (L^a , мкм) и относительную (L^r , %) длину хромосомы, центромерный индекс (I^c , %), как отношение короткого плеча к длине хромосомы и суммарную длину набора (ΣL^a , мкм). У хромосом с вторичными перетяжками вычисляли локализацию перетяжки – отношение расстояния от

перетяжки до центромеры к длине плеча (sc, %). Классификацию хромосом по центромерному индексу производили в соответствии с рекомендациями В.Г. Грифа и Н.Д. Агаповой (1986). Анализ хромосомных перестроек проводился в 97 метафазных пластинках, подсчет числа ядрышек - в 700 интерфазных ядрах. Для определения спектра и частоты патологий митоза изучено 1633 клеток на стадии метафазы и ана-телофазы. Уровень изменчивости признаков определяли по шкале С.А. Мамаева (1972). Статистическая обработка данных проводилась по общепринятым методикам (Лакин, 1980).

Результаты и обсуждение

Проведенный кариологический анализ показал, что в диплоидном наборе лиственницы сибирской на изучаемой территории содержится 24 хромосомы ($2n=24$), что согласуется с ранее полученными результатами исследований популяций вида (Круклис, 1972; Бударлагин, 1980; Буторина, 1987; Муратова, 1991а, 1995). В некоторых проростках была выявлена миксоплоидия: отдельные клетки имели удвоенный набор хромосом $2n=48$, также отмечены единичные анеуплоидные клетки с $2n=23$ и $2n=25$. Появление миксоплоидов часто отмечается в популяциях лиственницы сибирской (Муратова, 1991а, Седельникова и др., 2005, 2007), а также других видов лиственницы (Буторина, 1987, Муратова, 1991б, Фарушкина, 1998). Считается, что миксоплоидия может наблюдаться при изменении и особенно резком ухудшении условий произрастания и, возможно, таким образом, выражается адаптация растений к неблагоприятным факторам среды (Кунах, 1980). Частота встречаемости клеток с измененным числом хромосом по обеим популяциям не превышает 1,1 %.

При изучении образцов из природной популяции была обнаружена В-хромосома метацентрического типа. В-хромосомы хорошо отличаются от хромосом основного кариотипа меньшей величиной. Они довольно часто встречаются в кариотипе некоторых видов рода *Picea*, а среди видов рода *Larix* отмечались в единичных случаях у *L. gmelinii* и *L. sukaczewii*, *L. sibirica* (Муратова, 1991б, Муратова, 1994, Фарушкина, 1997, Муратова, 2000, Седельникова, 2007). Предполагается, что они оказывают влияние на адаптацию и жизнеспособность организмов к неблагоприятным условиям среды (Круклис, 1971; Муратова, 2000; Владимирова, Муратова, 2006; Буторина и др., 1997, 2001)

Суммарная длина хромосом (ΣL^a) лиственницы сибирской в искусственном насаждении варьирует от 172,4 до 335,11 мкм, среднее значение $\Sigma L^a=253,68\pm 6,79$ мкм ($Cv=10,3\%$). В природной популяции ΣL^a от 266,65 до 380,03 мкм. Среднее значение $\Sigma L^a=310,52\pm 4,7$ мкм ($Cv=8,14\%$). Для вычисления средних морфометрических показателей хромосом, построения поликариограмм и идиограмм отбирали пластинки, попадающие в узкий интервал спирализации.

С помощью метода поликариограмм в обеих популяциях было выделено 3 группы хромосом. I-VI пары длинных метацентрических хромосом объединяются в группу со сходными параметрами, отдельно идентифицируется VII пара интерцентриков, и третья группа (VIII-XII) составляют короткие субметацентрические хромосомы.

Вторичная перетяжка является очень важным локусом хромосомы. У большинства растений в районе вторичной перетяжки находится ядрышковый организатор. Здесь локализируются гены рибосомной РНК. Морфологическим выражением активности этих генов является образование ядрышек в телофазе митоза. Установлено, что в кариотипе лиственницы в изученных популяциях на территории Ширинской степи две пары метацентриков (II и III по средним параметрам) имеют вторичные перетяжки в дистальных районах на длинном плече, IV пара метацентриков имеет перетяжку в медиальном районе на длинном плече. Также у VIII пары субметацентрических хромосом отмечена вторичная перетяжка в медиальном районе длинного плеча. Кроме того, в кариотипе лиственницы из природной популяции

отмечена перетяжка в дистальном положении на длинном плече у VII пары интерцентриков.

Количество ядрышек в интерфазных ядрах в данных популяциях колеблется от 1 до 6. Среднее число ядрышек в ядрах лиственницы составляет в искусственном насаждении – $3,4 \pm 0,04$, в природной популяции – $2,8 \pm 0,06$. По литературным данным известно, что максимальное число ядрышек у лиственницы сибирской может достигать 6-8 (Седельникова, 2005). Предполагается, что высокое число вторичных перетяжек и ядрышек может играть адаптивную роль для растений в неблагоприятных климатических условиях (Буторина, 1989, Седельникова, 2005).

В популяциях лиственницы сибирской были выявлены хромосомные перестройки, представленные фрагментами, кольцевыми хромосомами, ацентрическими кольцами, а также кольцевыми хромосомами, надетыми на обычные палочковидные.

Исследование митоза показало, что в целом деление клеток проходит нормально с правильным расхождением хромосом к полюсам. Отмечен такой спектр аномалий, как преждевременное расхождение хромосом и выброс хромосом в метафазе, трехполюсный митоз и мосты в анафазе. Частота встречаемости данных нарушений низкая: $1,34 \pm 0,68$ % на стадии метафазы и $1,33 \pm 0,59$ % на стадии анафазы.

Выводы

Таким образом, проведенные исследования выявили некоторые различия в кариотипах лиственницы в природных популяциях и искусственных насаждениях. Сравнимые популяции различаются по суммарной длине хромосомного набора, количеству нуклеолярных районов и особенностям их локализации, по числу ядрышек в интерфазных ядрах. В целом, результаты кариологических исследований свидетельствуют о высокой устойчивости лиственницы сибирской в условиях Ширинской сухой степи.

Работа выполнена при финансовой поддержке Интеграционного проекта СО РАН № 5.18 и РФФИ, грант № 08-04-00034.

Литература

1. *Бударгин В.А.* Кариотипы основных хвойных видов Казахстана // Тр. Казах. НИИ лес. Хоз и агролесомелиорации. Т2. Защитное лесоразведение и вопросы селекции в Северном Казахстане. Алма-Ата: Канар.- 1980.-С. 116-122.
2. *Буторина Л.К., Мурая Л.С., Сиволопов А.И.* Цитологические особенности гетерозисной лиственницы // Лесоведение. - 1987. - №4. - С. 82-86.
3. *Буторина А. К.* Факторы эволюции кариотипов древесных // Успехи соврем. биол. - 1989. - Т. 108. вып. 3 (6). - С. 342-357.
4. *Буторина А. К., Богданова Е. В.* Адаптивное значение и возможное происхождение В-хромосом у ели колючей // Цитология. – 2001. - Т. 43, № 8. – С. 809-814.
5. *Буторина А. К., Калаев В. Н., Богданова Е. В.* Цитогенетические механизмы адаптации видов растений-интродуцентов // Проблемы эволюционной цитогенетики, селекции и интродукции: Материалы науч. чтений, посвящ. 100-летию проф. В. П. Чехова. - Томск, 1997. - С. 19-21.
6. *Владимирова О.С., Муратова Е.Н.* Оценка встречаемости В-хромосом ели сибирской в условиях антропогенного стресса // Хвойные бореальной зоны. 2006. - Вып.3. - С. 114-120.
7. *Гриф В.Г., Агапова Н.Д.* К методике описания кариотипов растений // Бот. журн. - 1986. - Т. 71, № 4. - С. 550-553.
8. *Круклис М.В.* Добавочные хромосомы у голосеменных (на примере *Picea obovata*) // Докл. АН СССР., 1971.-Т. 196, № 5.- С. 1213-1216.
9. *Кунах В.А.* Геномная изменчивость соматических клеток растений и факторы, регулирующие этот процесс // Цитология, генетика. - 1980. - Т. 14, №1. - С. 73-81.

10. Лакин Г.Ф. Биометрия. Учебное пособие, 3-е издание.- М.: Высшая школа, 1980.- 293 с.
11. Муратова Е.Н. Методика окрашивания ядрышек для кариологического анализа хвойных // Бот. журн. 1995. - Т.80, № 2. - С. 82-86.
12. Муратова Е. Н. Кариосистематика семейства *Pinaceae* Lindl. Сибири и Дальнего Востока: Автореф. дис. ... докт. биол. наук. – Новосибирск.- 1995. - 32с.
13. Муратова Е.Н. Кариологическое исследование *Larix sibirica* (*Pinaceae*) в различных частях ареала // Бот. журн. 1991 а. - Т. 76, № 11. - С.1586-1595.
14. Муратова Е.Н. Добавочные хромосомы у лиственницы Гмелина *Larix gmelinii* (Rupr.) Rupr. // Докл. АН СССР. – 1991 б. - Т. 318, № 6. - С. 1511-1514.
15. Муратова Е. Н. В-хромосомы голосеменных // Успехи соврем. биол. – 2000. – Т. 120, № 5. – С. 452-465.
16. Мамаев С.А. Формы внутривидовой изменчивости древесных растений. - М.-Наука.- 1972. - 283 с.
17. Правдин Л.Ф., Бударрагин В.А., Круклис М.В. Методика кариологического изучения хвойных пород // Лесоведение. - 1972. - №2. - С. 67-75.
18. Седельникова Т.С., Пименов А.В. Кариологическое изучение болотной и суходольной популяции *Larix sibirica* (*Pinaceae*) из Западной Сибири. // Бот. журнал. 2005. - Т. 90, №4. - С. 582-593.
19. Седельникова Т.С. Хромосомные мутации у лиственницы сибирской на Таймыре // Известия РАН. Сер. биологич. – М.: Наука. – 2007.- №2.- С. 244 -247.
20. Фарукишина Г. Г. Хромосомный полиморфизм лиственницы Сукачева и ели сибирской на Урале // Проблемы эволюционной цитогенетики, селекции и интродукции.: Матер. науч. чтений, посвящ. 100-летию проф. Чехова В. П. – Томск. - 1997. – С. 58-59.
21. Фарукишина Г.Г. Морфологическая и кариотипическая изменчивость лиственницы Сукачева и ели сибирской на Урале: Автореф. дис.канд биол наук. Красноярск.- 1998.- 25 с.

Резюме

Изучен кариотип *Larix sibirica* Ledeb. в условиях Хакасии. Хромосомный набор содержит 24 хромосомы ($2n=24$). На основании поликариограммного анализа выделены 3 группы хромосом. Наряду с типичным набором хромосом отмечены хромосомные и геномные мутации, а также митотические нарушения. В природной популяции обнаружена добавочная хромосома.

Karyotype of *Larix sibirica* Ledeb. was studied in populations of Khakasia. Chromosome set included 24 chromosomes ($2n=24$). On the results of polykaryogram analysis 3 groups of chromosomes were revealed. Chromosome and genome mutations, mitotic irregularities were revealed in the both populations. B-chromosome was found in natural population.

СИТНИК І. Д.¹, ЯРЕШКО В. І.^{1,2}

¹Національний аграрний університет, Україна, 03041, Київ, вул. Героїв Оборони, 13

²Український інститут експертизи сортів рослин

ДИНАМІКА ВМІСТУ ГЛЮКОЗИНОЛАТІВ У ВЕГЕТАТИВНИХ ТА ГЕНЕРАТИВНИХ ОРГАНАХ РІПАКУ В ПРОЦЕСІ ОНТОГЕНЕЗУ

Всі види роду хрестоцвітих, до яких відноситься ріпак, містять глюкозинолати [1], які обмежують їх використання із-за токсичності їх гідролітичних продуктів [2]. Тому

всі селекційні програми направлені на створення сортів подвійного призначення [3,4,5] – безерукових та з низьким вмістом глюкозинолатів.

При створенні таких сортів необхідно вивчити динаміку утворення глюкозинолатів в процесі росту і розвитку ріпаку як у вегетативних так і генеративних органах і встановити зв'язок між вмістом глюкозинолатів в насінні і в зеленій масі.

Проведені попередні дослідження на сортах озимого ріпаку Жет-Неф, Бажаний, Ранок Поділля показали суттєву різницю в накопиченні глюкозинолатів в рослинах протягом онтогенезу у різних сортів. Для більш глибокого вивчення цього питання нами були проведені подальші дослідження озимого та ярого ріпаку.

Матеріали і методи

Об'єктом досліджень слугували 4 сорти ярого ріпаку Сріблястий, Антоціан, Жовтун, Марія та 4 сорти озимого ріпаку Аліот, Антарія, WW -843, Ксаверівський.

Зразки рослин (20 шт.) відбирали на різних етапах онтогенезу: від сходів до фази зеленого стручка. Із відібраних зразків формувався середній зразок із листків, коренів, стебел, бутонів (квітів), стручків. Зразки насіння починали відбирати через кожні 10 днів від початку цвітіння до повного дозрівання насіння з центральної китиці.

Глюкозинолати в рослинних тканинах визначали колOMETричним методом (ФЕК – 56 м), (модифікація Кононова), в насінні загальний вміст глюкозинолатів – методом визначення масової частки ізотіоцианатів і вінілтіооксазалидону в насінні ріпаку (ІТЦ – згідно ГОСТУ 11048-95, ВТО на СФ - 46).

Результати та обговорення

В результаті досліджень встановлено, що глюкозинолати містяться в усіх вегетативних органах рослин. В коренях вміст глюкозинолатів протягом вегетації був стабільно більший в 2-6 разів ніж в листках, а вміст їх в листках був нижчий ніж в стеблах і бутонах (табл.1). В процесі росту рослин вміст глюкозинолатів збільшувався і досягав максимуму в період стеблуння після чого йшло поступове зниження їх.

Різниця по вмісту глюкозинолатів в сім'ядолях між сортами озимого ріпаку «О» та «ОО» типу не спостерігалася, але до фази цвітіння вона суттєво змінювалася і вміст глюкозинолатів в листках, стеблах суцвіттях «О» типу порівняно з сортами «ОО» типу перевищував в 4-9 разів у листках, в стеблах в 2,0-2,8, окрім фази розетки в сорту Аліот, чого не можна сказати про вміст глюкозинолатів в коренях різних сортів озимого ріпаку «О» та «ОО» типу де суттєвої різниці не спостерігалася (табл. 1).

Відмінностей по вмісту глюкозинолатів в вегетативних органах різних сортів ярого ріпаку не спостерігається, оскільки всі вони відносяться до «ОО» або «ООО» типу.

Протягом вегетаційного спокою вміст глюкозинолатів в стеблах рослин озимого ріпаку був значно вищий ніж в листках (табл. 2). Різниці по вмісту глюкозинолатів в стеблах сортів «О» та «ОО» типу не спостерігалася.

Винятком був сорт озимого ріпаку Аліот. Так вміст глюкозинолатів у стеблі цього сорту восени і протягом вегетаційного спокою (взимку) становив 7,9-10,2% що на 2,41-2,8% (табл.2) більше ніж в інших сортах. Даний сорт в польових дослідженнях виявив найбільш високу морозостійкість серед більшості сортів.

Таблиця 1.

Вміст глюкозинолатів у вегетативних органах різних сортів ріпаку, %.

Сорт	Вегетативні органи рослини	Фази росту на розвитку ріпаку					
		Сходи (2 сім'ядолі)	Фаза розетки (осінь)	Фаза розетки відновлення вегетації	Стеблування	Бутонізація	Цвітіня
Ксаверівський	Листки	0,6	2,8	3,9	3,3	2,8	1,8
	Стебло		5,8	6,1	8,4	4,9	3,4
	Корінь	2,03	7,7	7,2	5,9	5,4	3,6
	Бутони, квітки					3,8	2,4
	Ціла рослина		4,6	5,2	7,1	4,1	2,6
WW - 843	Листки	0,5	2,6	3,3	2,8	1,4	0,9
	Стебло		5,7	5,9	7,6	2,8	2,2
	Корінь	2,0	7,9	6,3	5,4	3,1	2,7
	Бутони, квітки					2,1	1,3
	Ціла рослина		4,2	4,5	5,4	2,0	1,6
Антарія	Листки	0,4	2,3	2,8	2,3	0,6	0,6
	Стебло		5,6	3,4	6,9	2,3	1,4
	Корінь	1,8	6,6	5,0	4,1	2,9	2,5
	Бутони, квітки				3,1	0,6	0,5
	Ціла рослина		3,7	3,6	4,7	1,1	0,9
Аліот	Листки	0,7	1,8	2,1	1,8	0,5	0,2
	Стебло		7,9	5,2	5,4	1,9	1,2
	Корінь	3,6	8,8	7,5	5,7	3,1	2,8
	Бутони, квітки					0,6	0,6
	Ціла рослина		4,7	3,4	3,1	0,6	0,5
Антоціан	Листки	0,2		0,5	0,6	0,1	0,1
	Стебло			1,2	1,0	0,4	0,4
	Корінь	0,5		1,5	1,1	0,7	0,5
	Бутони, квітки					0,2	0,2
	Ціла рослина			0,7	0,8	0,3	0,3
Жовтун	Листки	0,1		0,5	0,5	0,1	0,1
	Стебло			0,7	0,9	0,3	0,3
	Корінь	0,3		1,3	0,9	0,5	0,5
	Бутони, квітки					0,2	0,2
	Ціла рослина			0,6	0,6	0,2	0,2
Сріблястий	Листки	0,1		0,4	0,5	0,1	0,1
	Стебло			0,6	0,7	0,3	0,3
	Корінь	0,3		1,4	0,8	0,5	0,5
	Бутони, квітки					0,2	0,2
	Ціла рослина			0,6	0,6	0,2	0,2
Марія	Листки	0,3		0,6	0,8	0,2	0,2
	Стебло			0,8	1,4	0,6	0,6
	Корінь	0,6		2,1	1,9	1,0	1,0
	Бутони, квітки					0,4	0,4
	Ціла рослина			0,7	1,0	0,4	0,4
НІР _{0,05}		0,10	0,23	0,2	0,36	0,31	0,15

Таблиця 2.

Вміст глюкозинолатів у вегетативних органах різних сортів ріпаку в період вегетаційного спокою, %

Сорти	Листопад		Грудень		Січень		Лютий	
	Листки	Стебло	Листки	Стебло	Листки	Стебло	Листки	Стебло
Ксаверівський	2,4	6,2	2,3	7,6	2,2	7,6	2,2	7,5
WW - 843	2,3	6,1	2,1	7,4	2,0	7,5	1,9	7,5
Антарія	2,2	6,0	1,9	7,5	1,9	7,5	1,9	7,4
Аліот	1,8	8,6	1,6	10,1	1,5	10,2	1,5	10,2
НІР _{0,05}	0,16	0,44	0,23	0,38	0,19	0,41	0,19	0,32

Селекція цього сорту цілеспрямовано велась на підвищену морозостійкість.

Динаміка вмісту глюкозинолатів в насінні сортів озимого ріпаку «О» типу і «ОО» типу суттєво різнилася. Незначне збільшення глюкозинолатів у насінні сортів «ОО» типу закінчується на 30 день на відміну від однонульових сортів в яких синтез глюкозинолатів продовжувався до 40 днів (табл. 3).

Таблиця 3.

Вміст глюкозинолатів у насінні ярого та озимого ріпаку, %

Сорти	Дні від початку цвітіння									
	10		20		30		40		50	60
	Стручок	Насіння	Стручок	Насіння	Стручок	Насіння	Стручок	Насіння	Насіння	Насіння
Ксаверівський	3,1	0,3	2,4	0,8	1,9	1,6	1,1	2,5	3,1	3,1
WW - 843	2,2	0,2	1,9	0,5	1,4	1,1	0,9	1,6	1,6	1,6
Антарія	1,2	0,2	1,2	0,4	1,0	0,5	0,9	0,6	0,6	0,6
Аліот	0,9	0,1	0,9	0,2	0,9	0,3	0,6	0,3	0,3	0,3
Антоціан	0,4	0,1	0,4	0,2	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Жовтун	0,3	0,1	0,3	0,2	0,3	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Сріблястий	0,3	0,1	0,3	0,2	0,3	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Марія	0,6	0,2	0,6	0,3	0,4	0,5	0,3	0,5	0,5	0,5
НІР _{0,05}	0,11	0,07	0,12	0,15	0,17	0,15	0,17	0,1	0,12	0,16

Вміст глюкозинолатів в зрілому насінні двонульових сортів був в 6-8 разів менший ніж однонульових.

Вміст глюкозинолатів в стручках низькоглюкозинолатних сортів протягом дозрівання насіння суттєво не змінювався (0,1 - 0,3 %). Незначне зменшення на 40 день можна пояснити старінням тканин стручка. Натомість у сортів «О» типу вміст їх протягом 40 днів зменшувався на 1,3-2,0 %.

Висновки

Таким чином, знання процесів біосинтезу глюкозинолатів у вегетативних органах ріпаку дозволяє вже попередньо у фазі бутонізації розрізняти однонульові рослини від двонульових, оскільки в листках сортів «ОО» типу їх вміст в 3-4 рази менший ніж в однонульових.

Ідентифікувати сорти по типах можна також в насінні за 30 днів до повного його досягання.

Вивчення вмісту глюкозинолатів в стеблах допоможе проводити добір найбільш морозостійких форм озимого ріпаку.

Література

1. Fenwick G.B., Heaney K.R. . Glucosinolates and their breakdown products in food plants. *CRL. Crit Rev. Fd Sci. Nutr.*, 18, 1983, s 123-201.
2. Sones K. Heaney R.K. Fenwick G.R. The glucosinolate content of UK vegetables - cabbage (*Brassica oleracea*). Swede (*Brassica napus*) and turnip (*Brassica campestris*). *Fd Addit. Contam*, 1, 1984, s. 103-142.
3. Zukalova H., Vasak, J. Plynove chromatograficke stanoveni glucosinatu rodu *Brassica* (L) metodu trimethylsilylderivatu *Rustl. Vyr.*, 24, 1978/ c. 10, s. 1009-1017.
4. Чугункова Т.В., Ситнік І.Д. Стан і перспективи селекції ріпаку // Генетика та селекція в Україні на межі тисячоліть. – Логос.- 2001 р.- т. - 3– с. 193-199.
5. Ситнік І.Д., Кляченко О.Л. Озимий та ярий ріпак. – Київ. – Знання України. – 2005. – 84 с.

Резюме

Вивчали динаміку вмісту глюкозинолатів в коренях, стеблах, листках, стручках, насінні різних сортів ярого та озимого ріпаку протягом вегетації. Результати досліджень допоможуть селекціонерам розробити принципи ідентифікації сортів ріпаку на «О» та «ОО» типи на ранніх етапах розвитку рослин.

Изучали динамику содержания глюкозинолатов в корнях, стеблах, листьях, стручках, семенах разных сортов ярового та озимого рапса в течение вегетации. Результаты исследований помогут селекционерам разработать принципы идентификации сортов рапса на «О» и «ОО» типы на ранних этапах развития растений.

Dynamics of the maintenance glucosinolates in roots, caulises, leaves, pods, seeds of different kinds winter and spring rape during in vegetation are studied. Results of researches will help selectors breeders to develop principles of identification of kinds of rape the type «0» and «00» (varities) phylums at early stages of development of plants.

ТРОЧИНСЬКА Т. Г.

Одеський національний університет ім. І. І. Мечникова,

Україна, 65026, Одеса, вул Дворянська, 2, e-mail: tatyana_501_80@mail.ru

МІНЛИВІСТЬ ТА ХАРАКТЕР УСПАДКОВУВАННЯ КАРІОМЕТРИЧНИХ ОЗНАК КЛІТИН ГЕНЕРАТИВНИХ СТРУКТУР В ПРОЦЕСІ МІКРОСПОРОГЕНЕЗУ ДЕЯКИХ ЗЛАКІВ

Інформативність та показовість каріометричних ознак у дослідженні особливостей функціонування як рослинних, так і тваринних клітин не викликає сумніву [9 - 12]; їх використання дозволяє робити об'єктивні висновки щодо функціонування білок-синтезуючого апарату клітини, її фізіологічного стану, ступеню впливу різноманітних факторів та ін. [1 - 4, 7 та ін.]. Тим не менш, у науковій літературі майже повністю відсутня інформація щодо генетичного підґрунтя цих кількісних ознак [8, 13]. Метою даної роботи було визначення характеру мінливості та успадковування каріометричних ознак у мікроспорогенезі м'якої пшениці, жита, а також їх гібридів F₁.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ. Матеріалом досліджень були різновікові пиляки F₁ пшенично-житніх гібридів (28 хромосом) від схрещування озимої м'якої пшениці сортів Безоста 1, Миронівська 808, Альбатрос одеський, Фантазія одеська, Одеська 267 (2n = 42) з житом сорту Харківське 60 (2n = 14). Пиляки фіксували за Карнуа; для виготовлення постійних мікропрепаратів доводили до парафіну за загальноприйнятою методикою [6], зрізи товщиною 10 мкм виготовляли на санному мікротомі. Препарати

зabarвлювали метиловим зеленим – піроніном і бромфеноловим синім по Мезіа [5]. Всього було досліджено біля 700 постійних мікропрепаратів.

Препарати вивчали під світловим мікроскопом МБІ-3. Діаметри ядер та ядерець вимірювали за допомогою гвинтового окуляр-мікромметра МОВ – І – 15× при об'єктиві 40× та за допомогою комп'ютерної програми PhotoM 1.21. Об'єм ядер та ядерець визначали в мкм³ за формулою: $V = \pi \cdot a \cdot b^2$, де a – велика, b – маленька напіввісі. Ядерно – ядерцеве співвідношення (ЯЯС) обчислювали за формулою
$$\text{ЯЯС} = \frac{V_{\text{ядра}} - V_{\text{ядерця}}}{V_{\text{ядерця}}}$$

Результати обчислювань та розрахунків обробляли варіаційно-статистичними методами [2]. Характер успадковування кількісних ознак визначали через аналіз ступеню домінантності у F₁ пшенично-житніх гібридів [15]; диференціацію ступеней домінантності описували відповідно до градації, запропонованої [14].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ. З метою визначення характеру мінливості каріометричних ознак клітин у мікроспорогенезі досліджуваних злаків аналізували клітини на п'яти стадіях (стадія спорогенної тканини, профаза І мейозу, тетради мікроспор, вільні невакуолізовані та вакуолізовані мікроспори). Динаміка змін каріометричних ознак гібридів та батьківських форм до етапу вакуолізованих мікроспор вкладається у відому схему [3]; вакуолізовані мікроспори в F₁ пшенично-житніх гібридів припиняють розвиток, не перетворюючись в чоловічий гаметофит, що є одним із проявів принципу аббревіації генетично неповноцінних структур.

Визначення коефіцієнту мінливості показало, що для усіх без винятку клітин чоловічих генеративних структур досліджуваних злаків на всіх етапах мікроспорогенезу властиве високе його значення (CV=18-35). Для аналізу міжсортової мінливості кількісних каріометричних ознак клітин чоловічих генеративних структур м'якої пшениці, а також пшенично-житніх гібридів першого покоління від схрещування цих сортів пшениці з батьківською формою – житом сорту Харківське 60 - був проведений однофакторний дисперсійний аналіз. Його результати дозволяють виявити важливість внеску генотипової компоненти у фенотиповій мінливості досліджених каріометричних ознак на усіх стадіях мікроспорогенезу, окрім стадії тетрад мікроспор. Крім того, встановлено, що на більшості етапів мікроспорогенезу об'єми ядра та ядерця в клітинах пшениці вірогідно більші, ніж такі у жита. Попередні дослідження виявили суттєві відмінності у характері мінливості каріометричних структур у досліджуваних сортів пшениці і жита при вирощуванні їх у різних умовах. Цю тенденцію підтвердили і результати аналізу динаміки мінливості цих ознак у пшенично-житніх гібридів і їх батьківських форм: розподіл частот ознак в F₂ виходило за межі варіювання батьківських форм. Отримані дані дозволили зробити припущення про існування різних систем генетичного контролю кількісних каріометричних ознак клітин чоловічих генеративних структур пшениці і жита.

Порівняння каріометричних параметрів клітин материнських сортів пшениці і F₁ пшенично-житніх гібридів показало подібність об'ємів ядра та ядерця на етапі спорогенної тканини, яка зникає на протязі мікроспорогенезу. Порівнювання каріометричних ознак клітин гібридів F₁ і батьківської форми – жита Харківське 60 - виявило невірогідність розбіжностей між об'ємами ядер і значну різницю (P<0,01) об'ємів ядерця гібридів і жита на першому і останньому етапах мікроспорогенезу; параметри клітин гібридів на проміжних етапах в більшій мірі залежали від материнської форми. Можна припустити, що свій вклад у прояв кількісних каріометричних ознак вносять неідентичні генетичні системи. У зв'язку з цим важливим є встановлення генетичних особливостей за каріометричними ознаками різних сортів пшениці і жита.

Дисперсійний аналіз каріометричних показників ядер і ядерця п'яти досліджених сортів озимої пшениці виявив значну подібність у динаміці мінливості цих ознак. Це дає підставу припустити наявність схожого або майже схожого алельного

складу генетичних систем, які контролюють ці ознаки у різних сортів. Вірогідні різниці за цими ознаками зафіксовані лише на стадіях невакуолізованих і вакуолізованих мікроспор – коли клітини знаходяться у гаплоїдному стані.

Порівняння мінливості каріометричних ознак у різних пшенично-житніх гібридів F_1 дозволило виявити вірогідні відмінності лише на етапі вакуолізованих мікроспор. На етапі невакуолізованих мікроспор і на попередніх етапах мікро спорогенезу не спостерігалось статистично доведеної різниці між гібридами різних комбінацій схрещування за каріометричними показниками.

За допомогою критерію Пірсона χ^2 [12] було обчислено розбіжності у розподілу досліджуваних кількісних ознак у парах «пшениця – жито», «пшениця – гібрид F_1 » й «жито – гібрид F_1 ». Виявилося, що у парах «пшениця – жито» розподіли частот фенотипів за ознакою «об'єм ядра» до проходження клітинами мейозу у більшості випадків вірогідно розрізняються. На етапі тетрад мікроспор не зафіксовано достовірної різниці у розподілах для даної ознаки, а на етапах вільних мікроспор характер розподілів відрізняється з високою вірогідністю. Фенотипові розподіли ознаки «об'єм ядерця» пшениці і жита розрізняються на усіх етапах мікроспорогенезу, окрім тетрад мікроспор. Порівняння мінливості ознак у парах «пшениця – гібрид F_1 » й «жито – гібрид F_1 » також показало залежність розподілу каріометричних ознак від генотипу материнського сорту.

Характер успадковування каріометричних ознак визначали шляхом аналізу ступеню домінантності ознаки в F_1 пшенично-житніх гібридів. Виявилося, що цей параметр значно варіює в залежності від стадії мікроспорогенезу і генотипу материнської форми. В залежності від цих факторів розмах показників ступеню фенотипового домінування у гібридів був дуже широкий (табл. 1).

На етапах спорогенної тканини та профазі I мейозу ознаці «об'єм ядра» клітин усіх досліджених форм властиве неповне від'ємне домінування ($-1 < h_p < 0$). На етапі мікроспор у тетраді для цієї ознаки визначальним фактором став генотип материнського сорту: гібридам від схрещування з житом пшениць Безостої 1 й Миронівської 808 було властиве проміжне домінування ($h_p \approx 0$), у гібридів з участю сортів Альбатрос та Фантазія – зберігалось часткове від'ємне домінування ($h_p = -0,26 - 0,61$), а для гібриду Одеська 267 × Харківське 60 було характерне зверхдомінування жита ($h_p < -1$). Тетради мікроспор віддалених гібридів включають гаплоїдні клітини з незбалансованими геномами, що характеризуються множинними аномаліями мейотичного поділу, завдяки цьому різноманітність проявів фенотипового домінування цілком зрозуміла. На етапі вільних невакуолізованих мікроспор знову відбуваються зміни у прояві досліджуваних кількісних ознак: гібридам F_1 Одеська 267 × Харківське 60 та F_1 Фантазія × Харківське властиве часткове позитивне домінування кращої батьківської форми, решті – часткове від'ємне домінування гіршої за об'ємом ядра форми. На стадії вакуолізованих мікроспор гібридів F_1 спостерігається майже повна дегенерація клітин; це характеризується зменшенням показників h_p за об'ємом ядра для всіх досліджених форм, що свідчить про певну депресію відповідних генетичних систем.

Таблиця 1

Характер домінування (h_p) каріометричних ознак у клітинах чоловічих генеративних структур пшенично-житніх гібридів F_1 в процесі мікроспорогенезу

Гібрид	Спорогенна тканина		Стадії профазі I мейозу		Вільні мікроспори			
					невакуолізовані		вакуолізовані	
	Об'єм, μm^3							
	ядра	ядерця	ядра	ядерця	ядра	ядерця	ядра	ядерця
F_1 Безоста 1 × Харківське 60	-0,36	0,23	-0,18	-0,20	-0,83	-1,50	-1,42	-1,66
F_1 Миронівська 808 × Харківське 60	-0,44	0,36	-0,33	-0,78	-0,75	-1,12	-1,65	-1,74
F_1 Альбатрос × Харківське 60	-0,74	-0,01	-0,16	-0,67	-0,19	-1,17	-0,82	-2,09
F_1 Фантазія × Харківське 60	-0,19	-0,08	-0,35	-0,81	0,12	-1,30	-1,34	-1,80
F_1 Одеська 267 × Харківське 60	-0,61	0,47	-0,40	-0,30	0,12	-1,17	-1,39	-1,97

У порівнянні з h_p об'єму ядра, характеру успадковування об'єму ядерця притаманна більша варіативність значень h_p на початкових стадіях мікроспорогенезу. Для гібридів F_1 з Безостою 1, Миронівською 808 і Одеською 267 характерне часткове позитивне домінування, а у гібридів з участю сортів Альбатрос та Фантазія значення h_p свідчать про проміжне успадковування ($h_p \approx 0$). На стадії профазі I спостерігається певна зміна спадкової програми розвитку клітин в процесі мейозу, що не може не відбиватися на функціонуванні ядерцевих організаторів. Незважаючи на показаний рядом дослідників синтез РНК *de novo*, що свідчить про роботу у профазі ядерцевих локусів, усім гібридам у цій фазі властиве неповне від'ємне домінування ознаки. Після проходження мейотичного поділу в усіх досліджуваних комбінаціях значення коефіцієнту h_p складає менше -1, що свідчить про депресію відповідних батьківських локусів у віддалених гібридів першого покоління. Таким чином, досліджені особливості успадковування деяких кариометричних ознак пшенично-житніми гібридами F_1 свідчать про наявність неідентичних генетичних систем, контролюючих ці ознаки у вихідних батьківських форм, а динаміка прояву характеру успадковування змінюється в процесі мікроспорогенезу.

Висновки

1. Різний характер розподілу частот генотипів при вирощуванні в різних умовах, а також особливості успадковування кариомеричних ознак при гібридизації свідчать про наявність різних систем генетичного контролю прояву цих ознак (об'ємів ядра і ядерця) в клітинах чоловічих генеративних структур пшениці і жита.
2. Характер мінливості кількісних кариометричних ознак «об'єм ядра» і «об'єм ядерця» у сортів озимої м'якої пшениці і жита вірогідно відрізняється на переважній більшості етапів мікроспорогенезу.
3. Характер успадкованості деяких кариометричних ознак у пшенично-житніх гібридів F_1 змінювався від неповного домінування кращої батьківської форми ($h_p = 0,47$) до від'ємного зверхдомінування гіршої за цією ознакою форми ($h_p < -1$) в залежності від генотипу материнської форми (пшениці) і стадії мікроспорогенезу

Література

1. Архипчук В.В., Романенко В.Д., Архипчук М.В. и др. Цитогенетический анализ определения влияния пороговых величин антропогенных факторов на геном растений и животных // Докл. РАН. – 1992. – Т. 326, № 5. - С. 908 – 910.
2. Атраментова Л.О., Утевська О.М. Статистичні методи в біології: Підручник. –Х: ХНУ імені В. Н. Карабіна, 2007. – 288 с.
3. Бланковская Т.Ф., Трочинская Т.Г. Цитологические маркеры экспрессивности генов рРНК в микроспорогенезе у ржи, пшеницы и пшенично-ржаных гибридов // Цитология и генетика. – 2005. – Т. 39, № 2. – С. 22 – 26.
4. Назарова М. И. Функциональная активность ядрышкового аппарата у представителей подсем. Сливовых в годичном цикле их роста и развития // Мат. III съезда ВОГиС им. Н. И. Вавилова. – Л. – 1977. – С. 361 – 362.
5. Паламарчук И. А., Веселова Т. Д. Учебное пособие по ботанической гистохимии. – М.: Изд-во МГУ, 1965. – 108 с.
6. Паушева З. П. Практикум по цитологии растений. – М.: Агропроиздат, 1988. – 271 с.
7. Соболев М. А. Роль ядрышка в реакциях растительных клеток на действие физических факторов окружающей среды // Цитология и генетика. – 2001. – Т. 35. - № 3. – С. 72- 84.
8. Трочинская Т. Г. Генотипические различия кариометрических параметров клеток в микроспорогенезе пшеницы, ржи и их гибридов // Тез. докл. Мат. II Межд. конф. мол.ученых «Біологія: від молекули до біосфери». – С.147 – 148.
9. Туманишвили Г. Д., Саламатина Н. В. Дифференцировка, рост и взаимодействие клеток. – Тбилиси. – 1973. – 248 с.

10. Челидзе П. В. Ультраструктура и функции ядрышка интерфазной клетки. – Тбилиси: Мецниереба, 1985. – 119 с.
11. Ченцов Ю. С. Введение в клеточную биологию. - М.: Академкнига, 2005. - 495с.
12. Шестопалова Н. Г. Репродукция клеток при гетерозисе. Харьков: Вища школа, 1981. – 84 с.
13. Arkhipchuk V.V. Nucleolar variations during the ontogenesis of diploid and tetraploid cyprinid species // Journal of Fish Biology, 1999, v.54, N3, p. 513-524.
14. Beil G.M., Atkins R.E. Inheritance of quantitative characters in grain sorghum // Jowa State. J. Sci. 1965. V. 39. № 3. P. 52.
15. Petr F.C., Frey K .J. Genotypic correlations, dominance and heritability of quantitative characters in oats. Crop Sci., 1976. – V. 6. - № 3. – P. 259 - 262

Резюме:

На п'яти сортах озимої м'якої пшениці, житі Харківське 60 та пшенично-житніх гібридах F₁ досліджено особливості мінливості об'ємів ядра та ядрця, розподіли фенотипового прояву кариометричних параметрів і характер алельних взаємодій полігенних систем, що контролюють ці кількісні ознаки клітин чоловічих генеративних структур пшениці, жита та віддалених гібридів.

На пяти сортах озимой мягкой пшеницы, ржи Харьковская 60 и пшенично-ржаных гибридах F₁ исследованы особенности изменчивости количественных кариометрических признаков (объемов ядра и ядрюшка) и характер распределения фенотипического проявления исследованных кариометрических параметров клеток мужских генеративных структур родительских видов и отдаленных гибридов.

The features of variability of quantitative cariometrical traits (nuclei and nucleolei volumes of male generative structures cells during microsporogenesis) and character of their phenotypic distributing have been investigated on five sorts of winter soft wheat, rye Kharkovskaya 60 and the wheat-rye hybrids F₁

УЛЮКИНА М.К., ЕЩЕНКО А.Г.

Научно-производственная компания «СПЕКТРУМ»

Россия 394077, г. Воронеж, бульвар Победы 8–268, e-mail: opex-spektrum@mail.ru

ОЦЕНКА ГИБРИДОВ ОРЕХА ГРЕЦКОГО F₁ (JUGLANS REGIA L. X JUGLANS MANSURICA MAXIM) ПО СТЕПЕНИ ДОМИНИРОВАНИЯ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ПРИЗНАКОВ ЛИСТЬЕВ И ПЛОДОВ

Основным направлением селекционных работ по ореху грецкому в условиях Центральной лесостепи является повышение его адаптивного потенциала. Решение этой проблемы связано с вовлечением в селекционный процесс генофонда диких видов рода *Juglans* L., располагающих более широким спектром адаптации к неблагоприятным условиям среды.

Материалы и методы

По программе селекции ореха грецкого на зимостойкость были проведены отдаленные межвидовые скрещивания ореха грецкого с орехом маньчжурским в качестве опылителя и донора зимостойкости.

В 1967 г. 1-летними гибридными сеянцами создан гибридно-испытательный участок, на котором представлены гибридные растения от 53 материнских деревьев ореха грецкого из 13 семей. В настоящее время гибридам ореха 40 лет.

Многолетняя селекционная оценка их по зимостойкости, морфологическим особенностям листьев и плодов позволила выделить среди них 5 морфологических групп – типов уклонения в исходные родительские виды: 1 – матроклинные (с уклонением в ♀); 2 – патроклинные (с уклонением в ♂); 3 – промежуточные со слабым уклонением в ♂; 4 – промежуточные с более сильным уклонением в ♂; 5 – группа карликов и растений с новообразованиями [1].

С целью выявления наследования признаков листьев и возможности использования их для ранней диагностики и отбора перспективных форм проведена их оценка в сравнении с исходными родительскими видами.

Результаты и обсуждения

Для оценки характера проявления количественных признаков листьев и плодов нами использован параметр «степень доминантности», позволяющий установить степень выраженности признака и тип наследования его в зависимости от уклонения гибрида в исходные родительские виды. Анализ гибридов проведен по формуле Бейли Г.М. и Аткинса Р.Е.(по Жученко А.А. 1980) [2].

По большинству морфологических признаков листьев наблюдается наследование по материнской линии – в среднем 65,7%, в опылитель – 14,7%, промежуточный характер наследования отмечен у 14,9% растений.

Отмечается преимущественное наследование по материнской линии края листовой пластинки у гибридов матроклинного типа – 91,3%, и опушенности ее по отцовской линии у патроклинных гибридов – 94,7%. Эти признаки могут быть использованы как маркеры при ранней диагностике гибридных форм ореха грецкого.

Признаки листьев у гибридов ореха грецкого, тип наследования и характер проявления их различен в зависимости от уклонения в исходные родительские виды (табл. 1). По размерам всего листа (длине и ширине) отмечается доминирование материнского вида – ореха грецкого у гибридов матроклинного типа.

У гибридов промежуточного и патроклинного типов эти показатели наследуются по отцовской линии – ореху маньчжурскому. У них отмечается положительное доминирование, положительное сверхдоминирование и промежуточное проявление по длине листа и положительное сверхдоминирование (гетерозис) – по ширине листа.

Таблица 1

Доминирование признаков листьев у гибридов ореха грецкого (F₁) различных морфогрупп

№ п/п	Признаки	матроклинные		промежуточные						патроклинные			
				с более сильным проявлением признаков ♂			с более слабым проявлением признаков ♂						
		Степень доминантности по											
		+0	♂	проявление признака	+0	♂	проявление признака	+0	♂	проявление признака	+0	♂	проявление признака
1	Длина всего листа	+0,96		положительное доминирование	-0,38	+0,38	промежуточное проявление		+0,51	положительное доминирование		+1,35	положительное сверхдоминирование
2	Ширина всего листа	+0,96		положительное доминирование		+2,03	положительное сверхдоминирование		+1,92	положительное сверхдоминирование		+1,37	положительное сверхдоминирование
3	Длина верхушечного листочка	+0,5	-0,5	промежуточное проявление	+18,3		положительное сверхдоминирование	+0,98		положительное сверхдоминирование	+0,02	-0,02	промежуточное проявление
4	Ширина верхушечного листочка	+0,19	-0,19	промежуточное проявление	+3,5		положительное сверхдоминирование	+5,14		положительное сверхдоминирование	+0,11	-0,11	промежуточное проявление
5	Длина бокового листочка	-1,0		отрицательное доминирование	+148,0		положительное сверхдоминирование		+116,0	положительное сверхдоминирование		+1,25	положительное сверхдоминирование
6	Ширина бокового листочка	+0,22	-0,22	промежуточное проявление	+3,5		положительное сверхдоминирование	+5,2		положительное сверхдоминирование		+2,6	положительное сверхдоминирование

Значения степени доминантности (по Жученко А.А., 1980)

1. $-\infty < h_p < -1$ – отрицательное сверхдоминирование (отрицательный гетерозис);
2. $-1 \leq h_p < -0,5$ – отрицательное доминирование;
3. $-0,5 \leq h_p \leq +0,5$ – промежуточное проявление;
4. $+0,5 < h_p < +1$ – положительное доминирование;
5. $+1 < h_p < +\infty$ – положительное сверхдоминирование (положительный гетерозис).

Таблица 2

Степень доминантности и эффект гетерозиса у перспективных гибридов ореха грецкого F₁ по размерам и массе плодов.

Тип уклонения гибрида	Показатели доминантности по годам									Отношение F ₁ (%) к МР
	1989			1991			2005			
	степень	проявление признака	по Р	степень	проявление признака	по Р	степень	проявление признака	по Р	
Длина ореха (l)										
матро-клинный	+0,2	промежуточное проявление	–	+9,5	положительное сверхдоминирование	♀	+3,0	положительное сверхдоминирование	♀	138,8
промежуточный	+0,84	положительное доминирование	♂	+1,07	положительное сверхдоминирование	♂	+1,07	положительное сверхдоминирование	♂	112,3
промежуточный	+3,5	положительное сверхдоминирование	♂	+4,5	положительное сверхдоминирование	♂	+4,75	положительное сверхдоминирование	♂	135,3
Диаметр по ребрам (d1)										
матро-клинный	+1,36	положительное сверхдоминирование	♀	+15,0	положительное сверхдоминирование	♀	+19,0	положительное сверхдоминирование	♀	138,8
промежуточный	+7,6	положительное сверхдоминирование	♀	+13,8	положительное сверхдоминирование	♀	+13,6	положительное сверхдоминирование	♀	127,0
промежуточный	+33,6	положительное сверхдоминирование	♀	+32,6	положительное сверхдоминирование	♀	+35,4	положительное сверхдоминирование	♀	168,0
Диаметр по створкам (d2)										
матро-клинный	+2,04	положительное сверхдоминирование	♀	+2,28	положительное сверхдоминирование	♀	+2,2	положительное сверхдоминирование	♀	120,7
промежуточный	+1,2	положительное сверхдоминирование	♀	+1,49	положительное сверхдоминирование	♀	+1,49	положительное сверхдоминирование	♀	118,9
промежуточный	+2,87	положительное сверхдоминирование	♀	+2,67	положительное сверхдоминирование	♀	+3,2	положительное сверхдоминирование	♀	142,4
Масса ореха (m)										
матро-клинный	+1,38	положительное сверхдоминирование	♀	+2,03	положительное сверхдоминирование	♀	+1,07	положительное сверхдоминирование	♀	141,2
промежуточный	+1,84	положительное сверхдоминирование	♀	+2,65	положительное сверхдоминирование	♀	+6,94	положительное сверхдоминирование	♀	253,2
промежуточный	+5,9	положительное сверхдоминирование	♀	+7,92	положительное сверхдоминирование	♀	+7,92	положительное сверхдоминирование	♀	242,7

АНАЛІЗ І ОЦІНКА ГЕНЕТИЧНИХ РЕСУРСІВ

Размеры верхушечных листочков, которые у родительских видов значительно различаются, имеют промежуточное проявление у гибридов матроклинного и патроклинного типов

У гибридов промежуточных размеры верхушечного листочка наследуются по типу положительного сверхдоминирования, т.е. отмечается эффект гетерозиса. Причем, в основном, это проявляется в отношении к материнскому виду.

По размерам боковых листочков у гибридов всех мофогрупп доминируют признаки ореха грецкого (♀), так и маньчжурского (♂) и проявляется эффект гетерозиса [3].

Анализ данных по наследованию размеров и массы орехов также выявил различия их по характеру и степени доминирования (табл. 2). Длина плодов (l) у гибридов матроклинного типа наследуется, в основном, промежуточно. В отдельных комбинациях отмечалось положительное и отрицательное доминирование, положительное и отрицательное сверхдоминирование, по отношению к одному из родителей.

У гибридов промежуточного типа по длине плодов доминирует опылитель – орех маньчжурский. По диаметрам ореха (d_1 d_2) у гибридов всех морфогрупп проявляется различная степень доминирования материнского вида - ореха грецкого и только у гибридов матроклинного типа в отдельные годы отмечалось промежуточное проявление и отрицательное сверхдоминирование. Масса плодов у матроклинных гибридов наследуется промежуточно, либо по типу положительного доминирования и положительного сверхдоминирования в отношении к материнской форме. У промежуточных гибридов проявляется наследование только по типу положительного сверхдоминирования и не отмечено смены характера доминирования по годам. Следует отметить, что эффект гетерозиса в большей степени проявляется у гибридов промежуточного типа по массе плодов – до 242,7 – 253,2% по отношению к среднему показателю родителей и проявление гетерозиса по размерам и массе плодов наблюдается у них также по морфологическим признакам листьев (размеров верхушечного и боковых листочков).

Выводы

Полученные данные по наследованию морфологических признаков листьев и плодов у гибридов F_1 ореха грецкого свидетельствуют о возможности отбора ценных форм для практических целей и дальнейшей селекции.

По результатам оценки гибридов на гибридно-испытательном участке нами выделено шесть перспективных форм, которые в 2003 г. зарегистрированы Государственной комиссией РФ по испытанию и охране селекционных достижений в качестве сортов для условий Центральной лесостепи (Дуэт, Юбиляр, Памяти профессора Вересина, Орион, Марион, Спектрум – авторы Вересин М.М., Улюкина М.К., Ещенко А.Г.)

Литература:

1. *Вересин М.М., Улюкина М.К.* Селекция ореха грецкого на зимостойкость методом отбора и гибридизации в Учебно-опытном лесхозе Воронежского лесотехнического института. Лесная генетика, селекция и семеноводство, – Петрозаводск, 1970. – С 365–369.
2. *Жученко А.А.* Экологическая генетика культурных растений. – Кишинев, Штиинца, 1980. – 588 с.
3. *Улюкина М.К., Ещенко А.Г.* Наследование морфологических признаков листьев (*Juglans regia* L. x *Juglans manshurica* Maxim). – Современные проблемы интродукции и сохранения биоразнообразия. Материалы Международной научной конференции, посвященной 70-летию Ботанического сада (г. Воронеж, 26–29 июня 2007 г.). – Воронеж: Издательско-полиграфический центр Воронежского государственного университета, 2007. – С. 227–233.

Резюме

Проведена оценка гибридов ореха грецкого (F_1 орех грецкий х маньчжурский) по типу наследования морфологических признаков листьев и плодов. Выявлены маркерные признаки для ранней диагностики перспективных гибридных форм о. грецкого, а также выделено шесть гибридов, которые зарегистрированы в качестве сортов для условий Центральной лесостепи.

Проведена оцінка гібридів горіха вольського (F_1 горіх волоський х маньчжурський) по типу наслідування морфологічних ознак листя та плодів. Виявлені маркерні ознаки ранньої діагностики перспективних гібридних форм горіха волоського, а також виділено 6 гібридів, які зареєстровані як сорти для умов Центрального лісостепу.

Evaluation of walnut hybrids (F_1) was made by the type of inheritance of morphological characters of leave and fruits. Marker characteristics for early diagnostics of promising walnut hybrid forms were revealed and 6 hybrids which were recorded as varieties for the Central forest–steppe conditions were also isolated.

ФАЙТ В.И., МОКАНУ Н.В.

Селекционно-генетический институт - Национальный центр семеноведения и сортоизучения, Украина, 65036, Одесса, Овидиопольская дорога, 3, e-mail: fayt@paso.net

ОЦЕНКА ВОЗМОЖНОСТЕЙ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ЗАПАСНЫХ БЕЛКОВ В КАЧЕСТВЕ МАРКЕРОВ КОЛИЧЕСТВЕННЫХ ПРИЗНАКОВ ПШЕНИЦЫ

Высокополиморфные гены запасных белков глиаина и глютеина пшеницы являются одними из наиболее информативных молекулярно-генетических маркеров [1]. Наиболее широкое распространение локусы запасных белков глиаина и глютеина получили при использовании в качестве маркеров технологических качеств зерна и хлебопекарных свойств муки [2, 3]. Их широко используют для решения разнообразных задач генетики, селекции и семеноводства [4, 5]. Показана сопряженность аллельных вариантов запасных белков с устойчивостью к биотическим [6] и абиотическим [7] стрессовым факторам, а также с признаками являющимися составляющими урожая [8].

В связи с выше изложенным цель настоящей работы заключалась в оценке возможностей использования генов запасных белков глиаина и глютеина в качестве маркеров некоторых морфологических признаков, урожая и его составляющих в условиях степи Причерноморья с использованием различного исходного материала.

Материал и методы

В качестве исходного материала использовали идентифицированные по генам *Gld* и *Glt* 164 рекомбинантно-инбредные линии F_5 комбинации скрещивания Одесская 16/Безостая 1 [9]. Указанные рекомбинантно-инбредные линии получены без воздействия при репродуцировании какого-либо отбора по урожаю или его составляющим [10]. А также 38 сортов селекции СГИ II –VII сортосмен и ряд сортов других учреждений Украины (2 образца) и России (5 образцов). Идентификация генотипов запасных белков приведена согласно классификации А.Ф. Поперели [11].

Посев сортов (2002-2004 гг.) и рекомбинантно-инбредных линий (2003-2005 гг.) проводили в оптимальные для юга степи Причерноморья сроки (2-16 октября) из расчета 500 всхожих зерен на 1 м^2 . Учетная площадь делянки 3 (сорта) и 2 м^2 (рекомбинантно-инбредные линии). Повторность опыта трехкратная. Во время вегетации отмечали дату колошения (ПВК), а по её окончании проводили учет количества продуктивных стеблей (КПС) и у 15 растений каждого генотипа высоты

растений (ВР) и массы зерна колоса (МЗК). Во время уборки учитывали урожай зерна с делянки (УЗ). Статистическую обработку полученных данных проводили по Рокицкому [12].

Результаты и обсуждение

Сопоставление различающихся по аллелям того или иного гена *Gld* или *Glt*, групп сортов не выявило достоверных различий между ними по урожаю зерна (УЗ). Критерий Фишера $F_{\text{расчетное}}$ при $P=0,05$ не превышал $F_{\text{табличное}}$. В тоже время выявлено достоверное влияние аллельных различий некоторых генов на другие изученные признаки (табл. 1). Так, сорта с аллелем *Gld6A4* колосились достоверно раньше на 3 и 2 дня, соответственно, по сравнению с сортами, для которых характерно присутствие аллеля *Gld6A3* или *Gld6A1*. Последние два генотипа достоверно не различались между собой (18 и 17 суток, соответственно; отчет от даты 1 мая). Аллельные различия по данному гену (*Gld6A*), как и по генам *Gld6D* и *Glt1A* оказывали достоверное влияние и на формирование высоты растений (ВР). Сорта с аллелем *Gld6A4* и *Gld6A1* достоверно не различались между собой по указанному признаку, но оба уступали на 11 и 10 см, соответственно, более высокорослым сортам с аллелем *Gld6A3*. Большей ВР характеризовались и сорта с аллелем *Gld6D2*. Наличие в генотипах сортов других аллелей (*Gld6D4*, *Gld6D1* или *Gld6D3*) приводило к достоверному снижению ВР. Также большей ВР характеризовались сорта с аллелем *Glt1A1* по сравнению с сортами, у которых присутствовал аллель *Glt1A2*. Аллельные различия по гену *Glt1B* были связаны с различиями сортов сразу по двум признакам массе зерна колоса (МЗК) и количеству продуктивных стеблей (КПС). И если сорта с аллелем *Glt1B2* формировали достоверно большую МЗК по сравнению с сортами, у которых присутствовал аллель *Glt1B1*, то по КПС наблюдали обратную закономерность. Сорта с аллелем *Glt1B1* формировали на 46 шт/м² продуктивных стеблей больше по сравнению с сортами, у которых присутствовал аллель *Glt1B2*.

Таблица 1

Средние значения изученных признаков сортов озимой пшеницы различающихся по аллелям генов *Gld* и *Glt*, Одесса 2002-2004 гг.

Локус	Аллель	Признаки				
		ПВК, сутки	ВР, см	МЗК, г	КПС, шт/м ²	УЗ, кг/м ²
<i>Gld1A</i>	2	19	95	0,97	429	1,21
	3	16	91	0,95	421	1,15
	4	17	84	0,98	388	1,15
	5	18	101	0,90	377	1,04
	10	16	81	0,91	406	1,08
НСР _{0,05}		-	-	-	-	-
<i>Gld1B</i>	1	17	88	0,96	411	1,16
	2	16	75	1,10	340	1,22
	15	17	81	0,91	379	1,09
НСР _{0,05}		-	-	-	-	-
<i>Gld1D</i>	1	17	88	1,03	398	1,20
	2	17	81	0,99	442	1,16
	4	16	87	0,94	400	1,13
	5	18	93	0,94	410	1,17
НСР _{0,05}		-	-	-	-	-
<i>Gld6A</i>	1	17	81	0,98	410	1,09
	3	18	91	0,94	411	1,16
	4	15	80	0,98	373	1,16
НСР _{0,05}		1	3	-	-	-
	1	18	92	0,97	414	1,13

<i>Gld6B</i>	2	17	84	0,95	405	1,17
	3	16	80	1,00	351	1,07
	4	18	80	0,90	387	1,04
HCP _{0,05}		-	-	-	-	-
<i>Gld6D</i>	1	17	83	0,94	412	1,16
	2	19	99	0,92	411	1,11
	3	15	78	0,96	391	1,24
	4	17	85	0,95	389	1,12
HCP _{0,05}		-	6	-	-	-
<i>Glt1A</i>	1	18	91	0,95	387	1,12
	2	17	82	1,00	382	1,17
HCP _{0,05}		-	6	-	-	-
<i>Glt1B</i>	1	18	88	0,92	407	1,15
	2	17	84	1,03	361	1,15
HCP _{0,05}		-	-	0,07	27	-

В силу требований производства сорта должны отвечать определенным требованиям по скороспелости, высоте растений, качеству зерна и урожаю. Генотипы, не отвечающие этим требованиям по какому-либо показателю, выбраковываются, т. е. генетическое разнообразие сортов по определенным признакам ограничено. Следовательно, выявленные в наборе коммерческих сортов связи между признаками не соответствуют реально существующим связям в природе. Исходя из этого, для изучения связи генов запасных белков с некоторыми хозяйственно-ценными признаками использовали 164 рекомбинантно-инбредные линии F₅ Одесская 16/Безостая 1. Рекомбинантно-инбредные линии, полученные от скрещивания указанных двух сортов, как и родительские формы (точнее индивидуальные растения указанных сортов, использованных нами в инициальном скрещивании для получения семян F₁) различались по аллелям пяти глиадин- *Gld1A*, *Gld1B*, *Gld1D*, *Gld6A*, *Gld6B* и двум глютеинкодирующим *Glt1A*, *Glt1B* локусам.

Аллельные различия по указанным локусам или по генам, тесно сцепленным с ними, не оказывали достоверного влияния на ПВК рекомбинантно-инбредных линий, за исключением локуса *Gld6A* (табл. 2). Однако частные различия линий с аллелями *Gld6A1* и *Gld6A3* по ПВК статистически не существенны. Не выявлено достоверного влияния аллельных различий генов *Gld* на ВР и КПС рекомбинантно-инбредных линий. Критерий Фишера F_{расчетное} во всех случаях меньше F_{табличного}. Аллельные различия по локусам *Gld6B* и *Gld6D* были связаны с различиями рекомбинантно-инбредных линий по МЗК. Однако указанная связь была выявлена для первого локуса только в 2006 году, а для второго только в 2004 году, т.е. носила случайный характер.

Таблица 2

Агрономические признаки рекомбинантно-инбредных линий различающихся по аллелям запасных белков в различные годы, Одесса, 2004-2006 гг.

Локус	Аллель	Признаки														
		ПВК, сутки			ВР, см			КПС, шт/м ²			МЗК, г			УЗ, кг/м ²		
		04	05	06	04	05	06	04	05	06	04	05	06	04	05	06
<i>Gld1A</i>	2	22	22	27	127	114	98	963	578	643	0,56	0,99	0,71	0,35	0,54	0,36
	4	23	23	27	126	114	97	1115	589	631	0,56	0,96	0,72	0,36	0,54	0,35
HCP _{0,05}		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Gld1D</i>	1	22	22	27	126	114	96	978	577	635	0,56	0,96	0,70	0,35	0,54	0,35
	4	22	23	27	126	114	98	1094	580	630	0,56	0,99	0,72	0,36	0,54	0,36
HCP _{0,05}		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Gld6A</i>	1	23	23	28	127	114	97	962	584	637	0,55	0,95	0,71	0,35	0,54	0,34
	3	22	22	27	126	114	97	1138	579	638	0,58	0,99	0,71	0,36	0,54	0,37
HCP _{0,05}		-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,02
<i>Gld6B</i>	1	23	23	27	127	114	98	948	582	640	0,58	0,97	0,74	0,36	0,55	0,36
	2	22	23	27	126	114	97	1109	580	632	0,54	0,97	0,68	0,35	0,54	0,36

НСР _{0,05}		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,03	-	-	-
<i>Gld6D</i>	1	22	23	27	127	114	98	955	586	630	0,54	0,98	0,72	0,36	0,54	0,35
	4	22	22	27	125	113	96	1135	575	639	0,59	0,96	0,70	0,35	0,54	0,36
НСР _{0,05}		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Glt1A</i>	1	22	23	27	128	114	98	1106	573	627	0,56	0,95	0,73	0,34	0,54	0,36
	2	22	23	27	125	113	97	962	589	654	0,56	0,99	0,70	0,37	0,55	0,36
НСР _{0,05}		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Glt1B</i>	1	22	23	27	127	114	97	1105	585	629	0,56	0,99	0,72	0,35	0,55	0,35
	2	22	23	27	126	114	98	972	582	647	0,56	0,96	0,69	0,35	0,54	0,36
НСР _{0,05}		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Аллельные различия по семи генам запасных белков ни в один из трех лет изучения не оказывали достоверного влияния на формирование урожая зерна, за исключением локуса *Gld6A* в 2006 году. В данном случае рекомбинантно-инбредные линии с аллелем *Gld6A3* формировали урожай зерна больше таковых с аллелем *Gld6A1*.

Выводы

Изучение набора коммерческих сортов разных периодов создания и рекомбинантно-инбредных линий F₅ комбинации скрещивания Одесская 16/Безостая 1 в течение ряда лет позволяет выявить факт отсутствия влияния аллельных различий по локусам *Gld1A*, *Gld1D*, *Gld6A*, *Gld6B*, *Gld6D*, *Glt1A*, *Glt1B* на урожай зерна. Связь продолжительности периода до колошения, высоты растений, массы зерна колоса, количества продуктивных стеблей с наличием в генотипе того или иного аллеля локусов *Gld6A*, *Gld6B*, *Gld6D*, *Glt1A* или *Glt1B* в значительной степени зависит от погодных условий года изучения и от вида исходного растительного материала (сорта или рекомбинантно-инбредные линии), т.е. носит случайный характер.

Литература

1. Попереля Ф.О. Наукові дослідження і розробки відділу генетичних основ селекції // Зб. наук. праць СГІ – НАЦ НАІС. – Одеса. – 2002. – Вип. 3(43). – С. 130-147.
2. Попереля Ф.О., Благодарова О.М. Генетика якості зерна перших генотипів надсильної пшениці України // Цитология и генетика. – 1998. – Т. 32, №6. – С. 11-19.
3. Cornish G.B. et al. Grain proteins as markers of genetic traits in wheat // J. Agr. Res. – 2001. – Vol. 52, №11-12. – P. 1161-1171.
4. Созинов А.А. Полиморфизм белков и его значение в генетике и селекции. – М.: Наука, 1985. – 272 с.
5. Новосельская-Драгович А.Ю. и др. Динамика генетического разнообразия саратовских сортов мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L. (по глиадинкодирующим локусам) за 80-летний период научной селекции // Генетика. – 2003. – Т. 39, №10. – С. 1338-1346.
6. Попереля Ф. А., Бабаянц Л.Т. Блок компонентов глиадина *Gld 1B3* как маркер гена, обуславливающего устойчивость растений к стеблевой ржавчине // Доклады ВАСХНИЛ. – 1978. – №6. – С. 6-8.
7. Копусь М.М. Полиморфизм белков зерна и селекция озимых пшениц // Автореф. дис. д-ра с.-х. наук. – Краснодар, 1998. – 48 с.
8. Козуб Н.А., Созинов И.А. Локусы запасных белков мягкой пшеницы как маркеры локусов количественных признаков // Фактори експериментальної еволюції організмів. – К.: Аграрна наука, 2003. – С. 387-391.
9. Мокану Н.В. Идентификация рекомбинантно-инбредных линий Одесская 16 / Безостая 1 по генам запасных белков эндосперма семени пшеницы // Зб. наук. праць СГІ – НЦСС. – Одеса. – 2007. – Вип. 9(49). – С. 22-30.
10. Файт В.И. Проблемы генетического анализа зимо-морозостойкости // Физиология и биохимия культурных растений. – 2004. – Т. 36, №5. – С. 371-382.
11. Попереля Ф.О. Три основні генетичні системи якості зерна озимої м'якої пшениці // Реалізація потенційних можливостей сортів та гібридів селекційно-генетичного інституту в умовах України. – Одеса, 1996. – С. 117-132.

12. Рокицкий П.Ф. Биологическая статистика. – М.: Колос, 1973. – 327 с.

Резюме

Відмінності комерційних сортів або рекомбінантно-інбредних ліній за урожаєм зерна не залежать від наявності в їх генотипах того або іншого алелю генів запасних білків. Наявність зв'язку алелів генів *Gld* і *Glt1A* з тривалістю періоду до колосіння, висотою рослин, масою зерна колосу, кількістю продуктивних пагонів визначається погодними умовами року вирощування або типом вихідного рослинного матеріалу.

Различия коммерческих сортов или рекомбинантно-инбредных линий по урожаю зерна не зависят от наличия в их генотипах того или иного аллеля генов запасных белков. Наличие сопряженности аллелей генов *Gld* и *Glt1A* с продолжительностью периода до колошения, высотой растения, массой зерна колоса, количеством продуктивных стеблей определяется погодными условиями года изучения и видом исходного растительного материала.

Differences of commercial cultivars or recombinant-inbred lines in seed yield do not depend on the presence of that or another allele of storage protein genes at their genotypes. The connection of the *Gld* and *Glt* gene alleles with duration of period upto heading, plant height, weight of spike seeds and number of productive stems is caused by the weather conditions of the cultivation year or by the type of the initial plant material.

ФАРТУШНЯК А.Т.

ННЦ „Інститут землеробства УААН”,
Україна, 08162, смт. Чабани, вул. Машинобудівників, 2 – „Б”,
e-mail: selectio@ukrpack.net

РЕЗУЛЬТАТИ СЕЛЕКЦІЙНОЇ РОБОТИ ПО БІЛОМУ КОРМОВОМУ ЛЮПИНУ

Кормовий люпин – цінна білкова культура завдяки високому вмісту протеїну і наявності незамінних амінокислот в зерні і зеленій масі; крім того люпин є джерелом біологічного азоту, що сприяє значному підвищенню родючості ґрунту. У відділі селекції і насінництва люпину ННЦ „ІЗ УААН” проводиться робота зі створення нового генетичного матеріалу люпину, що характеризується високою продуктивністю зерна, зеленої маси, сухої речовини, скоростиглістю, високим вмістом білку, низьким вмістом алкалоїдів, стійкістю до комплексу хвороб.

Матеріали і методи

Селекційна робота зі створення нових сортів люпину проводиться за повною селекційною схемою із створенням, добором та вивченням нового вихідного матеріалу у всіх розсадниках та сортовипробуваннях. Вихідний селекційний матеріал створюється методом гібридизації з використанням раніше індукованих мутантів. Створений гібридний і мутантний генофонд є основою створення сортів люпину інтенсивного типу із заданим комплексом господарсько-цінних ознак.

Результати і обговорення

В результаті проведених досліджень виведено і передано на державне сортовипробування ряд сортів білого люпину, цінність цих сортів в тому, що в зерні міститься 38-47% високоякісного білка, збір якого становить 1200-1500 кг/га. За вмістом незамінних амінокислот білок сортів люпину не відрізняється від білка сої, однак має значно нищу собівартість.

Сорти білого люпину відносяться до інтенсивного типу, стійкі і толерантні до хвороб і шкідників, до екстремальних факторів середовища, придатні для вирощування в лісостеповій і поліській зонах.

У Державному реєстрі сортів рослин України на 2008 рік знаходиться 10 сортів білого кормового люпину селекції ННЦ „Інститут землеробства УААН”: Піщевой, Олешка, Синій парус, Володимир, Борки, Туман, Вересневий, Дієта, Серпневий, Макарівський.

Одним із важливих елементів адаптивних систем захисту рослин є використання сортів, які характеризуються польовою стійкістю до хвороб. Створення і впровадження в виробництво стійких сортів є найбільш екологічно і економічно вигідним методом боротьби з хворобами.

За останні роки на посівах люпинів за сприятливих (для хвороби) погодних умов спостерігається розвиток грибної хвороби – антракнозу, збудником якої є гриб *Colletotrichum glocosporoides*. На білому люпині цей збудник розвивається в фазі сходів, стеблення і боботворення. За погодних умов (температура 18°C і і підвищеній зволоженості) в ці фенофази проходить інтенсивне зараження рослин і розвиток цієї хвороби.

На сьогодні у світі немає стійких до цієї хвороби сортів, проводиться робота щодо створення джерел та донорів стійкості до цієї хвороби. Одержано селекційний матеріал білого люпину номери 2247, 983/11, 246/34 з високою польовою стійкістю до антракнозу, який використовується в селекційному процесі як джерела підвищення стійкості до цієї хвороби. Лінія 2247 виділена в епіфітотійні роки за ознакою стійкості до хвороби – низкоросла, детермінантна, скоростигла. Шляхом схрещування цієї лінії з сортом Олешка і подальшим добором створено сорт білого кормового люпину

Макарівський, який характеризується польовою стійкістю і є толерантним до антракнозу. В 2005 році цей сорт було передано до державного сорто випробування.

За результатами двох років державного сорто випробування сорт внесений до Реєстру сортів рослин України на 2008 рік і рекомендований до вирощування на зерно і зелену масу в лісостеповій і поліській зонах. Сорт безалкалоїдний, кормовий, стійкий до хвороб, вилягання і осипання. Урожайність 40-45 ц/га, вегетаційний період 105-108 днів, висота рослин – 75 см, маса 1000 зерен – 290-310 г, ураження фузаріозом – 3,4%, іншими хворобами – 0%, вміст білка в зерні – 39,7%, жиру – 10,5%, алкалоїдів в зерні – 0,17%, вміст алкалоїдів в зеленій масі – 0,010%, стійкість до вилягання 5 балів. Насіння біле, округле. Гілкування верхнє (симподіальне).

Висновки

В результаті проведеної роботи створено сорти і виділено форми білого кормового люпину з високою продуктивністю, скоростиглістю, з високим вмістом білка і низьким вмістом алкалоїдів, стійкі до хвороб.

Резюме

Приведены результаты работы по созданию и изучению генетических ресурсов белого кормового люпина.

Наведені результати роботи зі створення і вивчення генетивних ресурсів білого кормового люпину.

The results of the work on the development and study of genetic resources of white fodder lupine are adduced.

ЦЕРЕНЮК О.М,

Інститут тваринництва УААН,

Україна, 62404, Харків, н/в Кулиничі, вул. 7-ї Ге. Армії 3

КОМБІНАЦІЙНА ЗДАТНІСТЬ МАТОК ОСНОВНИХ РОДИН УЕЛЬСЬКОЇ ПОРОДИ СВИНЕЙ

Двома подібними породами в Україні є ландрас та уельс, однак між ними є певні відмінності. Тварини уельської породи вважаються краще пристосованими до жорстких умов утримання. Так при перевезенні з України до Вірменії свиней порід ландрас та уельс, тварини породи ландрас виявились більш чутливими до природнокліматичних умов Араратської рівнини ніж порода уельс, що свідчить про кращу адаптаційну здатність уельсів. [1] Враховуючи показники материнської продуктивності на рівні великої білої породи, та значне переважання останньої за відгодівельним та м'ясними якостями уельси в певній мірі є конкурентами основної породи свиней в Україні.

На цей час основне стадо уельської породи свиней зосереджено в племзаводі ДГ ІТ УААН "Гонтарівка" Вовчанського району Харківської області (колишнє відділення «Профінтерн» ДГ «Українка»). В ТОВ «Криворіжхарчоторг», Апостолівського району Дніпропетровської області розпочато створення племінного репродуктору з розведення цієї породи. Окрім цього є ряд фермерських господарств, де «в чистоті» розводять уельсів. Однак тварин в цих господарствах важко об'єднати в селекційну групу одного рівня. Враховуючи це, нами використовується вертикальна селекційна система з обов'язковим вивченням комбінаційної здатності селекціонуємих тварин при поєднанні з іншими широкорозповсюдженими генотипами різних напрямків продуктивності.

Вибір системи схрещувань при оцінці комбінаційної здатності батьківських форм є визначальним у формуванні методів оцінки його точності, залежить від генетичної

різноманітності та потенційних можливостей похідного матеріалу, а також від селекційних завдань [2,3]. Однак організація складних схем схрещування з метою вивчення комбінаційної здатності в умовах товарних господарств є практично неможливою. Натомість вивчення комбінаційної здатності за участю двох порід свиней організувати значно легше. Генетичною основою загальною комбінаційної здатності є адитивна дія генів та епістаз, що зумовлений взаємодією генів з адитивними ефектами. Специфічна комбінаційна здатність зумовлена домінуванням та епістазом. Ознаки, які визначаються адитивною дією генів, високо успадковуються. Але більшість господарсько-корисних ознак тварин успадковується за другим типом - домінуванням і кодомінуванням - викликаним взаємодією алелей одного локусу [4].

Матеріали і методи

Метою наших досліджень було встановлення комбінаційної здатності основних заводських одиниць уельської породи при поєднанні з тваринами великої білої та полтавської м'ясної порід. Для досягнення поставленої мети нами були проведені дослідження на базі ТОВ «Криворіжхарчоторг» Апостолівського району Дніпропетровської області методом груп (табл. 1). Розрахунок ефекту гетерозису проводили за методикою В.Т. Горина та Н.І. Нікітченко (1974) [5]. Комбінаційну здатність розраховували за традиційними методиками [6, 7].

Результати та обговорення

Аналізуючи продуктивність тварин за різних поєднань, стає очевидним, що при прямому і при зворотному поєднаннях спостерігалось суттєве покращення показників практично по всіх ознаках продуктивності свиноматок. Однак рівень підвищення по кожній з ознак був різним. При поєднанні тварин м'ясного напрямку продуктивності також спостерігався достатній рівень материнських якостей. Однак, порівняно з поєднанням тварин уельської породи та тварин великої білої породи, заміна останньої на полтавську м'ясну дещо вплинула на зменшення багатоплідності при прямому та зворотному кросах. При цьому слід враховувати, що матки полтавської м'ясної за чистопорідного розведення поступались маткам великої білої (при тому ж методі розведення) за показником багатопліддя на 12,5 %. За масою гнізда при народженні полтавська м'ясна порода характеризувалась показниками, меншими на 22,5 %. Менші розбіжності між породами були за молочністю (3,5 %). Проте за кількістю порослят при відлученні розбіжностей між породами не зареєстровано. А вже за масою гнізда при відлученні в 45 днів, тварини полтавської м'ясної породи перевершували показники великої білої на 2,0 %. При цьому підтверджується думка, що більший прояв ефекту гетерозису спостерігається при поєднанні порід, що мають між собою більшу генетичну дистанцію.

Порівнюючи прямі схрещування з використанням уельської породи за всіма показниками материнських якостей кращим виявилось поєднання з матками великої білої породи свиней. Стосовно зворотних схрещувань, за виключенням молочності, кращим було поєднання уельських маток з кнурами полтавської м'ясної породи свиней. Серед усіх поєднань ця комбінація порід виявилась кращою за масою гнізда при відлученні. Це пояснюється тим, що, як тварини уельської породи так і тварини великої білої мають кращі показники материнських якостей порівняно з полтавською м'ясною. Відносно ж маси гнізда при відлученні, м'ясні генотипи характеризуються інтенсивнішими процесами росту, що сприяє кращій динаміці накопичення живої маси за перші 45 днів їх життя.

На основі отриманих показників продуктивності нами був встановлений прояв ефекту гетерозису в прямих та зворотних схрещуваннях. Поєднання тварин великої білої та уельської порід за багатоплідністю характеризувалось найбільшими показниками специфічного та загального гетерозису за прямого схрещування та гіпотетичного, специфічного і загального гетерозису за зворотного. За цією ознакою в

обох варіантах схрещувань спостерігався гетерозис від +0,893 до +5,505.

За масою гнізда при народженні поєднання маток великої білої породи з кнурами уельської породи характеризувалось гетерозисом всіх типів. Але найвищим був специфічний (+7,600) та загальний гетерозис (+4,062). В разі зворотного поєднання за цією ознакою реєстрували гіпотетичний та специфічний гетерозис.

Стосовно молочності, то в обох поєднаннях спостерігався гетерозис усіх типів. У прямому поєднанні найбільшим проявом характеризувався справжній та гіпотетичний гетерозис (+5,019 по обох типах), у зворотному ж схрещуванні найбільшими виявились справжній та загальний типи гетерозису (+8,178 та +5,915 відповідно). Така сама картина спостерігалась і за масою гнізда при відлученні.

Таким чином, при поєднанні тварин великої білої з уельською породою, більший ефект гетерозису спостерігався за молочністю, масою гнізда при народженні та багатоплідністю, що пов'язано з рівнем продуктивності батьківських форм та комбінації їх генетичного матеріалу.

Порівняно з поєднанням тварин великої білої та уельської породи, при поєднанні тварин полтавської м'ясної та уельської породи за багатоплідністю всі типи гетерозису спостерігались лише при зворотному поєднанні. При прямому поєднанні спостерігався лише справжній та гіпотетичний гетерозис на рівні +4,082. При зворотному поєднанні найбільший прояв ефекту гетерозису спостерігався за справжнім та загальним типами гетерозису (+18,367 та +13,171 відповідно).

Подібна картина спостерігалась і за масою гнізда при народженні. За цим показником при прямому схрещуванні спостерігався справжній, гіпотетичний та загальний типи гетерозису. При зворотному схрещуванні рівень прояву ефекту гетерозису за різними типами знаходився в межах +12,810...+25,229.

За молочністю рівень прояву ефекту гетерозису був дещо меншим, однак картина прояву за типами гетерозису по обох поєднаннях зберігалась як і за попереднім показником. При цьому, при прямому поєднанні, розмах ефекту гетерозису за різними типами знаходився в межах -2,000...+3,661, при зворотному на рівні від +4,554 до +10,597. Ми пов'язуємо це з кращими показниками продуктивності у тварин уельської породи, що вплинуло на продуктивність тварин при схрещуванні.

Стосовно маси гнізда при відлученні за прямим схрещуванням спостерігались наступні типи гетерозису: справжній, гіпотетичний, специфічний. Розмах прояву ефекту гетерозису за цими типами знаходився в межах +1,033 - +1,929. При зворотному схрещуванні спостерігались всі чотири типи гетерозису в межах +1,235 - +4,292. На формування показника маси гнізда при відлученні суттєвий вплив, окрім генетичної інформації батьківських форм, зумовлює поєднання батьківських генів та їх комбінація у помісного молодняка. Враховуючи це, доля впливу батьківських форм при реципрокному схрещуванні спрямовується до зрівняння та зменшення розбіжностей між прямим та зворотним схрещуваннями.

Для отримання прогнозованого рівня гетерозису в системах схрещуванням та гібридизації краще використовувати заводські одиниці, що мають значні показники комбінаційної здатності. Серед маток уельської породи, при поєднанні з кнурами великої білої кращі показники загальної комбінаційної здатності спостерігались у родини Емми. Тварини родини Лайк Мейд характеризувались позитивними показниками за масою гнізда при народженні та масою гнізда при відлученні, однак мали негативні показники за багатоплідністю та молочністю. Тварини родини Лайк Гьорл характеризувались негативними показниками загальної комбінаційної здатності за всіма показниками материнських якостей.

Матки родини Емми при поєднанні їх з кнурами полтавської м'ясної породи, окрім багатоплідності за рештою показників характеризувались позитивними величинами ЗКЗ, родини Лайк Гьорл мали позитивні величини ЗКЗ лише за багатоплідністю та масою гнізда при відлученні. Матки родини Лайк Мейд

характеризувались позитивною величиною ЗКЗ лише за масою гнізда при відлученні.

Матки уельської породи при схрещуванні з кнурами полтавської м'ясної також характеризувались різними показниками СКЗ. Єдиною, що мала позитивні величини СКЗ за всіма показниками материнської продуктивності була родина Лайк Мейд. Окрім неї, родина Емми, характеризувалась позитивними величинами СКЗ за молочністю та масою гнізда при відлученні.

Стосовно родин уельської породи свиней при їх поєднанні з кнурами великої білої, матки родини Лайк Гьорл за всіма показниками характеризувались позитивними величинами СКЗ. Решта родин мали негативні величини СКЗ (за винятком родини Лайк Мейд, яка характеризувалась позитивною величиною СКЗ за показником маси гнізда при народженні).

Отримані дані вказують на різні механізми формування материнської продуктивності при схрещуванні, які забезпечуються взаємодією алельних та неалельних генів і в результаті створюють різний рівень варіанс комбінаційної здатності.

Висновки.

Тварини уельської породи характеризуються значними показниками комбінаційної здатності, яка в межах різних заводських одиниць має різні механізми формування. В якості материнської форми кращим є використання уельців в поєднанні з кнурами полтавської м'ясної породи, в якості батьківської є поєднання з матками великої білої породи свиней. За відтворювальними якостями свиноматок, кращими показниками характеризуються поєднання маток великої білої з кнурами уельської породи, при цьому більший прояв ефекту гетерозису спостерігається за молочністю, масою гнізда при народженні та багатоплідністю. Таким чином пряме поєднання маток великої білої з кнурами уельської породи дає змогу краще використовувати потенціал батьківських форм. При цьому уельська порода краще проявляє себе в якості батьківської форми. Складні механізми формування більшості материнських якостей на полігенній основі, враховуючи різні рівні варіанс комбінаційної здатності, вказують на значний потенціал відносно подальшого їх покращення.

Література

1. *Варян Р.С.* Хозяйственные и биологические особенности некоторых пород свиней в различных экологических условиях и их использование для развития свиноводства в Армянской ССР.- автореферат дисс. уч. ст. докт с.-х. наук.- Харьков.- НИИЖ.-1977.-49с.
2. *Шейко И.П., Епишко Т.И.* Генетические методы интенсификации селекционного процесса в свиноводстве.- Жодино.- РУП «Институт животноводства НАН Беларуси».- 2006.-197 с.
3. *Коваленко Б.П.* Відтворювальні якості свиноматок при розведенні за родинами та методи їх оцінки // Аграрний вісник Причорномор'я. - Вип. 31. - Одеса. - 2005. - с. 31-33.
4. *Коваленко В.П., Горбатенко І.Ю.* Біотехнологія у тваринництві й генетиці.-Київ.-Урожай.-1992.-152 с.
5. *Горин В.Т., Никитченко И.Н.* Оценка комбинационной способности заводских линий по репродуктивным качествам свиноматок// Научные основы развития животноводства в Белоруссии. -1974. - Вші. 4. -с. - 66-70.
6. *Турбин Н.В., Хотилева Л.В.* Сравнительная оценка методов анализа комбинационной способности у растений. -1966. - т.1. - №8. - С.8-18.
7. *Горин В.Т.* Проблема гетерозиса в свиноводстве и возможности применения некоторых генетических параметров и методов для прогнозирования степени его проявления: Автор, дис.докт. с.-х. наук: 06.550 / Укр. орд. тр. красн. знамени с.-х. академия. - Киев, 1970. - 54 с.

Резюме

Наведено результати визначення ефектів гетерозису та вивчення комбінаційної здатності уельсів при реципрокних поєднаннях з великою білою та полтавською м'ясною породами. Проведено оцінку кращих поєднань за участю тварин уельської породи свиней.

Приведены результаты определения эффекта гетерозиса и изучения комбинационной способности уэльсов при реципрокных сочетаниях с крупной белой и полтавской мясной породами. Проведена оценка лучших сочетаний приу частии животных уэльской породы свиней.

ЧЕБОТАР С.В.¹, ХОХЛОВ О.М.², КУРАКИНА Е.О.¹, СИВОЛАП Ю.М.¹

¹Південний біотехнологічний центр в рослинництві УААН,

Україна, 65036, Одеса, Овідіонільська дорога, 3, e-mail: schebotar@yahoo.com

² Селекційно генетичний інститут НАЦ-НАІС,

Україна, 65036, Одеса, Овідіонільська дорога, 3

АНАЛІЗ АЛЕЛЬНОГО СТАНУ ГЕНІВ *Pina-D1* і *Pinb-D1* В ГЕНОТИПАХ УКРАЇНСЬКИХ СОРТІВ ПШЕНИЦІ

На основі текстури ендосперму сорти ботанічного виду м'якої пшениці розподіляються на дві великі групи – твердозерні (hard) та м'якозерні (soft). Твердозерна м'яка пшениця використовується в хлібопекарній промисловості. При помолі зерна твердозерної пшениці отримують „free-flowing” борошно, яке при замісі тіста добре утримує воду. Ця здатність досить важлива у хлібопекарному процесі, оскільки білки ендосперму, набираючи вологу, формують в'язко-еластичну масу – клейковину, яка в ході бродіння та випічки утримує гази в тісті, чим дає змогу хлібу підійматися [1]. Борошно з м'якозерних сортів м'якої пшениці менше поглинає воду, завдяки цьому більше підходить для виготовлення печива та бісквітів.

На сьогодні відомо, що фенотипічна різниця твердозерність / м'якозерність, контролюється декількома генами, які близько зчеплені та локалізовані на короткому плечі хромосоми 5D [2, 3], у так званому *Ha* (*Hardness*) локусі. У цьому локусі локалізовані гени, що кодуєть три поліпептиди, з яких, як вважають, складається білок фріабілін: пуруіндоліни *a* (*Pina*) і *b* (*Pinb*) з вираженою здатністю пов'язуватися із ліпідами, та, в меншій пропорції, *Grain Softnes Protein* (*Gsp1*) [4, 5].

Білок фріабілін розміром близько 15кДа [6] локалізується на поверхні крохмальних гранул у пшениць з м'якою текстурою ендосперму та відсутній у твердозерних м'яких пшениць і сортів твердої пшениці (*Triticum durum* L.). Пуруіндоліни *a* і *b* взаємодіють як гетеродимери [7] та пов'язують гранули крохмалю з мембранними ліпідами амілопластів. Ці поліпептиди є представниками специфічної групи низькомолекулярних протеїнів злаків, багатих на цистеїн та триптофан. Їх назва походить з термінів “*rugos*”, який означає зерно на грецькій мові та “*indolin*”, який вказує на хімічну номенклатуру індолінових продуктів, що утворюються триптофаном.

Пуруіндолінові протеїни показують між собою 71% гомології, а в порівнянні з *Gsp* вона сягає 57-58% [8].

Дослідження мутацій [9,10], а також роботи по створенню трансгенної пшениці [11] свідчать, що за різницю у текстурі зерна відповідають пуруіндолінові гени. На противагу цьому, варіація доз *Gsp1* генів не показала впливу на твердість зерна [10].

Огляд світових літературних джерел [7, 10, 12, 13, 14, 15] свідчить про можливість ефективного використання молекулярних маркерів для диференціювання алельного стану генів *Pina-D1* та *Pinb-D1* пуруіндолінів *a* і *b*.

Згідно з останніми літературними даними, градація ознаки твердозерності зерна пшениці в значній мірі зумовлена різноманітними сполученнями алелів пуруіндолінових генів *Pina-D1* та *Pinb-D1*.

Дикий тип м'яких пшениць має м'яку текстуру ендосперму, це пов'язано з алелями пуруіндолінових генів - *Pina-D1a* та *Pinb-D1a*.

У твердозерних пшениць *Triticum aestivum* L. перший або другий пуруіндоліновий ген, або продукти цих генів атрофовані не функціональною мутацією. Перша виявлена мутація, що впливає на твердозерність, була описана як така, що призводить до заміни гліцина на серин в позиції 46 пуруіндолінового протеїну *b* (*pinb-D1b*, [12]. З того часу було описано декілька алельних станів для пуруіндолінових генів (табл. 1).

Таблиця 1

Алельні стани пуруіндолінових генів

Алелі <i>Pina-D1</i>	Алелі <i>Pinb-D1</i>	Зміни на молекулярному рівні	Фенотип	Літературне джерело
<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1a</i>	-	М'якозерність, дикий тип	[12]
<i>Pina-D1b</i>	<i>Pinb-D1a</i>	-	Твердозерність, <i>pin-a</i> null	[7]
<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1b</i>	Gly-46 на Ser-46	Твердозерність	[12]
<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1c</i>	Leu-60 на Pro-60	Твердозерність	[13]
<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1d</i>	Trp-44 на Arg-44	Твердозерність	[13]
<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1e</i>	Trp-39 на стоп кодон	Твердозерність, <i>pin-b</i> null	[15]
<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1f</i>	Trp-44 на стоп кодон	Твердозерність, <i>pin-b</i> null	[15]
<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1g</i>	Cys-56 на стоп кодон	Твердозерність, <i>pin-b</i> null	[15]
<i>Pina-D1b</i>	<i>Pinb-D1h(t)</i>	Делеція дистальної ділянки 5DS	Твердозерність, <i>pin-a</i> и <i>pin-b</i> null	[16]
<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1i(t)</i>	Зсув рамки зчитування	Твердозерність, <i>pin-b</i> null	[16]
<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1p</i>	Зсув рамки зчитування	Твердозерність <i>pin-b</i> null	[17]
<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1q</i>		Твердозерність	[18]
<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1r</i>	Зсув рамки зчитування та передчасний стоп кодон	Твердозерність	[19]
<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1s</i>	Зсув рамки зчитування і транзиція А (205) → G	Твердозерність	[19]
<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1t</i>	Gly-47 на Arg-47	Твердозерність	[20]
<i>Pina-D1l</i>	<i>Pinb-D1a</i>	Делеція Cyt-265	Твердозерність	[20]
<i>Pina-D1m</i>	<i>Pinb-D1a</i>	Pro-35 на Ser-35	Твердозерність	[20]
<i>Pina-D1n</i>	<i>Pinb-D1a</i>	Trp-43 на стоп кодон	Твердозерність	[20]

Матеріали і методи

В роботі досліджено українські сорти озимої м'якої пшениці: Альбатрос, Вимпел, Вікторія одеська, Застава, Знахідка, Зустріч, Красуня одеська, Лада, Лелека, Леля, Лузанівка одеська, Любава, Ніконія, Обрій, Одеська 16, Одеська 51, Одеська 132, Одеська 133, Одеська 162, Одеська 265, Одеська 267, Одеська червоноколоса, Панна, Порада, Пріма, Селянка, Сирена, Струмок, Тіра, Українка одеська, Фантазія (селекції СГІ); Білоцерківська напівкарликова (ЩБ); Донецька 46 (Донецький І АПВ); Мирич,

Мирлебен, Миронівська 27, Миронівська 33, Мирхард (МНІССП); Херсонська остиста (УкрНДІЗ), а також сорти і форми, які використовуються в селекційних програмах в Україні - Безоста 1 (НДІСГ); Донська напівкарликова, Дончанка 3 (Донський СЦ).

Через жорсткий добір на хлібопекарний тип переважна більшість сортів України створених як за часів СРСР, так і в останні роки, є твердозерними. Лише два із досліджених нами сортів, обидва Миронівського селекцентру: Мирлебен (створений за програмою співробітництва з Інститутом зернових культур у Хадмерслебені, Німеччина) та Миронівська 33 є типово м'якозерними. Для вивчення було також залучено створений у СГІ та районований в Узбекистані експериментальний сорт кормової пшениці Шердор та його 2 сестринські лінії із цілеспрямовано введеними маркерними ознаками екзотичного кольору зерна: *pp* (пурпурний перикарп) та *gg* („житне” голубувато-зелене забарвлення алейрону). Сорт Шердор (лінія Б16) є твердозерним, проте через дуже низьку хлібопекарну якість помилково вважався м'якозерним сортом. Його сестринська лінія Б16 pp перейняла м'якозерний фенотип від донора маркерної ознаки. Лінія Б16 gg є типово твердозерною за фенотипом. Оскільки обидві маркерні ознаки походять від віддалених схрещувань, можна було очікувати наявності у них нетипових алелів пуроіндолінів.

Виділення ДНК проводили за стандартною методикою [21].

Для визначення алелів генів *Pina-D1* та *Pinb-D1* використовували: спрямовану ПЛР з праймерами до гену *Pina-D1* [4], які дозволяють тестувати *pina-D1a* алель, та з парами праймерів алеле-специфічними до *pinb-D1a* та до *pinb-D1b* алелів [12].

ПЛР виконували у 20 мкл реакційної суміші, яка містила 1x Hotstar буфер, 1x Hotstar Q розчин, 100 нг ДНК, 4 нмоль dNTP, по 10 пмоль прямого та зворотнього праймерів, 1 U Hotstar *Taq* полімерази (Qiagen, Hilden, Німеччина). Використовували такі умови ампліфікації: перша денатурація – 95 °C 5 хв, потім 35 циклів: 94 °C – 0,5 хв; 60 °C – 0,5хв; 72 °C – 0,75 хв; заключна елонгація -72 °C – 7 хв. Продукти ПЛР розділяли у 2% агарозному гелі, візуалізували за допомогою забарвлення бромистим етідієм за стандартною процедурою [21].

Результати та їх обговорення

ПЛР, виконана за допомогою специфічних праймерів [4], дозволила виявити продукт ампліфікації розміром 450 п.н. у всіх досліджених сортів, це свідчить про значну перевагу у розповсюдженні алелю *Pina-D1a* у генотипах українських сортів.

Продукт ампліфікації розміром 250 п.н. було отримано з праймерами, що є специфічними для виявлення нуклеотидної послідовності, яка кодує гліцин в положенні 46 білка пуроіндолина *b*, при аналізі сортів Мирлебен, Миронівська 33, форми Б16 pp . Це вказує на те, що в цих генотипах присутній алель *Pinb-D1a*. Він, як відомо, є характерним для м'якозерних сортів, тоді як у твердозерних ген *Pinb* має мутацію, яка призводить до заміни гліцину в положенні 46 білка *pin-b* на серин 46.

Для більшості досліджених сортів ампліфікація з праймерами, специфічними для нуклеотидної послідовності, що кодує серин в положенні 46 білка *pin-b*, визначила у наших дослідженнях відповідний специфічний продукт ампліфікації розміром 250 п.н. Це свідчить, що вказані сорти мають алель *Pinb-D1b*.

Заміна гліцина-46 на серин-46 (*Pinb-D1b*) є найбільш розповсюдженою мутацією, яка зумовлює твердозерність м'якої пшениці. При дослідженні північноамериканських пшениць Морісом з співавторами [15] показано, що дана мутація присутня майже у всіх м'яких озимих (*T. aestivum* L.) твердозерних пшениць за виключенням декількох сортів. Ця мутація також присутня у більшості твердозерних ярих пшениць, хоча вони мають і багато інших алелів. За даними [13] по твердозерним пшеницям, які були представлені якими пшеницями Північної та Східної Європи, з 166 генотипів 100 мали точкову мутацію, яка змінює гліцин-46 на серин-46. З 24 досліджених Британських сортів 20 мали цю мутацію. У більшості ж м'якозерних сортів в положенні 46 присутній гліцин.

Таким чином, за допомогою молекулярних маркерів до генів пуринодолінів *a* і *b*, що контролюють якісний показник зерна м'якої пшениці – твердозерність, здійснено визначення алелів генів *Pina-D1* та *Pinb-D1* в генотипах українських сортів, створених селекційними установами різних кліматичних зон. Досліджено також три російські сорти, що мали свого часу широке розповсюдження в Україні. За результатами аналізу два сорти: Миронівська 33 і Мирлебен та лінія Б16pp показали алельний склад пуринодолінів, найбільш розповсюджений у світі серед м'язозерних сортів (*Pina-D1a*; *Pinb-D1a*). Це знаходиться у повній відповідності з їх фенотипом (Хохлов, неопубліковані данні). Решта сортів за складом пуринодолінів повністю належить до також найбільш розповсюдженого у світі типу – але вже серед твердозерних сортів, тобто має алелі - *Pina-D1a*; *Pinb-D1b*.

Хоча для повної характеристики алельного різноманіття у локусах *Pina-D1a* та *Pinb-D1b* необхідно використовувати значну кількість молекулярних маркерів, проста система ПЛР-праймерів, до найбільш розповсюджених алелів генів пуринодолінових білків дозволяє диференціювати на типи hard/ soft більшу частину вітчизняних сортів. Нами не виявлено регіональної або будь-якої іншої специфіки серед досліджених сортів, що втім не виключає можливості детекції екзотичних алелів при більш широких обстеженнях.

Висновки

1. Встановлена алель на характеристика генів *Pina -D1* та *Pinb- D1* для 45 сортів та форм м'якої пшениці, переважно української селекції.
2. Сорти Миронівська 33 і Мирлебен та лінія Б16 pp показали алельний склад пуринодолінів, найбільш розповсюджений у світі серед м'язозерних сортів (*Pina-D1a*; *Pinb-D1a*).
3. 93 % досліджених сортів мали алельний склад пуринодолінів *Pina-D1a*; *Pinb-D1b*, тобто характеризувались як твердозерні сорти *Triticum aestivum* L.

Література

1. Хохлов О.М. Генетично обумовлена твердість зерна м'якої пшениці (*T. aestivum* L.): стан і перспективи досліджень в Україні // Зб. наук. праць СГІ НАЦ НАІС. – Одеса, 2002. – Вип. 2(42).- С.9-29.
2. Mattern P.J., Morris R., Schmidt J.W., Johnson V.A. Location of genes for kernel properties in the wheat cultivar Cheyenne using chromosome substitution lines. Proc 4th Int Wheat Genet. Symp, University of Missouri, Columbia, Mo.- 1973.- pp 703-707
3. Law C.N., Young C.F., Brown J.W.S., et al. The study of grain protein control in wheat using whole chromosome substitutional lines. In: Seed protein improvement by nuclear techniques. International Atomic Energy Agency. Vienna, Austria.-1978 – pp 483-502.
4. Gautier M.F., Aleman M.E., Guirao A., Marion D., Joudrier P. *Triticum aestivum* puroindolines, 2 basic cysteine-rich seed proteins-cDNA sequence-analysis and development gene-expression// Plant Molecular biology.- 1994.- 25(1):43-57.
5. Rahman S., Jolly J.C., Skeritt J.H., Walloscheck A. Cloning of a wheat 15-kDa grain softness protein (GSP). GSP is a mixture of puroindoline-like polypeptides // Eur J Biochem – 1994. – 223:917-925.
6. Greenwell P., Schofield J.D. A starch granule protein associated with endosperm softness in wheat // Cereal Chem – 1986. - 63:379-380.
7. Giroux M.J., Morris C.F. A glycine to serine change in puroindoline b is associated with wheat grain hardness and low level of starch-surface friablin// Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America 1998, 95:6262-6266.
8. Chantret N., A.Cenci, F.Sabot, et al. Sequencing of the *Triticum monococcum* Hardness locus reveals good microcolinearity with rice// Mol Gen Genomics – 2004. – 271:377–386.

9. *Morris C.F.* Puroindolines: the molecular genetic basis of wheat grain hardness// *Plant Mol. Biol.* - 2002. - 48:633-647
10. *Tranquilli G., Heaton J., Chicaiza O., et al.* Substitutions and deletions of genes related to grain hardness in wheat and their effect on grain texture// *Crop. Sci* -2002. - 42: 812-1817
11. *Beecher B., Bettge A., Smidansky E., Giroux J.* Expression of wild-type *pinB* sequence in transgenic wheat complements a hard phenotype// *Theor Appl Genet* - 2002. - 105: 870-877
12. *Giroux M.J., Morris C.F.* A glycine to serine change in puroindoline b is associated with wheat grain hardness and low level of starch-surface friablin// *Theor Appl Genet* – 1997 – 95 : 857-864
13. *Lillemo M., Morris C.F.* A leucine to proline mutation in puroindoline B is frequently present in hard wheats from Northern Europe// *Theor Appl Genet*, 2000, 100: 1100-1107.
14. *Martin J.M., Frohberg R.C., Morris C.F., et al.* Milling and bread baking traits associated with puroindolin sequence type in hard red spring wheat// *Crop Sci* – 2000.- 41 : 228-234
15. *Morris C.F., Lillemo M., Simeone M.C., et al.* Prevalence of puroindoline grain hardness genotypes among historically significant North American spring and winter wheats// *Crop Science* 2001, 41(1):218-228.
16. *Ikeda T.M., Ohnishi N., Nagamine T. et al.* Identification of new puroindoline genotypes and their protein products among wheat cultivars// *J. Cereal Sci.* – 2005. -41 : 1-6.
17. *Xia L.Q., Chen F., He Z.F., et al.* Occurrence of puroindoline alleles in Chinese winter wheats// *Cereal Chem.*- 2005.- 82: 38- 43.
18. *Chen F., He Z.H., Xia X.C. et al.* A new puroindoline b mutation present in Chinese winter wheat cultivar Jingdong 11//*J. Cereal Sci.*- 2005.- 42:267-269
19. *Ram S., Jain N., Shoran J., Singh R.* New frame shift mutation in puroindoline b in Indian wheat cultivars Hyb65 and NI5439// *J Plant Biochem Biotech.*- 2005.-14 : 45-48.
20. *Chen F., He Z.H., Xia X.C. et al.* Molecular and biochemical characterization of puroindoline a and B alleles in Chinese Landraces and historical cultivars// *Theor Appl Genet.*- 2006.- 112: 400-409.
21. Использование ПЦР-анализа в генетико-селекционных исследованиях (научное руководство) под ред. Ю.М. Сиволап Киев: Аграрная наука - 1998. – 156 с.

Резюме

Аналізували алельне состояние генів *Pina-D1* і *Pinb-D1* пуринодолинов *a* і *b*, які контролюють один із важливих показателів якості зерна – твердозерність, у 45 сортів і форм м'якої пшениці (*Triticum aestivum* L.), переважно української селекції. Показали, що 93% сортів мають алельний склад *Pina-D1a* і *Pinb-D1b* і являються твердозерними сортами.

Визначали алельний стан генів *Pina-D1* та *Pinb-D1* пуринодолинів *a* і *b*, які контролюють один із важливих якісних показників зерна – твердозерність, у 45 сортів та форм м'якої пшениці (*Triticum aestivum* L.), переважно української селекції. Встановлено, що 93 % досліджених сортів мали алелі *Pina-D1a* і *Pinb-D1b*, тобто характеризувались як твердозерні сорти.

The aim of work was to investigate alleles of puroindoline *a* and *b* genes *Pina-D1* and *Pinb-D1*, that are coding one of the most important trait – grain hardness (“hard” or “soft” kernel texture) among the 45 bread wheat varieties and lines (*Triticum aestivum* L.), that have been developed mainly in Ukraine. There have been revealed alleles *Pina-D1a* and *Pinb-D1b* for 93 % of varieties which have been identified as hard wheat varieties.

ШАРИПНА Я.Ю.¹, ПОПОВ В.М.², КИРИЧЕНКО В.В.¹

¹Інститут рослинництва ім. В.Я. Юр'єва

Україна, 61060, Харків, пр. Московський, 142, e-mail: myu77@mail.ru

²Харківський національний аграрний університет ім. В.В. Докучаєва

Україна, 62483, Харківська обл., Харківський р-н, п/в «Комуніст-1», e-mail: vnpop@mail.ru

ОСОБЛИВОСТІ МІНЛИВОСТІ ЯКІСНИХ ТА КІЛЬКІСНИХ ОЗНАК В ПОКОЛІННЯХ F₂ СОНЯШНИКУ (*HELIANTHUS ANNUUS* L.)

На сучасному етапі розвитку генетики та селекції с.-г. рослин звичайною практикою стало широке використання різних типів маркерів. Як маркери використовують морфологічні ознаки [1], білки [2] та різні типи ДНК послідовностей [3], за допомогою яких можна визначати унікальність сорту або гібридів та оцінювати ступінь спорідненості вивчаємого зразка з базою даних по сортах, а також встановлювати зв'язок між генами маркерами та генами господарсько-цінних ознак. Наявність сумісної мінливості якісних та кількісних ознак дозволяє проводити направлений добір цінних генотипів і тим самим оптимізувати складний селекційний процес, особливо у таких важливих перехреснозапильних культур як соняшник.

В останні часи в генетиці соняшнику значна увага приділяється молекулярному аналізу його геному з метою встановлення груп зчеплення [4, 5]. Але інформація щодо використання морфологічних ознак як маркерів у соняшнику обмежена. Тому метою нашої роботи було вивчення сумісного прояву ознак соняшнику, що мають дискретну та неперервну мінливість.

Матеріали і методи

В якості рослинного матеріалу були взяті інбредні лінії соняшнику мутантного походження, контрастні за якісними та кількісними ознаками. Використовували наступні лінії Інституту рослинництва ім. В.Я. Юр'єва: Мх 1829 В, Мх 1823 В, Мх 1008 В, Мх 42 Б, Мх 845 Б, Мх 522 Б. Вивчали якісні ознаки: забарвлення крайових квіток (ЗКК), гіллястість, здатність до відновлення фертильності пилку та кількісні ознаки: висота рослин, діаметр кошика, довжина та ширина листової пластинки та тривалість періоду „сходи – цвітіння”.

Гібриди першого покоління отримували на фертильній основі шляхом примусового вилучення пиляків в ранкові часи з подальшим запиленням пилком батьківської форми. Гібриди другого покоління одержували примусовим самозапиленням F₁ під пергаментними ізоляторами. Всього отримали 4 комбінації схрещування: Мх 1829 В × Мх 42 Б, Мх 1823 В × Мх 42 Б, Мх 1008 В × Мх 845 Б, Мх 1008 В × Мх 522 Б.

Інбредні лінії соняшнику, F₁, отриманого від їх схрещування, та F₂ вивчали протягом двох років (2005-2006 рр.). Кількість рослин по кожному зразку інбредних ліній та F₁ становила не менше 25 рослин, а для F₂ було проаналізовано не менше 100 рослин.

Отримані дані статистично обробляли з використанням варіаційної статистики, а за допомогою критерію Ст'юдента визначали значущість параметрів [6].

Результати та обговорення

Для вивчення сумісного успадкування якісних та кількісних ознак соняшнику формували групи рослин в F₂ у відповідності до градацій морфологічних ознак з моногенним контролем. За якісними ознаками були виділені наступні групи: рослини з жовтим та іншим забарвленням крайових квіток (абрикосове, лимонне та оранжеве); стерильні та фертильні рослини; однокошикові та гіллясті. Достовірна різниця між груповими середніми кількісних ознак дозволила нам зробити висновок щодо сумісного успадкування їх з якісними ознаками.

У попередній роботі [7] нами було показано, що при схрещуванні ліній з жовтим та іншими типами ЗКК (гібридні комбінації були такі ж самі, що наведені в матеріалах та методах) в F_2 мало місце розщеплення у співвідношенні 3:1, тобто ця ознака контролюється одним геном. За іншими якісними ознаками також відбувалося розщеплення 3:1.

У схрещування були залучені інбредні лінії соняшнику, які мали 4 типи ЗКК. Лінії з жовтою градацією ознаки (Мх 42 Б, Мх 1008 Б) схрещували з лініями, які мали лимонне (Мх 1823 В, Мх 845 Б), абрикосове (Мх 1829 В) та оранжеве (Мх 522 Б) забарвлення квіток. Аналіз середніх значень кількісних ознак в групі рослин F_2 з жовтим та іншими градаціями забарвлення квіток показав, що достовірна різниця за два роки вивчення була встановлена тільки за параметрами листової пластинки між групами рослин з абрикосовим (15,97±0,38 – 2005 р. та 17,01±0,28 – 2006 р.) та жовтим (15,48±0,47 – 2005 р. та 16,86±0,22 – 2006 р.) ЗКК (Мх 1829 В × Мх 42 Б). Різниця середніх значень за висотою рослин та діаметром кошика між групами рослин з жовтим забарвленням квіток (87,33±0,92 та 14,75±0,4 відповідно) та абрикосовим (82,57±1,76 та 11,86±0,61 відповідно) була також достовірною, але така тенденція спостерігалася тільки у 2006 році. Як демонструють представлені критерії достовірності, групи рослин з іншими варіантами забарвлення язичкових квіток (лимонні та оранжеві порівняно з жовтими) не відрізнялися суттєвою відмінністю за кількісними ознаками. Наприклад, у гібридній комбінації F_2 (Мх 1823 В × Мх 42 Б) виділена група рослин з лимонним ЗКК достовірно відрізнялася від рослин з жовтим ЗКК лише за тривалістю періоду сходи-цвітіння у 2005 р. Схожі дані були отримані при аналізі покоління F_2 , отриманого від схрещування ліній з жовтим та оранжевим забарвленням квіток (Мх 1008 В × Мх 522 Б). Достовірна різниця середніх значень була виявлена тільки за діаметром кошика між групами рослин, які характеризуються різними градаціями ЗКК (15,69±0,39 – група рослин з жовтим ЗКК та 14,24±0,53 – група рослин з оранжевим ЗКК). Отримані нами результати узгоджуються з даними роботи [8].

Результати порівняння середніх значень кількісних ознак між групами стерильних та фертильних рослин F_2 відрізнялися залежно від розглянутої комбінації. Так, у гібридній комбінації Мх 1823 В × Мх 42 Б дві групи рослин F_2 , які сформовані відповідно за градаціями цієї ознаки, майже за всіма кількісними ознаками достовірно відрізнялися. В інших поколіннях F_2 достовірну різницю між груповими середніми було виявлено лише для окремих ознак, наприклад, для комбінації Мх 1008 В × Мх 845 Б – ширина листової пластинки (15,85±0,75 - стерильні та 17,75±0,29 - фертильні), а для Мх 1829 В × Мх 42 Б – висота рослин (124,33±1,01 та 121,06±0,78 відповідно група стерильних та фертильних рослин).

При розгляданні гібридних комбінацій за маркерною ознакою “розгалуження” було з’ясовано, що в F_2 група однокошикових рослин значно перевищувала за розміром кошиків групу гіллястих рослин. Ця різниця виявилася статистично достовірною для всіх гібридних комбінацій соняшнику. Щодо інших ознак, то отримані дані продемонстрували в трьох комбінаціях достовірну різницю між груповими середніми за довжиною листової пластинки, а в двох – за ознакою „ширина листової пластинки”. Водночас, у комбінації Мх 1008 В × Мх 522 Б не виявлено достовірної різниці між середніми значеннями за цими ознаками. В комбінації Мх 1823 В × Мх 42 Б за ознакою „висота рослин” достовірну різницю між груповими середніми відзначено в обидва роки. Наприклад, середні значення цієї ознаки у 2005 році становили 122,7±0,7 та 118,48±1,42 у групах однокошикових та розгалужених рослин, відповідно, а у 2006 році – 100,05±0,9 та 91,71±1,15. В інших комбінаціях схрещування статистично значущу різницю було відзначено тільки в один рік.

Висновки

Таким чином, аналіз поколінь F_2 соняшнику в чотирьох комбінаціях схрещування показав неоднакові ефекти щодо мінливості ознак, які мають альтернативний та неперервний прояв у фенотипі. Характер прояву кількісних ознак у сформованих групах рослин за якісними морфологічними ознаками, можливо, пов'язаний з різними генами, які вносять найбільший вклад у мінливість певної кількісної ознаки. Різноманітні фенотипові ефекти у різні роки вивчення можуть бути пов'язані з модифікаційною мінливістю, що ускладнює проведення аналізу.

Література

1. Гаврилова В.А., Анисимова И.Н. Генетика культурных растений. Подсолнечник. - СПб.: ВИР, 2003. – 209 с.
2. Анисимова И.Н. Идентификация сортов, линий и гибридов подсолнечника по составу гелиантинина / Труды по прикладной бот. ген. и сел. – 1987. - Т.114. - С.114-125.
3. Анисимова И.Н. Молекулярные маркеры в исследованиях генетического разнообразия подсолнечника / Идентифицированный генофонд растений и селекция. – С.-Петербург. – 2005. – С. 250-272.
4. Gentzbittel L., Mestries E., Mouzeyrat F., Badaoui S. and et al. A composite map of expressed sequences and phenotypic traits of the sunflower (*Helianthus annuus* L.) genome // Theor. and Appl. Genet. – 1999. – V. 99. – P. 218-234.
5. Chen, J., Hu, J., Vick, B.A., Jan C.C. Molecular mapping of a nuclear male-sterility gene in sunflower (*Helianthus annuus* L.) using TRAP and SSR markers // Theor. and Appl. Genet. – 2006. – V. 113. – P. 122-127.
6. Плохинский Н. А. Биометрия. - М.: Изд-во МГУ, 1970. – 367 с.
7. Шарипіна Я.Ю., Попов В.М., Кириченко В.В. Вивчення колекції мутантних ліній соняшнику з метою їх практичного використання // Генетичні ресурси рослин. – 2007., №4 – С. 44-50.
8. Барнашова Е.К., Лобачев Ю.В., Лекарев В.М., Константинова Е.А. Влияние окраски язычковых цветков на хозяйственно – биологические признаки подсолнечника / Материалы конференции Вавиловские чтения – Саратов, 2006. – С. 3-5.

Резюме

В работе изучено проявление количественных признаков подсолнечника в зависимости от определенного варианта качественного признака. Показано, что в поколениях F_2 выявляется неодинаковый эффект совместного наследования качественных и количественных признаков подсолнечника.

В роботі вивчено прояв кількісних ознак соняшнику залежно від певного варіанту якісної ознаки. Показано, що у поколіннях F_2 виявляється неоднаковий ефект сумісного успадкування якісних та кількісних ознак соняшнику.

The manifestation of quantitative traits of sunflower was studied depending upon the gradation of qualitative traits. It has been shown that differ effects of combined inheritance of sunflower qualitative and quantitative traits are revealed in the F_2 generations.

ШЕСТОПАЛ О.Л., МАХНОВСЬКА М.Л., ІГНАТОВА С.О.

Південний біотехнологічний центр в рослинництві УААН,

Україна, 65036, м. Одеса, Овідіопольська дор., 3, e-mail: oksana_shestopal@mail.ru

ОСОБЛИВОСТІ УСПАДКУВАННЯ ОЗНАК ДИКОГО ЯЧМЕНЮ У ГІБРИДІВ *HORDEUM VULGARE X HORDEUM SPONTANEUM*

В селекції ячменю особливої актуальності набуває необхідність розширення його генофонду. Одним із перспективних шляхів у вирішенні цієї проблеми є віддалена

гібридизація. В зв'язку з цим зусилля багатьох дослідників спрямовані на розробку методів передачі чужорідного генетичного матеріалу в геном культурних злаків. Для ячменю в якості донорів привертають увагу посухо-, жаростійкі та стійкі до грибних хвороб дикорослі форми *Hordeum spontaneum* С. Koch [1-3]. Серед інших дикунів *H. spontaneum* вирізняється найбільш довгою зернівкою і верхнім міжвузлям, довжина якого корелює з рівнем посухостійкості у злаків [4]. Екологічна стабільність довжини зернівки, за літературними даними, дозволяє селекціонерам використовувати цей показник в процесі добору на продуктивність [5-8]. В зв'язку із зазначеним, метою наших досліджень було вивчення характеру успадкування ознак *H. spontaneum* при гібридизації його з генотипами культурного ячменю. Вивчали характер успадкування довжини зернівки і верхнього міжвузля у віддалених гібридах F₁, F₂. Для гомозиготації отриманих гібридних популяцій вивчали здатність останніх до андрогенезу *in vitro*.

Матеріал і методи

Дослідження проводились на 8 віддалених гібридах F₁ і F₂, створених шляхом схрещування ячменю (подвоєних гаплоїдів ДГ-2, ДГ-3, сорту Трудівник та гібриду F₁ Од.100 x Вакула) і дикорослого ячменю *H. spontaneum* IS 26-2; *H. spontaneum* 26-35; *H. spontaneum* T13 (Neva usar); *H. spontaneum* 11-13). Матеріал вирощували в неконтрольованих умовах штучного клімату та в полі. Для одержання гаплоїдів із гібридних популяцій і *H. spontaneum* застосовували метод культури ізольованих пиляків. Холодову обробку пагонів, зрізаних в стадії одноядерної вакуолізованої мікроспори, проводили у водному розчині 2,4-Д (10 мг/л) і бензimidазолу (20 мг/л). В якості індукційного середовища використовували живильне середовище, модифіковане О.В. Белінською (2001 рік). Регенеранти отримували на безгормональному середовищі MS. Всі отримані регенеранти пересаджували в ґрунт і вирощували в неконтрольованих умовах штучного клімату.

Результати і обговорення

Аналіз отриманих результатів показав, що за довжиною зернівки вихідні батьківські форми ячменю та віддалені гібриди F₁, отримані в неконтрольованих умовах штучного клімату, суттєво відрізнялись (рис. 1).

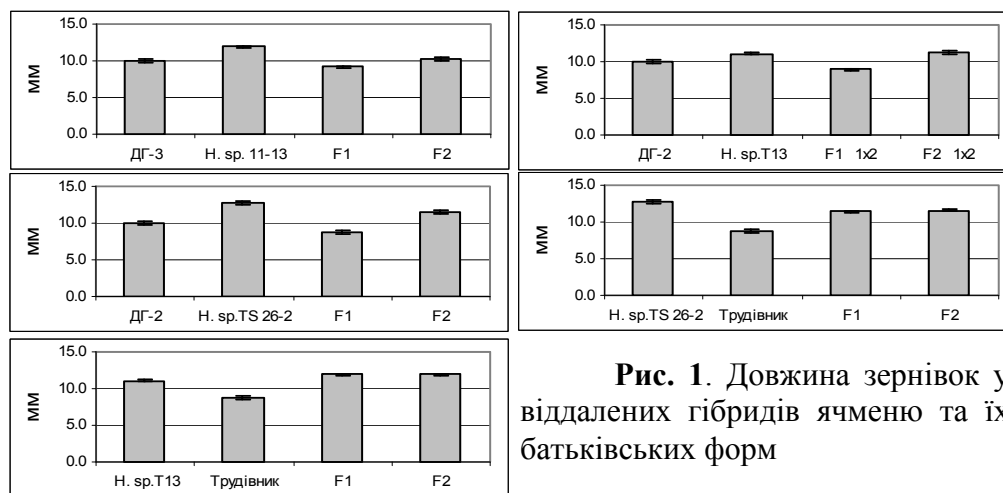


Рис. 1. Довжина зернівок у віддалених гібридів ячменю та їх батьківських форм

Довжина зернівки культурного ячменю складала від 8,7 до 10,0 мм в залежності від генотипу. Для дикорослих форм *Hordeum spontaneum* цей показник був значно вищим і коливався у межах 11,1 – 12,8 мм. В гібридах F₁ спостерігали домінування довжини зернівки материнської форми. Так, довжина зернівки у комбінацій схрещування *H. spontaneum* x *H. vulgare* досягала 11,4-11,9 мм, тоді як у гібридів комбінацій *H. vulgare* x *H. spontaneum* – всього 8,8-9,2 мм. Проте довжина зернівки F₂ в комбінаціях *H. vulgare* x *H. spontaneum* значно перевищувала довжину зернівки F₁ (на 2,3-4 мм). У гібридів F₂ комбінацій *H. spontaneum* x *H. vulgare* цей показник залишався високим - на рівні зернівок F₁.

Середні значення довжини верхнього міжвузля для вихідних рослин *H. spontaneum* складали в залежності від генотипу 25,9-29,2 см. Для досліджених сортів культурного ячменю цей показник був дуже низьким (5,9-6,8 см). У гібридних рослин F_1 в залежності від комбінації схрещування середні значення довжини міжвузля коливались від 13,5 до 17,1 см. Успадковування носило проміжний характер. В результаті вивчення рівня фенотипового виявлення довжини зернівки в неконтрольованих умовах штучного клімату та в полі посушливого 2007 року встановлено, що умови вирощування рослин не впливають на показник довжини зернівки у досліджених віддалених гібридів *H. vulgare* x *H. spontaneum* та вихідних форм культурного ячменю (табл. 1).

Таблиця 1

Вплив умов вирощування на довжину зернівки та верхнього міжвузля у віддалених гібридів ячменю і їх батьківських форм

Генотип	Довжина зернівки, мм			Довжина міжвузля, см	
	теплиця		поле	теплиця	поле
	F_1	F_2	F_2	F_1	F_1
(Од.100 x Вакула) x <i>H. spontaneum</i> IS 26-2	9,1	12,8	12,6	15,4	18,4
ДГ-2 x <i>H. spontaneum</i> IS 26-2	8,8	12,8	12,5	15,6	19,9
ДГ-2 x <i>H. spontaneum</i> T13 (Neva ycar)	8,9	11,2	11,8	13,5	21,8
ДГ-3 x <i>H. spontaneum</i> 11-13	9,2	11,9	12,3	14,8	20,3
ДГ-2	10,0		9,8	5,9	10,3
ДГ-3	10,0		10,4	6,8	13,8
<i>H. spontaneum</i> IS 26-2	12,8		12,9	29,0	19,1
<i>H. spontaneum</i> T13 (Neva ycar)	11,1		12,9	29,8	19,5
<i>H. spontaneum</i> 11-13	11,9		13,2	25,9	18,8

Однак, для дикорослої форми ячменю *H. spontaneum* цей показник виявився неоднозначним. В польових умовах вирощування довжина зернівок була вищою. Довжина верхнього міжвузля у гібридів F_1 і, особливо у вихідних генотипів культурного ячменю, була також вищою за цих умов вирощування. Генотипи *H. spontaneum* за цим показником, навпаки, були значно кращими в штучних умовах (табл. 1). На відміну від теплиці в польових умовах успадковування довжини верхнього міжвузля мало домінуючий характер. Таким чином, на відміну від довжини зернівки, характер успадковування довжини міжвузля залежав від умов вирощування.

В третьому поколінні довжина зернівок у рослин віддалених гібридів, які вирощувались в полі, успадковувалась за проміжним типом і в середньому для кожної із дослідних популяцій цей показник був помітно вищим порівняно з вихідними генотипами культурного ячменю (табл. 2). Слід зазначити, що значна частина гібридних зерен F_3 за довжиною наближалась до рівня вихідної дикорослої форми *H. spontaneum*. Особливо чітко це проявилось в популяції від схрещування ДГ-2 x *H. spontaneum* 26-35. Аналіз гібридів F_2 показав (табл. 2), що в половини комбінацій схрещування біля 11 % рослин мали вже неламкий колос і ості без зазубрин, як у культурного ячменю. Довжина верхнього міжвузля у рослин F_2 успадковувалась також за проміжним типом. Широкі межі варіювання ознак, що вивчались в середині кожної гібридної популяції, вказують на можливість добору кращих форм.

Таблиця 2

Характеристика віддалених гібридів *H. vulgare* x *H. spontaneum*

Генотип	Зернівки F_3				Верхнє міжвузля F_2			
	n	\bar{X} , мм	$S_{\bar{X}}$	min-max	n	\bar{X} , мм	$S_{\bar{X}}$	min-max
ДГ-2 x <i>H. spontaneum</i> IS 26-2	224	11,4	0,18	10,0-14,0	20	14,2	0,91	8,5-18,4
ДГ-2 x <i>H. spontaneum</i> 26-35	250	12,2	0,32	10,0-15,0	22	16,9	1,03	13,4-25,2

ДГ-3 x <i>H. spontaneum</i> IS 26-2	150	11,9	0,47	9,6-14,0	18	17,5	1,49	12,2-24,2
ДГ-2	60	9,8	0,20	9,0-11,5	20	10,3	0,57	10,2-14,7
ДГ-3	60	10,1	0,08	9,5-11,0	20	13,8	0,79	11,0-16,5
<i>H. spontaneum</i> IS 26-2	60	14,8	0,15	12,2-16,0	20	20,5	1,46	16,2-25,0
<i>H. spontaneum</i> 26-35	60	14,8	0,16	13,0-16,0	20	22,3	1,52	15,7-30,2

Відомо [4], що довжина зернівки і верхнього міжвузля є ознаками з високим рівнем успадковування і чим далі відстоять середні значення ознак у батьківських форм, тим вище успадковування цієї ознаки. Враховуючи сказане і опираючись на перші результати наших досліджень, можна сподіватись на одержання шляхом віддаленої гібридизації нових крупнозерних та посухостійких (з довгим верхнім міжвузлям) вихідних для селекції форм ячменю.

Одним із важливіших напрямків в наших дослідженнях було тестування віддалених гібридів *H. vulgare* x *H. spontaneum* за здатністю до утворення гаплоїдів в культурі пиляків. Слід зауважити, що в зв'язку з незадовільним станом розвитку рослин в полі внаслідок посухи, до експерименту залучалась мінімальна кількість пиляків від усіх 8 гібридів F₁ і F₂. Аналіз отриманих результатів показав, що усі гібридні популяції виявились чутливими до умов культивування ізольованих пиляків *in vitro*, формуючи новоутворення, які регенерували зелені рослини. Встановлено, що рівень індукції новоутворень був вищим для гібридів F₂ і залежав від комбінації схрещувань (табл. 3).

Таблиця 3

Характеристика гаплопродукції віддалених гібридів *H. vulgare* x *H. spontaneum*

Гібридна комбінація	Висаджено пиляків, шт.	Новоутворення		Зелені регенеранти	
		шт.	%	шт.	%
ДГ-2 x <i>H. spontaneum</i> IS 26-2 (F ₁)	300	16	5,3 ± 1,3	1	6,2 ± 1,4
ДГ-2 x <i>H. spontaneum</i> IS 26-2 (F ₂)	350	62	17,7 ± 2,0	9	14,5 ± 1,9
(Од.100 x Вакула) x <i>H. spontaneum</i> IS 26-2 (F ₁)	300	21	7,0 ± 1,5	4	19,0 ± 2,3
(Од.100 x Вакула) x <i>H. spontaneum</i> IS 26-2 (F ₂)	400	43	10,7 ± 1,5	4	9,3 ± 1,5
ДГ-2 x <i>H. spontaneum</i> T13 (Neva usar) (F ₁)	200	13	6,5 ± 1,7	8	61,5 ± 3,4
ДГ-3 x <i>H. spontaneum</i> 11-13 (F ₁)	300	5	1,7 ± 0,7	1	20,0 ± 2,3
ДГ-3 x <i>H. spontaneum</i> IS 26-2 (F ₂)	150	3	2,0 ± 1,1	1	33,3 ± 3,8
ДГ-2 x <i>H. spontaneum</i> 26-35 (F ₂)	500	44	8,8 ± 1,6	2	4,5 ± 0,9

Рівень регенерації зелених рослин також в значній мірі залежав від генотипу вихідного матеріалу. За цим показником, розрахованим відносно кількості висаджених пиляків, виділились дві кращі комбінації: ДГ-2 x *H. spontaneum* IS 26-2 та ДГ-2 x *H. spontaneum* T13 (Neva usar). Той факт, що від кожної із гібридних комбінацій, не зважаючи на незначну кількість вихідного матеріалу, вдалось отримати гаплоїди свідчить про реальну можливість гомозиготації селекційного матеріалу з віддалених схрещувань ярого ячменю з джерелом стійкості до хвороб та посухи *Hordeum spontaneum*.

Висновки

1) на довжину зернівки гібридів F₁, отриманих від схрещування культурного ячменю з *Hordeum spontaneum*, домінуючий вплив чинить материнська форма; 2) довжина зернівки гібридів *H. vulgare* x *H. spontaneum* в F₂ і F₃ успадковувалась за проміжним типом; 3) характер успадкування довжини верхнього міжвузля віддалених гібридів F₁ залежав від умов вирощування рослин; 4) віддалені гібриди *H. vulgare* x *H. spontaneum* F₁ і F₂ здатні до утворення гаплоїдів в культурі пиляків.

Література

1. Трофимовская А.Я., Кобылянский В.Д. Иммуность диких видов рода *Hordeum* к грибным заболеваниям // Сб. трудов ВИРА. – 1964. – вып. 1. – С. 78-81.

2. Манзюк В.Т., Лукьяненко Н.М. Скрещивание диких ячменей с культурными // Вопросы генетики, селекции, семеноводства, семеноведения. Тр. Украинского научно-исследовательского ин-та растениеводства, селекции и генетики им. Юрьева. – 1971. – Т. 10, № 10-11. – С. 168-173.
3. Турусбеков Е.К., Абуғалиева С.И. Изучение степени и структуры генетической изменчивости популяции дикого ячменя *Hordeum spontaneum* // Генбанк растений и его использование в селекции (Матер. Междунар. совещания). – 1995. – С. 78-80.
4. Жундыбаев К.К., Сариев Б.С. Наследование и наследуемость количественных признаков у межсортовых гибридов ячменя // Повышение эффективности селекции полевых культур. – Зб. науч. трудов. – Алматы. – 1997. – С. 47-56.
5. Wanatabe N. Development and use of near-isogenic lines of durum wheat cultivar “LD 222” // EWAC Conf. dedicated to the memory of O.I. Maystrenko. – Novosibirsk, 2000. – P. 65-66.
6. Коваль С.Ф., Коваль В.С., Шаманин В.П. Изогенные линии пшеницы. – Омск, 2001. – 448 с.
7. Гончаров Н.П. Сравнительная генетика пшениц и их сородичей. – Новосибирск, 2002. – 252 с.
8. Рожков Р.В. Успадкування довжини колосової луски та довжини зернівки при гібридизації *T. polonicum* з твердою пшеницею // Цитологія і генетика. – 2006. - № 1. – С. 21-26.
9. Белинская Е.В. Влияние гаметного отбора в культуре пыльников *in vitro* на изменчивость признаков продуктивности удвоенных гаплоидов ячменя // Межд. симпозиум «Молекулярные механизмы генетических процессов и биотехнология». – Москва, 18-21 ноября. – 2001. – С. 121.

Резюме

Показано, що на довжину зернівки гібридів F_1 *H. vulgare* x *H. spontaneum* домінуючий вплив чинить материнська форма, тоді як у гібридів F_2 і F_3 цей показник успадковувався за проміжним типом. Встановлено, що умови вирощування рослин не впливають на довжину зернівки ячменю, проте виявлено їх вплив на характер успадкування довжини верхнього міжвузля. Показано, що віддалені гібриди *H. vulgare* x *H. spontaneum* F_1 і F_2 здатні до утворення гаплоїдів в культурі пиляків.

Показано, что на длину зерновки гибридов F_1 *H. vulgare* x *H. spontaneum* доминирующее влияние оказывает материнская форма, тогда как у гибридов F_2 и F_3 этот показатель наследовался по промежуточному типу. Установлено, что условия выращивания растений не влияют на длину зерновки ячменя, однако показано их влияние на характер наследования длины верхнего междоузлия. Показано, что отдаленные гибриды *H. vulgare* x *H. spontaneum* F_1 и F_2 способны к образованию гаплоидов в культуре пыльников.

The dominant influence of female form on corn's length of F_1 hybrids *H. vulgare* x *H. spontaneum* was shown. This feature was inherited on the halfway type at the hybrids F_2 and F_3 . The growing environments not affected to the length of barley corn's, however were exposed their influence on the character inheritance of overhead internode's length. The distant hybrids *H. vulgare* x *H. spontaneum* F_1 and F_2 were able to form of the haploids in the anther culture were shown.

ШИМКО В.Е.¹, ГОНЧАРОВА Л. В.², ГОРДЕЙ И.А.¹

¹ Інститут генетики і цитології НАН Беларусі

² Центральный ботанический сад НАН Беларусі

Беларусь, 220027, Минск, ул. Академическая, 27, e-mail:shymko@mail.ru

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА ЗАПАСНЫХ БЕЛКОВ (СЕКАЛИНОВ) ДЛ Я ИДЕНТИФИКАЦИИ САМОФЕРТИЛЬНЫХ ЛИНИЙ ОЗИМОЙ РЖИ (*SECALE CEREALE* L.)

Интенсивное развитие селекции сельскохозяйственных культур привело к необходимости более эффективного использования генетических ресурсов. Создание новых источников хозяйственно полезных признаков и свойств культурных злаков является одной из актуальных проблем современной генетики и селекции. Рожь - перекрестноопыляющаяся культура. Генофонд культурной ржи представлен в основном сортовыми популяциями и инбредными линиями. Использование источников самофертильности, выявленных в ряде популяций ржи позволило преодолеть самонесовместимость и проявление инбредной депрессии при создании инцухт-линий как исходного селекционного материала. На основе таких источников в настоящее время создаются коллекции селекционно-ценных линий с высоким уровнем самосовместимости и слабым проявлением инбредной депрессии. Новым подходом к повышению эффективности создания инцухт-линий как родительских компонентов гетерозисных гибридов F_1 является использование гибридных сортов ржи с генами самофертильности (Sf).

В последнее десятилетие результаты генетического анализа у ржи, определения попарного сцепления генов, все больше основываются на изучении качественного и количественного состава различных ферментных систем; расположения генов, контролируемых изоферментами, в определенных хромосомах; выявлении совместного наследования этих генов [1-3]. Использование молекулярно-генетических методов исследований позволило локализовать ряд генов самофертильности: Sf₁(1R); Sf₂(2R); Sf₃(4R); Sf₅(5R); Sf₄(6R) [2]. Картированы 3 мутации, определяющие самофертильность в локусах S, Z и S5 самонесовместимости на хромосомах 1R; 2R и 5R соответственно. Определены 1 белковый и 3 ДНК-маркера для этих локусов [4]. В настоящее время также проводятся исследования по поиску и использованию белковых маркеров в генетическом анализе ржи, тритикале, пшеницы [5-8].

На основе нового источника самосовместимости [9] в ИГиЦ НАН Беларуси была создана коллекция самофертильных линий, характеризующихся высокой озерненностью при последовательном самоопылении и незначительной инбредной депрессией. Выделение в генетической коллекции наследственных изменений морфобиологических, биохимических, репродуктивных процессов; характеристики кариотипов, позволяют создавать множественно-маркированные линии для проведения генетических исследований и целенаправленного использования в селекционных программах.

Материалы и методы

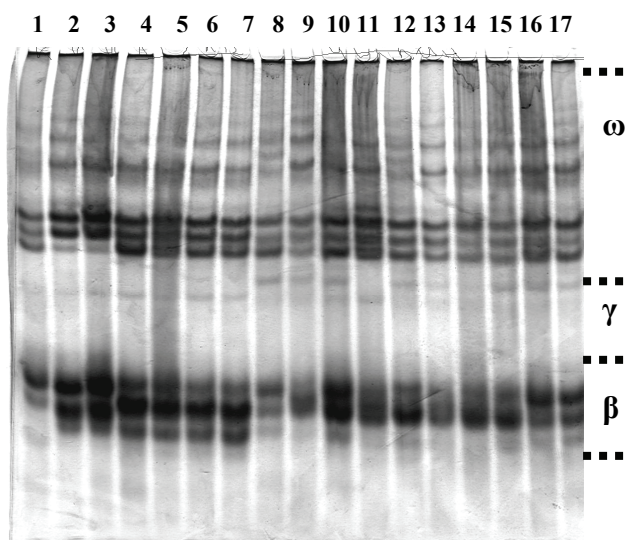
Объектом нашего исследования были образцы из коллекции самофертильной (СФ) диплоидной озимой ржи, полученной на основе генофонда, селектированного в ИГиЦ [9] и включающей линии глубокого инбридинга (6-18 поколений). Линии характеризуются высокой самофертильностью (50-68), хорошей выполненностью и крупностью зерна (м1000з-25-40г) и короткостебельностью, обеспечивающей неполегаемость растений. Интерес для исследований представляют формы, характеризующиеся морфологическими, биохимическими маркерами и особенностями фотосинтетического аппарата.

Исследование и идентификацию исследуемых линий ржи проводили методом электрофоретического анализа белков эндосперма семян, разработанным в отделе молекулярной биологии ВИР [10], в нашей модификации, и стандартным арбитражным методом, включенным в Международные правила анализа семян. Сходство по аминокислотному составу, структуре и генетическому контролю фракций и компонентов секалина с глиадином пшеницы позволило использовать эталонный

спектр глиаина, номенклатуру его фракций и компонентов для записи спектров секалина в виде белковых формул. Для идентификации компонентов секалина исследуемых образцов использовали в качестве сортов-анализаторов рожь Ильмень, Чулпан, пшеницу Казанская, поскольку фракции α , β , γ , ω и отдельные компоненты этих фракций в спектрах данных сортов представлены отчетливо и хорошо идентифицированы.

Результаты и обсуждение

Известно, что у отдельных хромосом ржи хорошо выражена способность к транслокациям и передаче генетического материала в геномы других видов [11, 12]. Получены многочисленные экспериментальные данные, подтверждающие возможность замещения хромосом пшеницы не только разными хромосомами ржи, но и хромосомами других видов злаков [13]. Г.К. Мейстер в 1930 г. считал рожь причастной к образованию *Triticum contractum*, т.к. при расщеплении пшенично-ржаных гибридов появляются компактообразные формы. Г.К. Кандапки еще в 1967 г. предполагала наличие генома ржи в генотипе гексаплоидной пшеницы *Triticum macha*, что в дальнейшем подтвердилось биохимическим анализом глиадинов – был выявлен родовой белковый маркер ω -секалин 234. Он же был обнаружен в глиадинах ряда сортов и линий мягкой пшеницы [14], которая, как оказалось, имеет интрогрессии в коротком плече хромосомы 1В от короткого плеча 1R. Среди существующих в настоящее время лабораторных методов сортовой идентификации весьма эффективными и недорогими являются биохимические методы, основанные на использовании белков семян как генетических маркеров. Электрофоретический анализ белков эндосперма семян ржи (секалина) дает возможность путем позернового анализа выявить внутрисортовую изменчивость, определять состав популяций, устанавливать типичность образца, оценивать межсортовые различия и по типам электрофоретического спектра секалина паспортизировать сорта и инбредные линии.



В результате позернового анализа секалина нами получены электрофореграммы, на которых хорошо идентифицируются три фракции, характерные для проламинов ржи – β , γ , и ω с четким расположением компонентов в пределах каждой фракции (рисунок).

Сходство по аминокислотному составу, структуре и генетическому контролю фракций и компонентов секалина с глиадином пшеницы позволяет использовать эталонный спектр глиаина, номенклатуру его фракций (за исключением отсутствующей у ржи α фракции) и компонентов для записи спектров секалина в виде формул.

Рисунок. Электрофоретические спектры секалина ржи сортов-анализаторов Чулпан (8-17), Ильмень (2,3), Казанская (1), а также линии 12 (4-7)

Известно, что отдельные компоненты и их группы в электрофоретических спектрах проламинов контролируются первой и шестой гомологичными группами хромосом геномов злаковых культур. На электрофореграммах всех исследуемых форм озимой ржи основная масса компонентов обнаружена в β и ω зонах. Отчетливо представлены компоненты ω 234, контролируемые транслоцированным локусом

хромосомы 1R. Данный триплет компонентов присутствовал у всех 5 инбредных линий озимой ржи и сортов анализаторов (таблица).

Таблица

Белковые формулы суммарных спектров глиадинов изучаемых форм зерновых культур

NN	Белковая формула			
	α	β	γ	ω
Сорта				
Пшеница Казанская	<u>6 7</u>	<u>1 2 3 4 5</u>	<u>4 5</u>	<u>2 3 4 5 6 8 9 10</u>
Рожь Ильмень		<u>2 3 4 5</u>	<u>4 5</u>	<u>1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11</u>
Рожь Чулпан		<u>2 3 4</u>	<u>4 5</u>	<u>2 3 4 5 7 8 9 10 11</u>
Рожь Калинка		<u>1 2 3 4</u>	<u>4</u>	<u>2 3 4 7 8 9 10</u>
Линии				
Л-12		<u>2 3 4</u>	<u>4</u>	<u>2 3 4 5 6 8 9</u>
Л-23		<u>1 2 3 4</u>	<u>4</u>	<u>2 3 4 5 8 9 10 11</u>
Л-24		<u>3 4</u>		<u>2 3 4 8 9 10</u>
Л-26		<u>1 2 3 4</u>	<u>5</u>	<u>2 3 4 8 9</u>
Л-37-10		<u>3 4</u>	<u>5</u>	<u>2 3 4 8 9</u>

Для двух линий (л-23 и л-12) показано наличие компонента $\omega 5$ и для л-12 – компонента $\omega 6$. Также исследованные нами линии и сорта показали характерную для ржи «гармошку» из самых слабоподвижных компонентов в ω -зоне, контролируемую хромосомой 2R. Компоненты 89 этой зоны выявлены у всех линий, а $\omega 10$ – у линий л-24 и л-23. Известно, что дополнительным ориентиром при сравнении спектров секалина между собой и сортом – анализатором являются также компоненты $\beta 45$. В наших исследованиях у пшеницы сорта Казанская выявлены все компоненты этой фракции, у ржи сорта Ильмень встречались компоненты $\beta 2345$. У двух линий, л-23 и л-26, определялись $\beta 1234$, у линии л-12 – $\beta 234$ и у линий л-24 и л-37-10 – $\beta 34$. Компонент $\beta 5$ не обнаружен у всех исследуемых форм. Фракция γ представлена в исследуемых формах только компонентами 4 и 5. Данные компоненты $\gamma 45$ выявлены в сортах – анализаторах – ржи Ильмень и пшенице Казанская, а среди изучаемых линий $\gamma 4$ выявлен только у л-23 и л-12, $\gamma 5$ – у л-26 и л-37-10. У линии л-24 не обнаружено компонентов в γ фракции. Полученные результаты позволили разделить изученные линии на группы. Электрофоретические спектры секалина инбредных линий озимой ржи выявили стабильность генотипов. Показано, что исследуемые формы могут быть идентифицированы по наличию определенных типов спектра и частоте их встречаемости, что в дальнейшем позволит выявить молекулярно-генетические маркеры геномов и отдельных хромосом самофертильных линий озимой ржи.

Выводы

На электрофореграммах всех исследованных форм озимой ржи основные компоненты обнаружены в β и ω -зонах. Отчетливо представлены компоненты $\omega 234$, контролируемые транслоцированным локусом хромосомы 1R, которые используются в качестве внутреннего стандарта и точки отсчета при сравнении спектров секалина между собой и сортом-анализатором. Исследованные формы озимой ржи показали характерную для ржи «гармошку» из самых слабоподвижных компонентов – $\omega 11 12 13$ – контролируемую хромосомой 2R. Электрофоретические спектры секалина инбредных линий озимой ржи выявили стабильность генотипов. Изучаемые формы идентифицированы по наличию определенных типов спектра и частоте их встречаемости, что позволит выявить молекулярно-генетические маркеры геномов и

отдельных хромосом для более эффективного использования генофонда самофертильных линий озимой ржи.

Литература

1. Пенева, Т.И. Оценка геномного и хромосомного состава тритикале по белковым маркерам/ Т.И. Пенева [и др.] // Труды по прикл. ботанике, генетике и селекции. – 1981. – Т. 70, вып. 2. – С. 55–57.
2. Schlegel, R. Genes, marker and linkage data of rye (*Secale cereale* L.): 5th updated inventory/ R. Schlegel, G. Melz, V. Korzun // Euphytica. – 1998. – № 101. – P. 23–67.
3. Глиадины: молекулярные и биохимические свойства/ P.F. Qi [et al.]// Молекулярная биология. – 2006. – Т.40, № 5. – С.796–807.
4. Voylokov, A.V. Mapping of three self-fertility mutations in rye (*Secale cereale* L.) using RFLP, isozyme and morphological markers/ A.V. Voylokov, V. Korzun, A. Borner // Theor. Appl. Genet. – 1998. – Vol. 97, №.1–2. – P.147–153.
5. Королева, Н.Ю. Запасные белки семян – генетические маркеры экспрессии генома секалотритикум/ Н.Ю. Королева, И.А. Гордей, Т.И. Пенева// Доклады НАН Беларуси. – 2005. – Т.49, № 3. – С.76–79.
6. Конарев, В.Г. Анализ популяций культурной ржи по электрофоретическому спектру глиадина/ В.Г. Конарев, Т.И. Пенева, И.Ф. Лубо-Лесниченко// С.-х. биология. – 1983. – № 1. – С. 43–51.
7. Конарев, А.В. Белки семян как маркеры в решении проблем генетических ресурсов растений, селекции и семеноводства/ А.В. Конарев [и др.] // Цитология и генетика. – 2000. – Т. 34., № 2. – С. 91–104.
8. Новикова, Л.В. Характер наследования полиморфизма запасных белков глиадинов у гибридов секалотритикум/ Л.В. Новикова, С.И. Гриб // Известия Академии аграрных наук Республики Беларусь. – 2002. – № 1. – С. 58–60.
9. Кедраў-Зіхман, А.А. Новая крыніца самафертыльнасці жыта/ А.А. Кедраў-Зіхман [і інш.]// Весці АН БССР, сер. біял. навук. – 1986. – № 3. – С. 118–119.
10. Пенева, Т.И. Анализ и регистрация сортов и линий ржи по секалину методом электрофореза (методические указания)/ Т.И. Пенева, Н.М. Мартыненко, В.Г. Конарев. – Л. - 1989. – 52 с.
11. Bluthner, W.D. Chromosomen-substitutionen und Translokationen zwischen Weizen und Roggen und deren Bedeutung für die züchtung/ W.D. Bluthner, D. Mettin //Arch. Züchtungsforsch. – 1977. – V. 7, № 1. – P. 15–27.
12. Draper, S.R. ISTA variety committee report of the working group for biochemical tests for cultivar identification 1983-1986/ S.R. Draper// Seed Sci. & Technol. – 1987. – V. 15. – P. 431-434.
13. Шумный, В.К. Аллоплазматические замещенные линии мягкой пшеницы, полученные на основе пшенично-ячменных гибридов *Hordeum vulgare* L (2n=14) x *Triticum aestivum* L (2n=42)/ В.К. Шумный [и др.]//Докл. акад. наук.- 1995.–Т. 340, № 6.–С. 847–849.
14. Конарев, В.Г. Морфогенез и молекулярно-биологический анализ растений/ В.Г. Конарев. – С.-Петербург, 1998. – 370 с.

Резюме

Изучаемые инбредные линии озимой ржи идентифицированы по наличию определенных типов спектра и частоте их встречаемости. Электрофоретические спектры секалина выявили стабильность генотипов. Результаты исследований позволят выявить молекулярно-генетические маркеры геномов и отдельных хромосом для более эффективного использования генофонда самофертильных линий озимой ржи.

Inbred lines of winter rye under study were identified for the presence of certain spectrum types and their occurrence frequency. Electrophoretic spectra of secaline have

revealed genotype stability. Research results will detect molecular-genetic markers of genomes and individual chromosomes for more effective application of self-fertile line gene pool of winter rye.

ШИХЛИНСКИЙ Г.М., АКПЕРОВ А.И., ХИЯВИ К.Г.

*Институт Генетических Ресурсов НАН Азербайджана,
Азербайджан, AZ 1106, Баку, пр. Азадлыг 155, e-mail: Sh.Naci@yahoo.com*

ОЦЕНКА И ПОДБОР ИСХОДНОГО МАТЕРИАЛА ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ НАСЛЕДОВАНИЯ ПРИЗНАКОВ УСТОЙЧИВОСТИ К МИЛДЬЮ

Для успешного проведения работ в направлении выведения комплексно устойчивых сортов, обладающих хорошими хозяйственными качествами, необходимо иметь четкие представления о закономерностях наследования признаков устойчивости в F₁ [1].

При испытании гибридных семян первого поколения от скрещивания двух родительских форм, устойчивых к милдью, из 224 растений 169 показали устойчивость к милдью, что составляет 75,4%. В гибридном потомстве семян наследуется признак устойчивости винограда в соотношении 3:1, что в свою очередь также свидетельствует о гетерозиготности растений винограда по этому признаку [2].

Приведенные данные указывают на возможность получения ценных семян с практической милдьюустойчивостью в 1-3 балла (качество ягод на уровне стандарта) от скрещивания высоковосприимчивых высококачественных сортов *V.vinifera L.* на устойчивые сложные межвидовые гибриды Сейв Виллара [3].

В зависимости от степени различия по интересующему нас признаку между генотипами матерей и отцов в разной степени проявляется их влияние на общую изменчивость милдьюустойчивости от скрещивания сорта *V.vinifera L.* со сложным гибридом [4].

Анализ гибридного потомства 36 комбинаций скрещивания показал, что характер наследования филлоксероустойчивости, милдьюустойчивости, морозоустойчивости и качества ягод во многом зависит от подбора исходных родительских пар [5].

Признак милдьюустойчивости у европейско-амурских гибридов винограда является доминантным, он обусловлен одним геном и наследуется независимо от других признаков, в результате чего получаются устойчивые к болезни гибриды с любым комплексом других признаков [6,7,8].

Полученные результаты по изучению закономерностей наследования признаков устойчивости к филлоксере, милдью и морозу убеждают нас в том, что в потомстве F₁ от различных комбинаций скрещивания они варьируют в довольно широких пределах [9].

Материалы и методы

Для наших исследований взяли семена F₁ от 35 комбинаций скрещивания в основном сложных межвидовых гибридов с высоким качеством урожая, обладающих комплексной устойчивостью, а также от скрещивания сложных межвидовых гибридов, обладающих различной милдьюустойчивостью с сортами евроазиатского винограда (*V.vinifera L.*), отличающихся толерантностью, слабой и сильной, восприимчивостью к болезням, обладающие, однако, высоким качеством урожая. Для изучения взяты следующие группы скрещивания: устойчивый х устойчивый; устойчивый х толерантный; устойчивый х восприимчивый; толерантный х устойчивый; толерантный х восприимчивый; восприимчивый х устойчивый; восприимчивый х толерантный.

Фитопатологическая оценка исходных родительских пар и гибридов первого поколения проводили по разработанной лабораторией иммунитета Молдавского НИИСВ и В лабораторно-полевой методике по пятибалльной шкале [10,11].

Результаты и обсуждение

Результаты оценки сеянцев (F₁) на устойчивость к милдью свидетельствуют о наличии большой амплитуды генетической разнокачественности сеянцев по данному признаку. По всем группам скрещивания установлен широкий спектр расщепления, что объясняется сложным характером наследования в F₁. В основном по всем комбинациям получены сеянцы выносливые и устойчивые (3 балла).

В группе скрещиваний устойчивые (2 балла) на устойчивые (2 балла), полученные сеянцы по милдьюустойчивости превосходят свои исходные родительские формы. В комбинации (XV-21-13 x СВ-12-375) средний балл устойчивости выше, чем у родителей, количество устойчивых сеянцев составляет 54,24%. Коэффициент вариации в данной группе комбинаций колеблется в пределах от 37,07 до 61,43%.

В группе скрещиваний устойчивые (2 балла) на толерантные (3 балла) встречаются комбинации, в которых получены сеянцы, превосходящие по устойчивости исходные родительские формы, как в сторону повышения устойчивости, так и в сторону увеличения восприимчивости.

В группе скрещиваний устойчивых (2 балла) материнских форм (сложный межвидовой гибрид СВ-12-375) на восприимчивых отцовских компонентах (4 балла) во всех комбинациях получены сеянцы, которые превосходят по устойчивости материнские исходные формы. Например, в комбинации СВ-12-375 x Пино гри средний балл милдьюустойчивости равен 1,03, а исходная материнская форма отмечена баллом 2. Все сеянцы этой комбинации (СВ-12-375 x Пино гри) устойчивы. В других комбинациях (СВ-12-375 x Греческий розовый; СВ-12-375 x Фетяска регала; СВ-12-375 x Фетяска мускатная), также получены устойчивые сеянцы (80% оценены 2 баллом). Только в одной комбинации (XI-38-55 x Марсельский черный ранний) средний балл устойчивости (2,62) выше, чем у материнской формы. Но в этой комбинации также получены большое количество (40,42%) устойчивых сеянцев к милдью. Коэффициент вариации в данной группе колеблется в пределах от 17,48% (СВ-12-375 x Пино гри) до 70,99% (СВ-12-375 x Греческий розовый).

В группе скрещиваний толерантных (3 балла) материнских компонентов с устойчивыми (2 балла) и толерантными (3 балла) отцовскими формами наблюдалось значительное варьирование по милдьюустойчивости: от 14,99% (XV-12-13 x Саперави) до 67,6% (V-95-1 x XII-58-90), что свидетельствует о более изменчивом характере признака милдьюустойчивости. В основном во всех комбинациях получены сеянцы устойчивые к милдью. Лучшими по данному признаку оказались комбинации:

XV-14-11 x XV-10-73 (100% устойчивых сеянцев), XV-13-12 x Пламенный (94,59%), XI-22-54 x XV-12-59 (89,2%). Коэффициент вариации составляет соответственно 38,89; 50,7; 33,47%. Некоторые из этих сеянцев представляют интерес для дальнейшей селекции. Необходимо, также отметить, что высокие коэффициенты вариации свидетельствуют о широких комбинационных возможностях сложных межвидовых гибридов.

В группе скрещиваний толерантных материнских форм с восприимчивыми отцовскими компонентами, полученные сеянцы по степени устойчивости к милдью превосходят исходные родительские формы. Например, в комбинации СВ-18-315 x Мускат темно-синий ранний 86,67% сеянцев обладают устойчивостью, а коэффициент вариации составил 42,29%. Аналогичные результаты получены также в комбинации XI-47-114 x Агостенга (85,72%) с коэффициентом вариации 42,1%. А в комбинации V-102-53 x Мускат темно-синий ранний хотя и получено больше 50% устойчивых сеянцев (51,36%), средний балл устойчивости выше, чем у материнской выносливой формы (3 балла), при коэффициенте вариации 26,88%.

Большая амплитуда изменчивости наблюдалась в группе скрещиваний: восприимчивые материнские компоненты (*Vitis vinifera L.*) на устойчивые отцовские формы, где коэффициент вариации колеблется от 11,33% (Купрашвили сеули х XV-19-66) до 35,76% (Ркацители х СВ-12-375). В первой комбинации фактически нет ни одного устойчивого сеянца, а во второй количество устойчивых к милдью составляет 44,44%. Это связано с тем, что во второй комбинации в роли отцовской формы участвует сложный межвидовой гибрид СВ-12-375.

При скрещивании восприимчивых материнских компонентов с толерантными отцовскими формами (4 балла х 3 балла) основное количество сеянцев в первом потомстве проявляют устойчивость на уровне исходных родительских. Средний балл устойчивости в четырех комбинациях ниже отцовских (3 балла). Огромное количество сеянцев в данной группе оказались устойчивыми к милдью. Как и в предыдущей группе (3 балла х 4 балла) по всем комбинациям выявлены сеянцы превосходящие лучшего родителя по устойчивости к милдью. Это сильно выражено в комбинациях: XI-37-17 х V-93-23 (96,72%), V-83-3 х XV-37-52 (90,48%), V-93-3 х Мугурел (89,13%) и Греческий розовый х XV-18-31 (68%) и др. Коэффициенты вариаций составляют соответственно 53,3%; 47,83%; 24,28%; 30,13%.

Интересно отметить, что в скрещиваниях сложная гибридная форма х сложную гибридную форму получено большее количество устойчивых сеянцев, чем в скрещиваниях евроазиатский сорт х форму или наоборот. Это можно объяснить сложной генетической структурой форм, участвующих в скрещиваниях. Например, в комбинациях XI-37-17 (Зейбель 13-666 х Алеатико), V-93-23 (Зейбель 70-53 х Фиолетовый ранний) сливаются сложные генотипы, т.к. Зейбель тоже получен в результате многократных межвидовых скрещиваний. Отмеченный факт свидетельствует о возможности получения значительного количества сеянцев практически устойчивых к милдью.

Выводы

На основе полученных данных по изучению изменчивости и наследуемости признака милдьюустойчивости в зависимости от типа скрещивания по степени устойчивости родительских компонентов приходим к выводу, что при скрещивании по типу устойчивые х устойчивые, устойчивые х восприимчивые, толерантные х толерантные, толерантные х восприимчивые и восприимчивые х толерантные в потомстве F₁ количество устойчивых сеянцев значительное. Это свидетельствует о полигенном, доминантном наследовании милдьюустойчивости, а указанные типы скрещивания являются перспективными для селекции на иммунитет.

Литература

1. Гуменюк Л.Г. Гибридологический анализ гибридных сеянцев винограда F₁ по устойчивости и качеству // Защита винограда и плодовых культур от вредителей и болезней. - Кишинев: Карта Молдовеняскэ.-1979.-С. 71-83.
2. Войтович К.А. Наследование иммунитета к милдью при внутри- и межвидовых скрещиваниях винограда // Устойчивость винограда и плодовых культур к заболеваниям и вредителям. - Кишинев: Штиинца.- 1976.- С. 3-17.
3. Журавель М.С., Савин Г.А. Наследование милдьюустойчивости в F₁ сеянцев винограда // Устойчивость винограда и плодовых культур к заболеваниям и вредителям. - Кишинев: Штиинца.- 1976.-С. 17-36.
4. Савин Г.А., Борзикова Г.М. Оценка исходных форм в селекции винограда на милдьюустойчивость // Селекция и генетика плодовых и винограда в Молдавии. - Кишинев: Штиинца.- 1975.-С. 102-107.
5. Гуменюк Л.Г. Наследование признаков устойчивости и качества в F₁ при селекции на комплексную устойчивость // Задачи молодых ученых Молдавии по повышению эффективности науки в условиях специализации и концентрации сельского хозяйства. - Кишинев. – 1978.- Ч. 1.- С. 193-194.

6. Филиппенко И.М., Штин Л.Т. Наследование устойчивости к милдью у европейско-амурских гибридов винограда // Генетика.- 1973.- Т. IX, № 9.- С. 53-61.
7. Штин Л.Т., Филиппенко И.М. Наследование милдью- и оидиумоустойчивости у европейско-амурских гибридов винограда // Генетика.- 1974.- Т. X, № 11.- С. 37-43.
8. Филиппенко И.М., Штин Л.Т., Филиппенко Л.И. Результаты и перспективы селекции винограда на комплексную устойчивость // Перспективы генетики и селекции винограда на иммунитет. - Киев: Наукова Думка.- 1988. – С. 77-83.
9. Недов П.Н., Агапова С.И. Закономерности наследования признаков устойчивости винограда к грибным болезням, филлоксеру и мопрозу // Садоводство и виноградарство Молдавии.- 1989, № 11.- С. 34-37.
10. Новые методы фитопатологических и иммунологических исследований в виноградарстве (под ред. П.Н.Недова). - Кишинев: Штиинца.- 1985. – 138 с.
11. Войтович К.А. Новые комплексноустойчивые столовые сорта винограда и методы их получения. - Кишинев: Карта Молдовеняскэ.- 1987.- 225 с.

Резюме

Целью исследования было изучение наследования устойчивости к милдью у гибридов первого поколения (F₁), полученных в результате скрещивания сложных межвидовых гибридов с Евроазиатскими сортами винограда (*V.vinifera L.*), отличающимися различной степенью устойчивости к патогенам.

Aim of the investigation was a study of resistance inheritance to mildew at (F₁) hybrids obtained as a result of crossing of complex interspecies hybrids with Euroasian varieties of grapevine (*V.vinifera L.*) which differ by various resistance grade to pathogene.

ЩИПАК Г.В.¹, СУВорова Е.Ю.¹, ЩИПАК П.В.², ЩИПАК В.Г.³, СОТНИКОВ Д.А.³, ГРИНЬ В.О.⁴

¹Институт растениеводства им. В.Я. Юрьева,

Украина, 61060, Харьков, пр. Московский, 142, e-mail: ppi@kharkov.ukrtel.net

²Лаборатория агрохимии ОАО им. Ильича,

Украина, 87450, пгт. Ялта, Першотравневый р-н, Донецкая область

³Харьковский региональный институт государственного управления,

Украина, 61050, Харьков, пр. Московский, 75, e-mail: general @ kbiuara.kharkov.ua

⁴Харьковский национальный экономический университет,

Украина, 61001, Харьков, пр. Ленина 9а, e-mail: mail@hneu.edu.ua

ВКЛАД СЕЛЕКЦИИ В ИЗМЕНЕНИЕ ОЗИМЫХ ГЕКСАПЛОИДНЫХ ТРИТИКАЛЕ

Создание высокоурожайных, специализированных по качеству продукции сортов тритикале является большим достижением селекции [1,2,3]. В Институте растениеводства им. В.Я. Юрьева за период с конца 70-х годов XX века было зарегистрировано 16 озимых сортов тритикале [4,5]. Сравнительное изучение урожайных, адаптивных свойств, морфо-анатомических и технологических особенностей сортов озимых зерновых тритикале разных этапов селекции служило целью нашей работы.

Материал и методика

Испытывали 17 сортов тритикале, 15 – мягкой пшеницы и 3 – ржи местной и инорайонной селекции. Опыты закладывали в лесостепи (ИР им. В.Я. Юрьева) и острозасушливой степи (Приморский ОСУ лаборатории агрохимии ОАО им. Ильича). Посев проводили в лесостепи 15-18, степи – 28-30 сентября. Сортоиспытание

(лесостепь) высевали ССФК-7 в шестикратной повторности, норма высева 4,5 млн. всхожих семян на гектар, площадь делянки 10 м². Экологическое сортоиспытание (в обеих зонах) сеяли ручной сажалкой с нормой высева 3 млн./га, на делянках 1 м², повторность двукратная. Предшественник – черный пар. Почва – чернозем (лесостепь) и супесь (степь). Морозозимостойкость оценивали в полевых условиях и в камерах КНТ-1, засухоустойчивость – прямым методом и в засушнике площадью 100 м² из полиэтиленовой пленки (степь). Морфо-анатомические измерения и подсчеты проводили на 20-100 растениях по общепринятым методикам (микроскоп Biolam, увеличение 18...96). Убирали сортоиспытание комбайном Сампо-130, экологическое – вручную с корнями. Извлечение корней осуществляли на супесчаной почве траншейным способом. Индексы засухоустойчивости, частные (ИЗ) и общие (ИЗ общ.), рассчитывали как отношение величин признака в засушнике к естественному фону, гомеостатичность – согласно В.В. Хангильдину (6). Качество клейковины, силу муки и хлебопекарные свойства определяли по Методике государственного сортоиспытания (7).

Результаты и обсуждение

В сравнительном испытании новые сорта существенно превышали ранее созданные (табл.1). Урожайность тритикале за период 1979-2007 гг. увеличилась за счет селекции на 1,40 т/га. Наибольший прирост получен у сорта Гарнэ третьей сортосмены – 1,63 т/га.

Условия 2003 года (ледяная корка, -17⁰ С на узле кущения) привели к гибели сортов пшеницы и снижению урожайности тритикале в среднем до 3,27 т/га. Высокую зимостойкость проявили АД 256, АД 42, АД 52 и Гарнэ (7,5-8,0 баллов), что на уровне АД 206, стандарта морозозимостойкости. Сорта Ратнэ и Раритет уступают вышеназванным генотипам 0,5 балла в зиму - и -1 -1,5⁰ С морозостойкости. Особо следует подчеркнуть тот факт, что тритикале, созданные гибридизацией озимых форм с яровыми и двуручками, обладают высокой (АД 256, Гарнэ) и повышенной (АД 44, Ратнэ, Раритет) морозозимостойкостью.

Рост продуктивности тритикале произошел за счет изменения разных элементов структуры урожая. Все сорта первой и второй сортосмен (кроме АД 256), созданные ступенчатой межродовой гибридизацией, формируют в колосе 47-63, колоске 1,7-2,1 зерен. Среди сортов второй сортосмены лучшую озерненность колоса (71) и колоска (2,49) имеет АД 256, полученный внутривидовой гибридизацией. В сравнении с АД 206, гомеостатичность колоса нового сорта больше на 37 (колоски) – 170% (зерно).

Таблица

Урожайность озимых зерновых тритикале разных сортосмен (ИР им. В.Я. Юрьева, КСИ, т/га)

Сортосмена	Сорт	Год регистрации	Урожай зерна по годам								Отклонение от предыдущей сортосмены
			2000	2001	2002	2003	2004	2005	2007	среднее	
I	АД 206	1979	6,2	4,8	5,2	2,9	4,0	5,7	5,2	4,86	0
	АД 60	1988	6,4	5,1	5,3	2,0	4,4	5,7	4,9	4,83	
	среднее	-	6,3	4,9	5,3	2,5	4,2	5,7	5,1	4,85	
II	АД 42	1996	6,3	6,7	6,5	3,2	4,7	6,2	5,2	5,54	+0,79
	АД 52	2000	7,3	5,7	6,4	3,1	4,5	5,9	6,2	5,59	
	АД 256	2001	7,3	5,6	6,9	3,7	5,2	5,8	6,0	5,79	
	среднее	-	7,0	6,0	6,6	3,3	4,8	6,0	5,8	5,64	
	Гарнэ	2004	8,5	7,1	6,9	3,7	5,4	6,9	6,9	6,49	

III	Ратнэ	2007	8,5	7,2	6,8	3,1	5,4	6,7	6,1	6,26	
	Раритет	2008	7,9	6,5	6,8	3,2	6,1	6,1	5,7	6,04	
	среднее	-	8,3	6,9	6,8	3,3	5,7	6,6	6,2	6,26	
Пшеница*			5,0	4,1	4,8	0,3	4,2	5,5	5,0	4,13	
Рожь**			6,1	6,6	5,8	1,6	5,1	5,6	5,7	5,21	
НСР ₀₅ = 0,40 т/га											

Примечание: * - Донецкая 48 – 2000-2005 гг., Одесская 267 – 2007 г.

** - Харьковская 98 – 2000-2005 гг., Хасто – 2007г.

Тритикале третьей сортосмены также являются продуктом скрещиваний на гексаплоидном уровне и характеризуются повышенной продуктивной кустистостью (+4,3...14,2%), улучшенной озерненностью колоса (+6,9...45,1%) и его гомеостатичностью (+15,1...142,8%).

В степи (2006-2007 гг.) на естественном фоне АД 206 и АД 60 колосились 17-18 мая, остальные тритикале на 1...7 дней позже, озимая пшеница – 19-21 мая. В засушнике с фазы колошения повышение температуры воздуха составило 10...15⁰ С, что ускорило развитие растений, сказалось на их продуктивности и структуре урожая. Период колошение-полная спелость, при колебании в пределах 38-44 дня, в среднем достиг 41 день, что на 5 дней короче в сравнении с естественным фоном. У Одесской 267 вегетационный период сократился на 3 дня. Снижение продуктивной кустистости тритикале составило 20,7%, пшеницы – 14,3%. Высота растений тритикале уменьшилась на 8,9% с варьированием от 16,7 (Ламберто) до 3,3% (АД 60), пшеницы – 4,0 (Харус) – 7,6% (Одесская 267). Масса сухих корней одного растения в среднем по 17 сортам тритикале в естественных условиях достигла 1,493 г. В засушнике значение признака увеличилось на 22,7% и варьировало в пределах 1,718 (АД52)...2,058 г (Раритет). Повысился вес корней (+29,9...38,4%) у АД 256, Раритет, Гарнэ, Степан, Каприз и Одесской 267. Амфидиплоиды 42, 52, 60, Ратнэ и Юнга характеризовались вдвое меньшим приростом корней (+14,0...16,0%). По индексу засухоустойчивости корневой системы выделились Одесская 267 и Раритет (ИЗ = 0.72...0.73).

Масса 1000 зерен тритикале уменьшилась на 13,8%, озимой пшеницы – 5,4...19,1% (соответственно Одесская 267 и Харус). Сорта тритикале АД 44, АД 256, Раритет, Юнга и Каприз снизили массу 1000 зерен незначительно (-4,0...7,5%, ИЗ = 1,06...1,08). Морщинистое и легковесное зерно сформировали АД51, АД 52 и Ламберто (-25,1%, ИЗ = 1,34).

Урожай зерна тритикале в засушнике составил в среднем 315 г/м², на 18,1% ниже в сравнении с естественным фоном. Одесская 267 при сборе зерна 397 г/м² уступила сортам тритикале Каприз, АД 256 и Гарнэ 23,5, 20,3 и 11,8%. В засушнике эта разница уменьшилась (377 г/м² и 18,4; 14,1; 6,0%).

Адаптивные свойства лучших амфидиплоидов функционально обусловлены способом получения исходного материала, условиями проработки и технологией создания сортовых популяций (8). Каприз (ИЗ общ. = 1,12) выведен академиком А.И. Грабовцом в жесткой зоне Ростовской области, АД 44, Раритет и АД 256 (ИЗ общ. = 1,08...1,13) – многолинейные сорта, исходные генотипы которых отобраны в острозасушливых условиях Приазовья. Более зависимыми от высокой температуры и недостатка влаги оказались Ламберто, Степан, АД 51, Ратнэ, АД 206 (уменьшение урожая на 24,5...28,8%, ИЗ общ. = 1,32...1,40). Снижение продуктивности сортов этой группы в основном вызвано недостаточной водоудерживающей способностью растений и уязвимостью их генеративной системы в экстремальных условиях, приводящих к росту череззерницы и формированию невыполненного зерна.

Четкой зависимости между урожайностью, адаптивностью и размерами листовых пластинок не выявлено. Площадь флаговых листьев тритикале составила 24,1; пшеницы Харус – 18,4, Одесской 267 – 18,7; озимой ржи Хасто – 8,3 см². За

исключением инорайонного сорта Каприз (17,3 см²), генотипы, проявляющие лучшую продуктивность независимо от условий, имели крупные, темно-зеленые листья с сильным восковым слоем: АД 256 (28,1 см²), Гарнэ (27,4 см²), Раритет (28,1 см²). Большой флаговый лист присущ и первому зерновому сорту АД 206 (29,3 см²).

По количеству крупных сосудисто-волоконистых пучков в стебле исследуемые тритикале неоднородны, причем размах варьирования шире, чем у исходных культур. Высокорослые тритикале АД 3/5, АД 44, Ладнэ, Степан и среднестебельные высокопродуктивные сорта Гарнэ, Харроза развивают мощную проводящую систему из 53-62 крупных пучков. Сорта АД 60, Ратнэ и Раритет имели только 38-40 пучков. В среднем у 17 сортов тритикале насчитывалось 49, озимой пшеницы (15 сортов) – 45, ржи Саратовская 6 и Хасто – 48-56 крупных пучков.

Численность устьиц в поле зрения микроскопа на верхней поверхности флагового листа мягкой пшеницы и тритикале была близкой – 178...184. На нижней стороне листа у тритикале насчитывалось 150, пшеницы – только 136 устьиц.

Слабое развитие отдельных элементов компенсируется усилением других систем адаптивности, что проявляется в особенностях новых зерновых сортов тритикале: Юнга (универсального назначения, в государственном испытании с 2006 года) выделяется большим количеством устьиц (225...186), Харроза (передан в государственное сортоиспытание в 2007 году, преимущественно для спиртовой промышленности, выход биоэтанола из тонны крахмала самый высокий среди колосовых культур – 593 л.) имеет мощную проводящую систему, Раритет (внесен в Реестр с 2008 года) при высокой площади листьев и массе корней проявляет повышенную водоудерживающую способность, усиливающуюся за счет образования мощного воскового слоя на растении. Среди имеющегося сортимента тритикале Раритет характеризуется стабильно наилучшими технологическими и смесительными свойствами: ИДК=65 е.п., сила муки 211 е.а., объем хлеба 540 мл., общая хлебопекарная оценка 8,5 баллов. Сорта тритикале первой (АД 206) и второй (АД 256) сортосмен имели удовлетворительные показатели качества клейковины (80...104 е.п.), муки (103-116 е.а.), объем хлеба (410...467 мл), общей хлебопекарной оценки (6,2...7,6 баллов).

Выводы

Переход в селекции озимых тритикале от межродовой преимущественно к внутривидовой гибридизации способствовал созданию специализированных сортов с оптимальным сочетанием урожайных, адаптивных свойств и соответствующих назначению технолого-биохимических показателей качества зерна.

Литература

1. Шульдин А.Ф. Тритикале – новая зерновая и кормовая культура.- К., 1981.-48с.
2. Тритикале России.-Сб. материалов заседания секции тритикале РАСХН, 8-9 июля 1999г./отв.ред. А.И. Грабовец.- Ростов-на-Дону.- 2000.- 132с.
3. Tsvetkov S.M., Stoeva V. Bread making quality of winter hexaploid triticale (X. Tritico-secale Wittmack) in Bulgaria//Bulgarian Journal of Agr. Science.- 2003.- № 9.- P. 203-208.
4. Кириченко В.В., Щипак Г.В., Суворова К.Ю., Панченко І.А., Чередниченко В.М. та ін. Сорти озимих тритикале Інституту рослинництва ім. В.Я. Юр'єва.- Харків:Магда, 2005.-84с.
5. Щипак Г.В., Суворова К.Ю., Чернобаб Р.А. Озимі тритикале Гарне, Ратне, Раритет – дійсно вдале поєднання високої врожайності та якості зерна//Вісник Центру наукового забезпечення АПВ Харківської області.- 2006.- Вип.4.- С.5-14.
6. Хангильдин В.В. О принципах моделирования сортов интенсивного типа//Генетика количественных признаков с.-х. растений.- М.: Наука, 1978.- С.111-116.
7. Методи визначення показників якості рослинної продукції.: Методика державного сортовипробування сільськогосподарських культур/Під ред. О.М. Гончара.- К.: Алефа, 2000.- Вип.7.- С.6-41.

8. *Щитак Г.В.* О селекции озимых гексаплоидных тритикале на адаптивность к неблагоприятным факторам среды//С.- х. биология.- 1994.- № 5 .- С.38-42.

Резюме

Представлены результаты изучения (2000-2007 гг.) в двух агроэкологических зонах озимых зерновых тритикале, выведенных в Институте растениеводства им. В.Я. Юрьева. С 1979 года зарегистрировано 16 сортов. Урожайность выросла на 1,40 т/га. Созданы новые сорта: универсальные (Ратне, Юнга), для производства биоэтанола (Харроза), хлебопекарного назначения (Раритет).

Надано результати вивчення (2000-2007 рр.) в двох агроекологічних зонах озимих зернових тритикале, одержаних в Інституті рослинництва ім. В.Я. Юр'єва. З 1979 року зареєстровано 16 сортів. Урожайність зросла на 1,40 т/га. Створено нові сорти: універсальні (Ратне, Юнга), для виробництва біоетанолу (Харроза), хлібопекарського призначення (Раритет).

There are presented the results of the study for two agroecological zones of winter grain triticale cultivation that have been bred at the Plant Production Institute named after V.Ya. Yuryev. Since 1979 16 sorts were registered. The harvest increased by 1,4 t/ha. The new sorts were created: universal (Ratne, Yunga), for bioethanol production (Kharroza), bread-making multipurpose use (Raritet).

**ЭЙГЕС Н.С.¹, КУЗНЕЦОВА Н. Л.², АРТАМОНОВ В.Д.², ДОЛГОВА С.П.²,
ВАЙСФЕЛЬД Л.И.¹, ВОЛЧЕНКО Г.А.¹, КОРНЕВА Г.Г.², КОЛМЫКОВА Л.П.²**

¹*Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля, Российская академия наук, 119334, Москва, ул. Косыгина, 4, e-mail: liv11@yandex.ru*

²*Главный ботанический сад им. Н.В. Цицина, Российская академия наук, 127276, Москва, Ботаническая ул., д4, e-mail: info@gbsad.ru*

СОЗДАНИЕ ВНУТРИВИДОВОГО БИОРАЗНООБРАЗИЯ У ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ МЕТОДОМ ХИМИЧЕСКОГО МУТАГЕНЕЗА И ЕГО ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В СЕЛЕКЦИИ

В настоящее время имеются тревожные симптомы падения генотипического биоразнообразия среди разных сельскохозяйственных культур и внутри каждой культуры, что выражается в уменьшении числа сортов и генотипическом единообразии у выращиваемых сортов. Падение разнообразия касается не только России, но и многих других стран. Если на несколько десятилетий раньше в мире выращивалось около полутора тысяч разнообразных культур, то теперь выращиваются в основном четыре: пшеница, рис, кукуруза, рожь. Выращиваются и иные культуры, но в ограниченных объемах. Этот всемирно значимый кризис, состоящий в резком сокращении числа выращиваемых культур, не может не сказаться отрицательно на населении Земного шара в отношении нехватки продовольствия и здоровья людей. В этой связи приобретают большое положительное значение разработки ученых по интродукции нетрадиционных овощных культур, богатых витаминами, антиоксидантами, пищевыми волокнами. Большое внимание этим вопросам уделяют специалисты ВНИИССОК на ежегодных совещаниях, проводимых под руководством П.Ф. Кононова, и В.К. Гинс. Значение имеют разработки по лекарственным нетрадиционным растениям, в частности вошедшим в Красную книгу. В этом отношении следует отметить работы ученых в Черногловке под Ногинском под руководством К.А. Трескунова, американских ученых (Functional Foods Center), обобщающие на ежегодных

конференциях Functional Food Products for Chronic Diseases (Cardiovascular Diseases, Diabetes and Aging) результаты исследований по фитотерапии разных заболеваний, в частности сердечно-сосудистых. Уменьшение числа сортов в нашей стране и единообразие их генотипов пагубно отражается на этих сортах с точки зрения уязвимости со стороны фитопатогенов и вредителей, сохранности при неблагоприятных условиях, что неоднократно случалось. Эпифитотии при генотипическом однообразии поражали даже устойчивые сорта. При неблагоприятных условиях наблюдалась гибель или значительное снижение урожая даже у сортов, не лишенных адаптивных свойств. В настоящее время по причине недостаточного разнообразия испытывает трудность внутривидовая межсортовая гибридизация.

Материалы и методы

Для поднятия генотипического разнообразия у озимой пшеницы в настоящей работе был использован метод химического мутагенеза. Испытывались химические супермутагены, высокая мутагенная активность которых была открыта на классическом генетическом объекте мухе дрозофиле И. А. Рапопортом. При обработке семян исследовали влияние этиленimina (ЭИ), нитрозоалкилмочевин, диэтилсульфата и диметилсульфата на сорта озимой мягкой пшеницы Мироновская 808, ППГ 599, ППГ 186 в оптимальных дозах.

Результаты и обсуждение

Наилучшие результаты были получены при действии ЭИ в наиболее эффективном диапазоне доз 0,01-0,04 объемных процента при экспозиции 24 часа. Наиболее мутабельным оказался сорт ППГ 186. Был получен наиболее высокий по сравнению с другими вариантами выход мутаций: более 50% семей, несущих мутации, по отношению ко всем изученным семьям, 12-14% мутантных растений по отношению ко всем изученным растениям и более 100% мутаций в исследованных семьях. Высокая частота мутаций сочеталась с их широким генотипическим и фенотипическим разнообразием, превышающим разнообразие, полученное на иных сортах озимой пшеницы при действии других мутагенов. Широкое разнообразие в оптимальных вариантах действия мутагена определяется главным образом генными доминантными мутациями, затрагивающими многочисленные локусы хромосом. Разнообразие мутантов определило возможность прогнозирования и нахождения нужных наследственных изменений в обширной коллекции, а также использование их ценных признаков в разных направлениях, в частности нетрадиционных. В данном случае представлено зерновое продовольственное направление. В 1989-2001 гг. были выделены образцы с высокими хлебопекарными свойствами, превышающими таковые у сортов Заря и Московская 39 (селекции НИИСХ ЦРНЧЗ). При работе на Опытном поле Отдела отдаленной гибридизации Главного ботанического сада РАН в 2004 и 2006 годах были подтверждены данные по высокому качеству ранее выделенных образцов и выявлены новые образцы, превышающие сорт Московская 39, который числится эталоном по качеству (таблица).

Таблица

Хлебопекарные свойства мутантных образцов и сортов, полученных с помощью этиленimina. Московская область. Снегери.

Сорт, образец	Общая стекловидность, %			Сырая клейковина, %			Седиментация, мл			Объем хлеба, см ³		
	2004	2006	Среднее	2004	2006	Среднее	2004	2006	Среднее	2004	2006	Среднее
Московская 39	43	53	48	28,2	35,6	31,9	26	35	31	510	690	600
Имени Рапопорта	48	35	42	27,3	36,5	31,9	27	40	34	500	680	590
Булава	-	43	-	-	33,7	-	-	39	-	-	680	-

Белая	-	57	-	-	40,1	-	-	42	-	-	670	-
Беседа	-	51	-	-	37,6	-	-	45	-	-	700	-
Сибирская нива	18	36	27	32,4	37,0	34,8	30	44	37	580	690	635
Солнечный	53	46	50	32,0	35,3	33,7	27	39	33	610	700	655
7628	64	56	60	35,6	40,1	37,9	34	43	39	600	690	645
8	-	48	-	-	36,3	-	-	36	-	-	680	-
7723	15	25	20	31,8	34,4	33,1	27	44	36	600	720	660
7469	-	22	-	-	37,0	-	-	38	-	-	720	-
<i>Продолжение таблицы</i>												
Сорт, образец	Пористость, балл			Общая хлебопекарная оценка, балл			Содержание белка, %					
	2004	2006	Среднее	2004	2006	Среднее	2004	2006	Среднее			
Московская 39	4	4	4	3,8	4,2	4	12,14	15,51	13,83			
Имени Рапопорта	4	4,5	4,3	3,7	4,2	4	11,57	15,05	13,31			
Булава	-	4	-	-	4,1	-	-	13,64	-			
Белая	-	4	-	-	4,2	-	-	16,76	-			
Беседа	-	4	-	-	4,2	-	-	16,82	-			
Сибирская нива	5	4	4,5	4,2	4,2	4,2	12,40	13,85	13,13			
Солнечный	4	5	4,5	4,2	4,7	4,5	11,86	13,51	12,69			
7628	5	5	5	4,3	4,3	4,3	12,88	15,22	14,10			
8	-	5	-	-	4,3	-	-	14,54	-			
7723	5	5	5	4,3	4,5	4,4	11,91	13,31	12,61			
7469	-	5	-	-	4,7	-	-	15,35	-			

В среднем за два года по содержанию сырой клейковины сорта Сибирская нива, Солнечный и образцы 7723, 7628 превышают стандартный сорт Московская 39 на 2-6%, по седиментации превышение наблюдается у этих же сортов и образцов на 2-8 мл; по объему хлеба – на 35-60 см³, по пористости – на 0,3-1,0 балл, по общей хлебопекарной оценке – на 0,2-0,5 балла, по стекловидности выделяется образец 7628. Хемомутантный сорт Имени Рапопорта (второй стандарт) по всем перечисленным показателям приближается к стандартному сорту Московская 39. По одногодичным данным 2006 года выделяются следующие образцы: по содержанию сырой клейковины - сорта Белая и Беседа, перспективные образцы 8, 7469. Превышение над сортом Московская 39 составляет 2-5%, по седиментации у сортов Булава, Белая, Беседа – 1-10 мл, по объемному выходу хлеба у сорта Беседа и образца 7469 превышение составляет 7-30 см³. По содержанию белка в зерне превышение более чем на 1% наблюдается у сортов Белая и Беседа. Обращает на себя внимание тот факт, что разные образцы различно реагируют на условия года по разным показателям. Например, по содержанию клейковины значительное различие по годам наблюдалось у всех, представленных в таблице образцов. Наименьшие колебания были у образца 7723. У всех образцов значительные колебания были по седиментации и по объемному выходу хлеба. По пористости отмечаем сорт Московская 39 и образцы 7628, 7723, у которых оба года характеризуются одинаковыми показателями. По общей хлебопекарной оценке стабильность по годам проявили сорт Сибирская нива и образец 7628. По содержанию белка в зерне и по стекловидности у всех образцов наблюдаются колебания по годам. Стабильно высокие общие хлебопекарные свойства по годам и на разных агрофонах проявляют сорта Имени Рапопорта, Сибирская нива, Беседа, Солнечный и образцы 7628, 7723, 7469 – семь образцов из одиннадцати, т. е. больше

половины, при учете данных настоящей работы 2004, 2006 гг. и других более ранних лет 1989-2001 гг. (несмотря на колебания по некоторым показателям). Принято считать, что высокая стекловидность зерна соответствует высокому качеству. Однако из данных настоящей работы по двум годам (см. табл.) следует, что эта зависимость не всегда имеет место. Например, образцы 7723, 7469 при низкой стекловидности имеют высокую общую хлебопекарную оценку. Высокие хлебопекарные свойства – редко возникающий признак при использовании только традиционных методов селекции без применения химического мутагенеза. Под влиянием ЭИ в настоящей работе высокое качество – признак, часто возникающий. Из 27 образцов, впервые исследованных еще в 1989 году, 9 образцов, т. е. одна треть, показали высокие хлебопекарные свойства, стабильно проявляющиеся в дальнейшем по годам. По-видимому, частое возникновение этого признака можно объяснить тем, что при оптимальном сочетании химического мутагена, диапазона его доз и исходного сорта мутациями бывают охвачены разнообразные локусы. При этом возникают множественные мутации и мутации полимерных факторов в разных генетических системах. При их совокупном действии возникают в значительном числе мутанты с высокими хлебопекарными свойствами. Стабильно высокое качество по годам и при разных условиях выращивания свидетельствует о том, что у перечисленных сортов и образцов это свойство определяется более генотипически и менее зависит от условий выращивания по сравнению с другими образцами.

Выводы

Получено высокое генотипическое и фенотипическое разнообразие мутационного спектра на озимой пшенице под влиянием супермутагена этиленимина. Представленное в данном исследовании одно из направлений использования ценных мутантных признаков – зерновое продовольственное включает в себя сорта и образцы с высокими хлебопекарными свойствами, которые с высокой частотой возникают при действии этиленимина и стабильно проявляют их по годам.

Резюме

На озимой мягкой пшенице – сорте ППГ 186 под влиянием этиленимина получено широкое генотипическое и фенотипическое разнообразие признаков, включающее высокие стабильно по годам проявляющиеся хлебопекарные свойства.

На озимій м'якій пшениці – сорті ППГ 186 під впливом етіленіміна отримане широке генотіпічна і фенотіпічна різноманітність ознак, що включає високі стабільно по роках хлібопекарські властивості, що виявляються.

On winter common wheat – variety of PPG 186 under influencing of ethylene imine wide genotypic and phenotypic diversity of characters, including high stably on years showing up bakery properties is received.

ЮДАНОВА С.С., МАЛЕЦКАЯ Е.И.

Институт цитологии и генетики СО РАН; пр. Лаврентьева 10, 630090, Новосибирск, Россия; sonia@bionet.nsc.ru

ОСОБЕННОСТИ ЦВЕТЕНИЯ И МИКРОСПОРОГЕНЕЗА ГАПЛОИДНЫХ РАСТЕНИЙ У САХАРНОЙ СВЕКЛЫ (*BETA VULGARIS* L.).

Гаплоидами (моноплоидами) называют растения, в ядрах клеток которых содержится только один набор хромосом. Удвоение числа хромосом у гаплоидов – эффективный путь получения гомозиготных диплоидных линий у многих видов

культурных растений. Исследования, проведенные на семенных партиях свеклы, полученных от свободного опыления, показали, что гаплоидные проростки в таких семенных партиях встречаются с очень низкой частотой $10^{-5} - 10^{-6}$. Это ограничивает возможность использования таких семенных партий в практической селекции [1, 2]. Это побудило исследователей искать более эффективные методы репродукции семян для выявления гаплоидных проростков. Существенный результат был достигнут при партеногенетической индукции эмбриогенеза: опыление пылью дикорастущих видов (10^{-3}); опыление облученной пылью (10^{-4}); опыление диплоидных растений пылью тетраплоидов (2×10^{-3}); опыление пылью красной столовой свеклы (10^{-4}) [3, 4]. Эти результаты получены путем ручной кастрации цветков, что неприемлемо для целей практической селекции. Показано также, что семенные партии, собранные с пыльцестерильных растений, дают примерно в десять раз больший выход гаплоидов, чем семенные партии, собранные с фертильных растений [5].

В настоящее время во многих селекционных учреждениях используют биотехнологический метод получения гаплоидов путем культивирования семян *in vitro*. В среднем выход гаплоидных эмбрионов в культуре *in vitro* составляет не более 1% от числа высаженных на среду семян. Частота выхода гаплоидных эмбрионов зависит от генотипа донорских растений варьирует от 0 до 13 % [6, 7, 8]. Широкое использование метода в практической селекции *in vitro* сдерживается его затратностью и трудоемкостью работ.

В 1990-е годы в лаборатории популяционной генетики ИЦиГ СО РАН был разработан однородительский (или апозиготический) метод семенной репродукции у сахарной свеклы [9]. По нашим наблюдениям у растений, склонных к однородительскому способу размножения, повышен уровень миксоплоидности клеточных популяций, что делает возможным попадание полиплоидных клеток в зародышевые пути, и формированию партеногенетических эмбрионов [10]. Диплоидные семена, полученные при однородительской репродукции, обозначаются дигаплоидами.

Целью данной работы было: исследовать особенности цветения и микроспорогенеза у гаплоидных и дигаплоидных растений сахарной свеклы, полученных из апозиготических семенных потомств.

Материалы и методы

В качестве материала была использована линия мсСОАН-5 А₃ из коллекции лаборатории популяционной генетики растений ИЦиГ СО РАН. Семена, взятые на проращивание, получены от растений, которые в течение трех поколений репродуцировались апозиготически. Для проращивания было отобрано 2400 плодов и на третьи сутки после промывки и проращивания проводили учет и отбор гаплоидных и дигаплоидных проростков по биоморфологическим признакам (длина и диаметр корешка). Гаплоидные проростки на 3-и сутки в четыре раза короче и имеют вдвое меньший диаметр, чем дигаплоидные [11].

Результаты

Из общего числа 1822 проросших семян было выделено 100 гаплоидных проростков (5,49%), остальные были дигаплоидными. Для цитологической оценки клеточных популяций проведен подсчет числа хлоропластов в замыкающих клетках устьиц, поскольку существует высокая корреляция между уровнем плоидности и числом хлоропластов в замыкающих клетках устьиц у растений сахарной свеклы ($r > 0,90$) [12]. Хлоропластная методика позволяет, во-первых, быстро определить уровень плоидности, во-вторых, дает большие выборки, характеризующие клеточные популяции растения. У каждого растения подсчитаны хлоропласты в 50 замыкающих клетках устьиц. Среднее число хлоропластов на клетку у гаплоидных сеянцев составило 9 шт. клетку, а у дигаплоидов – 16.

В первый год жизни гаплоидные растения заметно отставали в развитии, а в процессе вегетации в первый год жизни и при хранении корнеплодов на второй год была очень высокая их гибель (примерно 30% и 50% соответственно). После прохождения яровизации и высадки корней в поле, отрастание происходило дружно, но уже через неделю наблюдалось отставание в развитии. Размеры растений в некоторых случаях различались более чем вдвое. На рисунке 1 показаны гаплоидное и дигаплоидное растения второго года жизни в конце периода вегетации.

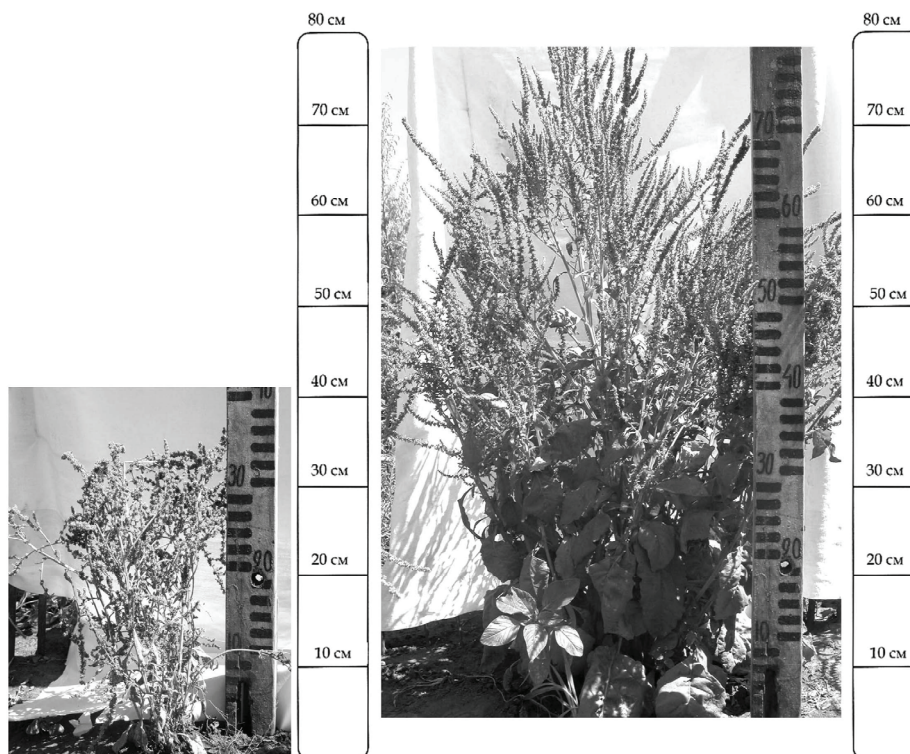


Рис.1. Гаплоидное (слева) и дигаплоидное растения на второй год жизни.

Кроме того гаплоидные растения позже, чем дигаплоиды, вступили в фазу цветения (табл. 1). Некоторые растения различались вдвое: 51 день с момента посадки у гаплоидного растения и 25 дней – у дигаплоидного. Статистический критерий G для многопольных таблиц показал, что различия между вариантами опыта по динамике вступления в фазу цветения гаплоидных и дигаплоидных растений высоко достоверны: в среднем у гаплоидных растений цветение начинается более чем на неделю позже.

Таблица 1. Начало цветения гаплоидов и дигаплоидов, линии мсСОАН-5 при апозиготическом размножении.

	Число дней с момента высадки									того
	5-27	8-30	1-33	4-36	7-39	0-42	3-45	6-48	9-51	
<i>гаплоиды</i>						7				6
<i>дигаплоиды</i>			2	4	0					20
Итого:			2	5	2	4				46

$G = 101,3$; $G_{0,999} = 20,1$ ($df = 8$).

Анализ микроспорогенеза показал, что у гаплоидов формируются все четыре типа микроспор, но, как и ожидалось, большая часть микроспор была представлена монадами - 53,42 % (рис. 2). У дигаплоидных растений картина была обратная: большую часть популяции микроспор составляли тетрады – 79% (рис. 2).

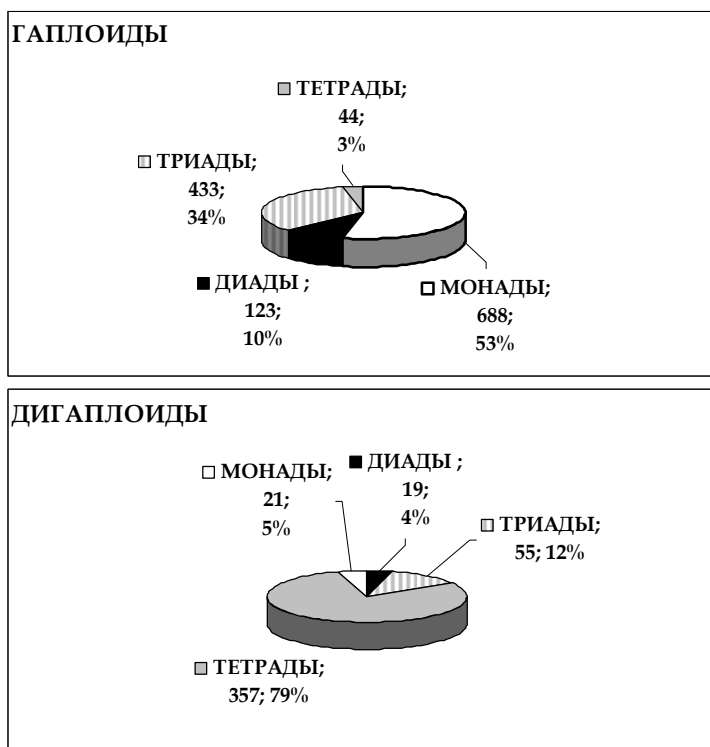


Рис. 2. Частоты микроспор у гаплоидных растений

Рис. 3. Частоты микроспор у дигаплоидных растений

Обсуждение. Метод однородительского семенного размножения у свеклы можно достаточно эффективно использовать для проведения различных экспериментальных исследований, в том числе для получения гаплоидов. Процесс апомитотической репродукции может реализовываться на основе как эндополиплоидии (наличия многонитчатых хромосом – дупло- и квадруплохромосомы), так и вследствие миксоплоидности клеточных популяций меристем. Оба явления свойственны семейству *Chenopodiaceae* и давно описаны в литературе [13]. Спонтанная миксоплоидия представляет собой вариацию числа наборов хромосом в ядрах клеток с преобладанием одной основной фракции, что позволяет растениям при однородительском размножении формировать гаплоидные и дигаплоидные семенные потомства.

Наличие у гаплоидов микроспор, прошедших мейотические деления, т. е. диад, триад и тетрад, свидетельствует о том, что часть микроспороцитов вступили в мейоз и осуществили либо однократное, либо двукратное деление. Природа их возникновения у гаплоидов полностью не ясна. Она может быть, как следствием эндополиплоидии, так и миксоплоидии. Следует отметить, что наличие тетрад микроспор в мейозе гаплоидных растений свеклы не является исключением. Например, у томата в некоторых случаях формируется более 40% тетрад. И соответственно, наблюдается некоторый уровень фертильности пыльцы $\approx 8\%$ (Иванова, 2001). Наличие тетрад микроспор объясняет появление некоторой доли фертильных пыльцевых зерен. Это дает возможность получения семенного потомства от гаплоидных растений.

Выводы: Гаплоидные растения существенно отстают в росте и развитии, в отличие от дигаплоидов: а) они позже вступают в фазу цветения и б) на второй год жизни гаплоидные и дигаплоидные растения иногда имеют более чем двукратное различие по размерам.

Литература

1. *Levan A.* A haploid sugar beet after colchicines treatment // *Hereditas*, 1945. V. 31. P. 399–410.

2. Добрецова Т.Б., Лутков А.Н., Манжос А.М. Спонтанные полиплоидные и гаплоидные формы сахарной свеклы у близнецовых растений // ДАН СССР, 1965. Т. 160, №2. С. 454–457.
3. Bosermark N.O. Haploids and homozygous diploids, triploids and tetraploids in sugar beet // Hereditas, 1971. Иванова С.В. Мейоз у гаплоидов томата как возможный индуктор генотипической изменчивости // Известия ТСХА, выпуск, 1, 2001, с. 72–82.
4. Seman I. Possibilities of detection and induction of haploids in *Beta vulgaris* L. // Biologia, V. 38 (1), 1983. P. 1113-1122.
5. Yüce S. Haploidie bei der Zuckerrübe. Landwirtschaftl. Hochschule Giessen, 1973 Цит. по: Pedersen H.C., Keimer B. Haploidy in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) In: Vitro Haploid Production in Higher Plants. Vol. 3: Important Selected Plants. // Kluwer Academic Publishaer, 1996. P. 17–36.
6. Lux H., Herrman L., Wetzel C. Production of haploid sugar beet (*Beta vulgaris* L.) by culturing unpollinated ovules // Plant Breeding, 1990. V.104. P. 177–183.
7. Svirschevskaya A.M., Kozyrevich T.P., Bormotov V.E. Sugar beet haploids in an unpollinated ovule culture. // Doklady Akademii Nauk Belarusi, 1993. Vol. 37(4), P.74-76.
8. Gürel S., Gürel E., Kaya Z. Doubled haploid plant production from unpollinated ovules of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). Plant Cell Rep., 2000. V. 19 (12), P. 1155-1159.
9. Малецкий С.И., Малецкая Е.И. Самофертильность и агамоспермия у сахарной свеклы // Генетика, 1996. Т.32(12). С. 1643-1650.
10. Малецкий С.И., Юданова С.С. Зародышевый путь и ствольные клетки у высших растений. // Цитология и генетика, 2007. Т.41, №5. с. 67-80.
11. Малецкая Е.И., Малецкий С.И. Апозиготический способ репродукции семян и гаплоидия у сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) // Сборник научных трудов: «Факторы экспериментальной эволюции организмов». Том 3. Київ: «ЛОГОС», 2006.
12. Savitsky H. Effectiveness of Selection for Tetraploid Plants in C₀ Generation on the Basis of the Number of Chloroplasts in Stomata. Journal Amer. Soc. Sugar Beet Technol., 1966. V.13 (8). P. 655 –661.
13. Gentcheff G., Gustafsson A. The double chromosome reproduction in *Spinaceae* and its causes. 1. Normal behavior // Hereditas. 1939. V.25. №3. P. 349-358.

Резюме

В работе получены гаплоидные растения из семенного материала, прошедшего однополодную репродукцию. Гаплоидные растения отбирали по морфобиологическим признакам (длина и диаметр корешка). Показано, что гаплоидные растения на неделю позже вступают в фазу цветения, и кроме того, у них формируются все 4 типа микроспор (монады, диады, тетрады), но, как и ожидалось, большая часть микроспор была представлена монадами - 53,42 %.

In the work a haploid plants were obtained from the seed material after uniparental seed reproduction. The haploid plants were selected by biomorphological characters. It was shown that (i) haploids enter into the flowering stage; (ii) a haploid plants form all four type of microspore: monade (53 %), diade (10%), triade (34%), tetrade (3%).

ТЕХНОЛОГІЇ *IN VITRO*: ПРОБЛЕМИ ТА ПЕРСПЕКТИВИ

АЛАТОРЦЕВА Т.А., ТЫРНОВ В.С.

Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского, Россия
Россия, 410012, Саратов, ул. Астраханская., 83, e-mail: AlatortsevaTA@info.sgu.ru;
Tyrnovvs@info.sgu.ru

НОВООБРАЗОВАНИЯ И РЕГЕНЕРАЦИЯ В КУЛЬТУРЕ ЗРЕЛЫХ ЗАРОДЫШЕЙ КУКУРУЗЫ

Одним из путей воспроизводства растений злаков *in vitro* является их регенерация через соматический эмбриогенез. Длительно культивируемые, интенсивно растущие эмбриогенные ткани служат удобным материалом «конвейерного» производства клонированных растений. Чаще всего для этих целей используют в качестве эксплантов незрелые зародыши. Меньшей популярностью у исследователей пользуются дифференцированные зародыши из сухих зерновок. (Долгих, Пустовойтова, Жданова. 1999), хотя именно подобные работы можно было бы проводить практически круглогодично.

Материал и методы

В данном эксперименте изучались морфогенетические процессы, включая регенерацию растений, в культуре зрелых зародышей партеногенетической линии кукурузы АТ-1. Модифицированная питательная среда Мурасиге и Скуга (МС) содержала сахарозу (2,0 %) и 2,4-Д, а также те же ингредиенты, но без регуляторов роста. Уровень рН до автоклавирования составлял 5,8 -6,1.

Результаты и обсуждение

В ходе культивирования была установлено, что морфогенетические процессы, обычно характерные для молодых зародышей и включающие два этапа – индукцию эмбриогенного каллуса и регенерацию растений (Диас, Долгих, 1977), могут иметь место и при инокуляции зрелых зиготических зародышей, хотя имеются и некоторые особенности в локализации эмбриогенных структур. В частности, известно, что у кукурузы эмбриониды могут возникать либо из клеток каллуса, производного от поверхностных тканей зародыша (Kuo, Lu, 1984; Lupotto, 1986; Vasil, Vasil, 1986; Van Lammeren, 1988), либо непосредственно из эпидермальных и субэпидермальных клеток щитка (McCain, Hodges, 1986).

В наших экспериментах со зрелыми зародышами было установлено, что спустя трое суток после инокуляции зародышей из зерновок начинается их прорастание. На безгормональной среде оно идет по обычной схеме: развиваются корешок и колеоптиль, затем появляются настоящие листья. Одновременно с прорастанием зародышей на всех средах в области щитка образуется раневой каллус, масса которого со временем увеличивается, и дальнейшая пролиферация может лишь сопровождаться иногда слабым ризогенезом. В присутствии 2,4-Д происходит ингибирование процессов корнеобразования, и растения формируются без корней (рис. 1).

Спустя семь суток культивирования на среде с 2,4-Д на внешней поверхности утолщающегося колеоптиле появляются отдельные глобулярные образования диаметром приблизительно 1 мм, далее его трубка разрывается и с внутренней стороны становятся хорошо видимыми «грозди» глобул. Подобные глобулярные структуры возникают и на листьях молодых проростков. Впоследствии глобулы формируют либо исключительно ризогенный каллус серого цвета, либо желтый морфогенный (эмбриогенный), который продуцирует большое количество эмбрионидов, начинающих прорастать в каллусе через 3-4 недели после пересадки его на свежую среду с 2,0 мг/л 2,4-Д (рис. 2-3).



Рисунок 1. Образование каллуса в период прорастания зародыша: а-каллус в основании проросшего зародыша; б - аномальное прорастание зародыша на фоне каллусогенеза.



Рисунок 2. Спектр новообразований на средах с 2,4-Д: а - начало прорастания и образование раневого каллуса; б, в - образование на coleoptile глобул; г - формирование эмбриогенного и ризогенного каллусов; д - прорастание эмбриоидов.

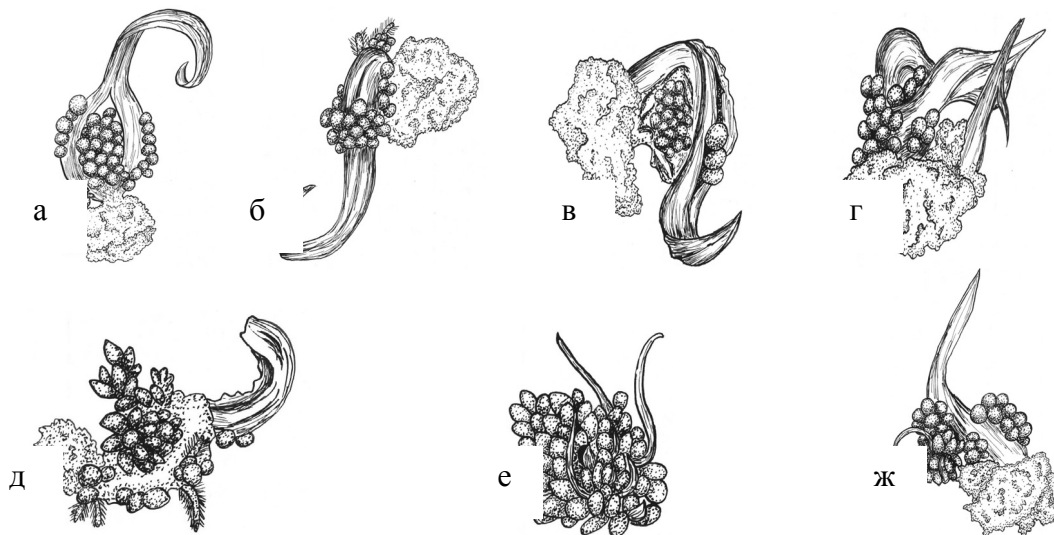


Рисунок 3. Морфогенез в культуре зародышей: а, б – появление глобул на coleoptile; б, д – одновременное развитие морфо- и ризогенного каллусов; в, г – о глобулы на листьях проростков; е, ж – регенерация в эмбриоидогенном каллусе.

При пересадке каллус распадается на отдельные фрагменты, представляющие собой комплексы эмбриоидов. Некоторые из них проявляют тенденцию к прорастанию уже в исходном пассаже на средах с 2,4-Д, хотя развитие растений при этом заторможено. Для регенерации более благоприятной оказалась среда без 2,4-Д, но с ИУК и кинетином (по 1мг/л). Процесс формирования растений из эмбриоидов происходит не всегда единообразно (рис. 4).

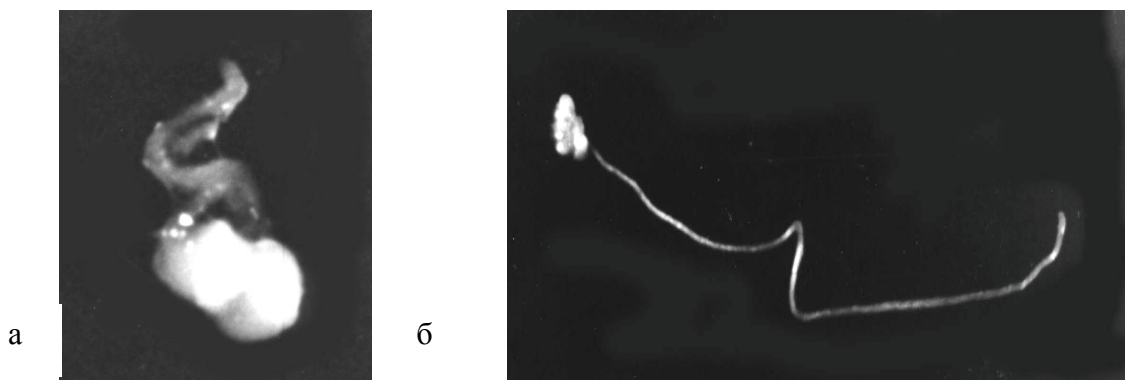


Рисунок 4. Процесс прорастания отдельных эмбрионов: а) развитие стелевого апекса; б – преобладающий ризогенез.

В одних случаях (рис. 4а) сначала появляется листовая пластинка (иногда вначале гофрированная, неправильной формы), которая постепенно вытягивается в длину, приобретая вид типичного листа злаков. Позднее, когда побег уже достаточно хорошо выражен, появляются корни. В других случаях развиваются только корни, а стеблевая часть растения совсем не развивается (рис. 4б). И, наконец, отмечается третий, классический вариант прорастания эмбрионов, когда одновременно, практически синхронно, на одном конце эмбриона развивается стеблевая часть зеленого цвета, а на другом - миниатюрный корешок, то есть происходит сопряженное развитие стелевого и корневого апексов и в итоге формируются растения - регенеранты. Следует отметить, что продуцирующая эмбрионы каллусная ткань очень быстро нарастает в объеме, за счет формирования всё новых эмбрионов. Их асинхронное развитие ведет к тому, что можно одновременно наблюдать в каллусе, в одной пробирке и молодые, и дифференцированные, прорастающие эмбрионы. Своевременная пересадка морфогенного каллуса на свежую среду с 2,0 мг/л 2,4-Д и 2,0 % сахарозой позволяет не только периодически наращивать и обновлять и каллусные штаммы, но иметь хороший материал для производства большого количества клонированных растений данного генотипа.

Литература

1. Долгих Ю.И., Пустовойтова Т.Н., Жданова Н.Е. Соотношение эндогенных фитогормонов в незрелых зародышах компетентных и некомпетентных к соматическому эмбриогенезу линий кукурузы // Физиология растений. – 1999. – Т.45, №6. – С.861- 864.
2. Дуас С., Долгих Ю.И. Роль физиологических факторов в повышении эффективности регенерации растений из культивируемых тканей кукурузы // Биотехнология. – 1977. – № 11-12. – С.32-36.
3. Кuo С.-S., Lu W.-I. Изучение морфологии и цитологии эмбрионов, полученных в культуре каллуса кукурузы // Чжиу сюэбао, Acta. Bot. Sin. – 1984. – vol. 26, №1. – P.19-23.
4. Lupotto E. *In vitro* culture of isolated somatic embryos of maize (*Zea mays* L.) // Maydica. – 1986. – vol. 31, №2. – P.193-201.
5. Vasil V., Vasil I.K. Plant regeneration from friable embryogenic callus and cell suspension cultures of *Zea mays* L.// J. Plant.Physiol. – 1986. – vol. 124, №5. – P. 399-408.
6. Van Lammeren A.A.M. Observations on the structural development of immature maize embryos (*Zea mays* L.) during *in vitro* culture in the presence or absence of 2,4-D // Acta bot. neerl.- 1988. – vol. 37, №1. – P.49-61.
7. McCain J.W., Hodges T.K. Anatomy of somatic embryos from maize embryo cultures // Bot. Gaz. – 1986. – vol. 147, №4. – P. 453-456.

Резюме

Представлено результати культивування зрілих зародків кукурудзи парthenогенетичної лінії АТ-1. На живильне середовище MS з 2,4-Д обмежено формування неморфогенного і морфогенного калусу. У морфогенном калусу визембріоїдів розвивались рослини. Шляхом пересаджування на вежею середовище піддержували калусные штами і одержані регенеранти.

Представлены результаты культивирования зрелых зародышей линии АТ-1. На питательной среде отмечено формирование неморфогенного и морфогенного каллусов. Растения развивались из эмбриоидов в морфогенном каллусе. Путем пересадки на свежую среду поддерживали каллус и получали регенеранты.

The results of the cultivation of mature embryos in maize parthenogenetic line АТ-1 are discussed. Formation of unmorphogenic and morphogenic callus on nutrient medium MS with 2,4-D was observed. Plants have developed from embryoids in the morphogenic callus. By transplant on fresh medium supported callus and received regenerants.

БАВОЛ А.В., ДУБРОВНА О.В., ЛЯЛЬКО І.І.

Інститут фізіології рослин і генетики НАН України,

Україна, 03022, Київ, вул. Васильківська 31/17, e-mail: ksana1@zeos.net

ВПЛИВ ХІТОЗАНУ НА РІСТ І РОЗВИТОК КАЛЮСНИХ КУЛЬТУР М'ЯКОЇ ПШЕНИЦІ

Хітин – природний полісахарид, що складається з N-ацетил-D-глюкозаміну й залишків D-глюкозаміну, з'єднаних – β 1,4 глікозидними ланками. Він наявний у різноманітних видів: у раковинах ракоподібних, у кутикулах комах, в клітинних стінках грибів та деяких морських водоростей. Деацетилювання хітина дозволяє одержати розчинний полімер D-глюкозаміна - хітозан, найважливішою характеристикою якого є ступінь деацетилювання, обумовлена відношенням кількості ланок D-глюкозаміна до N-ацетил-D-глюкозаміна. Таким чином, хітозан являє собою полімер D-глюкозаміна з різною молекулярною масою, що містить 5 - 15% ацетамідних груп, а також до 1 % груп, з'єднаних з амінокислотами й пептидами.

Хітозан широко застосовується у целюлозно-паперовій промисловості, виробництві медичних і косметичних препаратів та продуктів харчування, а також при очищенні стічних вод [1]. У сільському господарстві він використовується для передпосівної обробки насіння для стимулювання росту рослин і збільшення їх продуктивності [2], як добриво [3], ефективний комплексоутворюючий сорбент для іонів важких металів, зокрема міді, завдяки наявності в його структурі гідрокси- і аміногруп [4]. Позитивний вплив хітозану був виявлений на ріст коренів й пагонів різних видів рослин, включаючи і декілька хлібних злаків [5]. Він зміцнює стебло рослин за рахунок потовщення, перешкоджає виляганню, сприяє збільшенню кореневої системи. Крім того, хітозан має еліситорні властивості - підвищує стійкість рослин до фітопатогенів [6-8]. З даних літератури відомо, що взаємодія хітозана з клітинами рослин залежить від його молекулярної маси й хімічної структури, що суттєво впливає на обмін речовин рослин [9]. Часткове N-ацетилювання або фрагментація змінюють його здатність індукувати захисну реакцію організму та впливають на рістрегулюючу активність.

Не дивлячись на те, що проводяться досить широкі дослідження хітозану в умовах *in vivo*, його вплив на біотехнологічні процеси, зокрема, калюсогенез, регенераційну здатність, ріст і розвиток рослин-регенерантів вивчено недостатньо. У

зв'язку з цим, метою нашої роботи було дослідження впливу хітозану на ріст і розвиток калюсних культур м'якої пшениці.

Матеріали і методи

Матеріалом досліджень був сорт пшениці – дворучки Зимоярка, отриманий у відділі експериментального мутагенезу ІФРГ НАН України. В якості експлантів використовували верхівку пагона 3-добових проростків, що містить апікальну меристему, листові примордії та базальні частини листків. Розмір експлантів варіював у межах 1,5 – 2,0 мм. Для отримання донорних рослин насіння стерилізували 3%-ним розчином NaOCl протягом 15 хв, чотири рази відмивали стерильною дистильованою водою і пророщували на світлі при 24 °С на безгормональному середовищі МС три доби. Експланти висаджували на поживне середовище МС, яке додатково містило L-аспарагін -150 мг/л, AgNO₃ - 10 мг/л, 2мг/л 2,4-Д, а також хітозан з молекулярною масою - 10 та 100 кДа і ступенем деацетилювання 85% в різних концентраціях. Досліджували по 80 експлантів, представлених 4-ма чашками Петрі (по 20 експлантів в чашці) на кожну концентрацію хітозану. Повторюваність досліду - трикратна. Приріст маси калюсів визначали після 2, 4 та 6 тижнів культивування. Експланти культивували при 26 °С в темряві протягом чотирьох тижнів. Потім їх переносили на світло і далі вирощували при освітленні 3-4 клк, відносній вологості повітря 70 % і 16-годинному фотоперіоді, ще протягом двох тижнів. Сформовані таким чином калюси для регенерації переносили на середовище МС, яке додатково містило 1мг/л БАП, 0,5 мг/л ІОК та 10 мг/л AgNO₃. Число пагонів, отриманих з калюсних культур підраховували після 4 тижнів вирощування на регенераційному середовищі. Частоту індукції калюсу та регенерації рослин (у відсотках) визначали як співвідношення числа експлантів, які утворили калюс або рослини-регенеранти, до загального числа експлантів.

Результати та обговорення

Для дослідження впливу хітозану на калюсоутворення із експлантів верхівки пагона проростків пшениці препарат використовували в концентраціях 1, 5, 10, 25, 50, 100 мкг/мл. При низьких концентраціях хітозану молекулярною масою 10 кДа (1 та 5 мкг/мл) у середовищі кількість експлантів, на яких утворювався калюс, практично не відрізнялася від контролю (середовище без хітозану) і становила 88-90%. Високі дози препарату (50 та 100 мкг/мл) пригнічували утворення калюсу – кількість експлантів з калюсом не перевищувала 55%. Найбільш оптимальним для формування калюсної тканини виявилася концентрація в середовищі хітозану (10кДа) 10 та 25 мкг/мл.- практично всі експланти утворювали калюс. Висока молекулярна маса хітозану (100 кДа) не мала ніякого стимулюючого ефекту на процес калюсоутворення.

Для вивчення впливу хітозану різної молекулярної маси на приріст маси калюсу його використовували в двох концентраціях - 10 та 25 мкг/мл. Після шести тижнів культивування на середовищі з хітозаном молекулярної маси 10 кДа, відмічався порівняно більший приріст біомаси, ніж у варіанті, де використовували хітозан з молекулярною масою 100 кДа ($p < 0,05$). Вплив хітозану на приріст сирової маси калюсів залежав від його концентрації в середовищі (рис.1). Так, у варіанті з 10 мкг/мл приріст калюсу за 6 тижнів складав $2,46 \pm 0,2$ г, а у варіанті з 25 мкг/мл $2,06 \pm 0,2$ г. На контрольному середовищі, за той самий проміжок часу, приріст біомаси становив $1,38 \pm 0,2$ г. На середовищі з 25 мкг/мл хітозану з молекулярною масою 100 кДа, спостерігалось пригнічення росту калюсів – приріст за 6 тижнів складав $0,81 \pm 0,1$, а на середовищі з 10 мкг/мл – $1,03 \pm 0,2$.

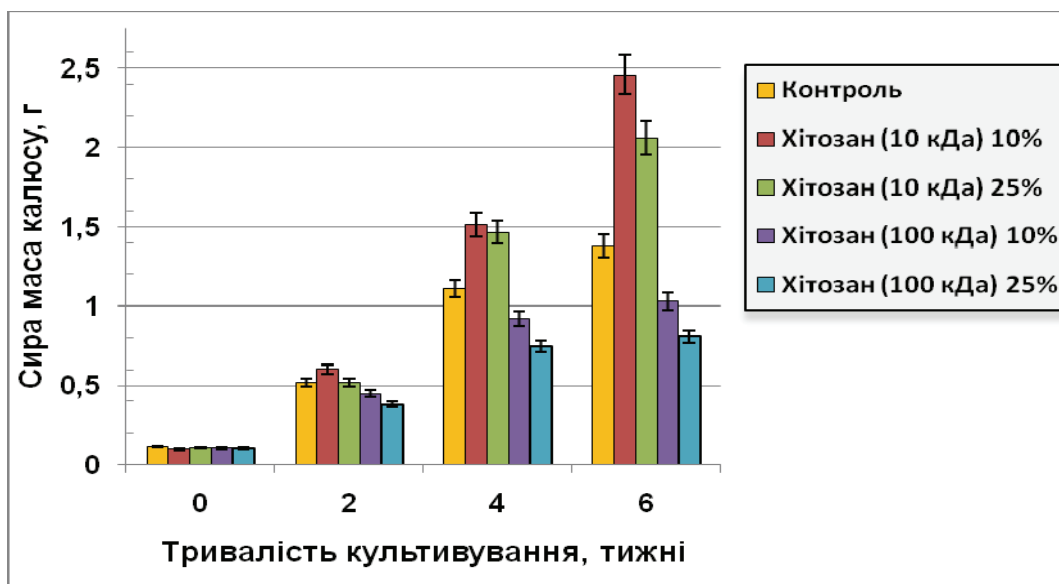


Рис. 1. Приріст маси калюсів на середовищах з різною концентрацією хітозану.

Проведені дослідження свідчать про стимулюючу дію низькомолекулярного хітозану (10 кДа) на ріст калюсних культур, та пригнічення даного показника високомолекулярним хітозаном (100 кДа), що виявляється в зниженні приросту біомаси.

При проведенні експериментів відмічено, що низькомолекулярний хітозан позитивно впливає на життєздатність калюсних культур і тим самим сприяє подовженню тривалості пасажу. У зв'язку з цим, калюсна тканина пшениці може залишатися без пересаджень до 1,5 місяця, тоді як в контролі не більше 4 тижнів.

Нами також досліджувався вплив низькомолекулярного хітозану (10 кДа) на регенераційну здатність калюсних культур пшениці. Препарат додавали в регенераційне середовище в концентраціях 2,0; 5,0; 10,0; 25,0; 50,0; 100,0 мкг/мл. При низькому вмісті препарату (2,0 та 5,0 мкг/мл) не виявлено достовірних відмінностей від контролю за частотою пагоноутворення (рис.2).

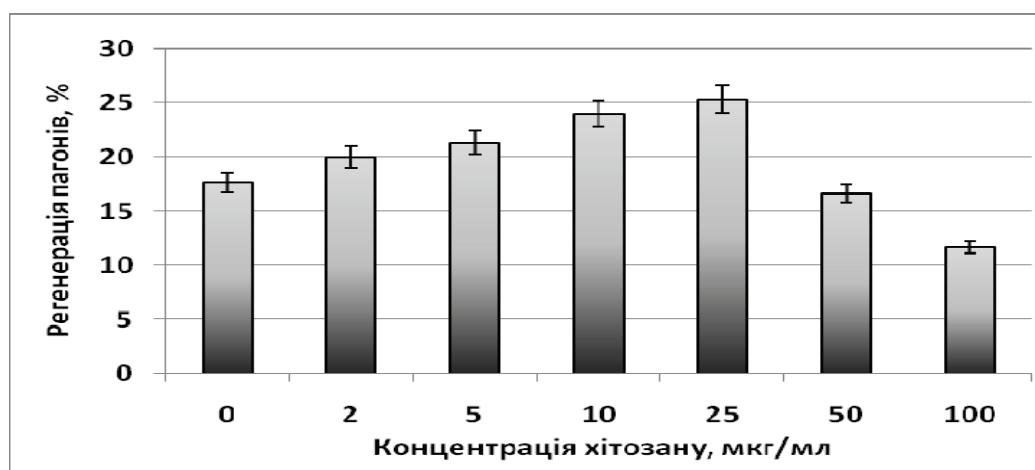


Рис. 2. Вплив різних концентрацій хітозану на регенерацію пагонів зкалюсних культур пшениці.

При високих дозах хітозану (50,0 та 100,0 мкг/мл) спостерігалось погіршення фізіологічного стану калюсів і регенераційна здатність калюсних культур істотно знижувалась. Достовірно підвищення регенераційних процесів виявлено при наявності у поживному середовищі полісахариду у концентрації 25 мкг/мл. Подібний вплив низькомолекулярного хітозану на процеси морфогенезу спостерігався і у інших

культур - при регенерації з калюсу моркви й регенерації пагонів у суниці [10], мікроклональному розмноженні орхідеї [11].

Морфогенні зони починали формуватися вже після першого тижня культивування на регенераційному середовищі з вмістом хітозану 10 та 25 мкг/мл, в той час, як у контролі тільки після двох тижнів вирощування. На регенераційному середовищі в калюсах відмічено наступні шляхи морфогенезу: органогенез по типу гемморизогенезу (формування бруньки та кореня), ризогенез (формування кореня) та соматичний ембріогенез – формування соматичних зародків. Пагони починали розвиватися з морфогенних зон після двох - трьох тижнів культивування.

Таким чином, дослідження впливу хітозану на калюсоутворення з експлантів верхівки пагона проростків пшениці, ріст калюсних культур, процеси регенерації пагонів показало, що процеси морфогенезу залежать від концентрації полісахариду в середовищі і його молекулярної маси. Відповідно до отриманих результатів, хітозан з молекулярною масою 10 кДа має здатність стимулювати ріст калюсних культур та регенерацію пагонів в концентрації 25 мкг/мл.

Література

1. *Hirano S.* Applications of chitin and chitosan in the ecological and environment fields // In: M.F.A. Goosen (Ed.), Application of Chitin and Chitosan. - 1997.- P. 31-54.
2. *Devlieghere F., Vermeulen A, Debevere J.* Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables // Food Microbiol. - 2004. - P. 703-714.
3. *Sukwattanasinitt M., Klaikherd A., Skulnee K., Aiba S.* Chitosan as a releasing device for 2,4-d herbicide// In: T. Uragami, K. Kurita, T. Fukamizo (Ed.) Chitin and Chitosan in Life Science. - 2001. - P. 142-143.
4. *Азовцева Н.А., Францев В.В., Лазарева Е.В.* Перспективность использования хитозана для повышения эффективности фиторемедиации почв, загрязненных медью // Исследовано в России-2006.- С.1257-1260.
5. *Chibu H., Shibayama H.* Effects of chitosan applications on the growth of several crops // In: T. Uragami, K. Kurita, T. Fukamizo (Ed.) Chitin and Chitosan in Life Science. - 2001.- P. 235-239.
6. *Hadwiger L., Klosterman S., Choi J.* The mode of action of chitosan and its oligomers in inducing plant promoters and developing disease resistance in plants // In: K. Suchiva, S. Chandkrachang, P. Methacanon, M.G. Peter (Eds.), Advances in Chitin Science.- 2002.- vol. 5.- P. 452-457.
7. *Pospieszny H., Chirkov S., Atabekov J.* Induction of antiviral resistance in plants by chitosan // Plant Sci. 1991.- v.79.- P.63-68.
8. *Struszczyk H., Pospieszny H.* New applications of chitosan and its derivatives in plant protection // In: M.F.A. Goosen (Ed.), Applications of Chitin and Chitosan, Technomic Publishing Co. - 1997.- P. 171-184.
9. *Stevens F.* Production of chitin and chitosan: refinement and sustain-ability of chemical and biological processing // In: T. Uragami, K. Kurita, T. Fukamizo (Eds.), Chitin and Chitosan in Life Science.- 2001.- P. 293-300
10. *Luan L., Ha V., Hai L., Hien N., Nagasawa N., Yoshii F., Kume T.* Study on the biological effect of irradiated chitosan on plant in tissue culture // In: T. Uragami, K. Kurita, T. Fukamizo (Ed.) Chitin and Chitosan in Life Science.- 2001.- P. 468-474.
11. *Nge K., Nwe N., Chandkrachang S., Stevens W.* Chitosan as a growth stimulator in orchid tissue culture // Plant Sci. - 2006.-v.170.- P. 1185-1190.

Резюме

Досліджено вплив хітозану на ріст та розвиток калюсної тканини пшениці. Показано, що процеси морфогенезу залежать від концентрації полісахариду в поживному середовищі і його молекулярної маси. Хітозан з молекулярною масою 10 кДа виявився більш ефективним порівняно з препаратом більш високої молекулярної

маси (100 кДа). Низькомолекулярний хітозан (10 кДа) має здатність стимулювати ріст калюсних культур та регенерацію пагонів у концентрації 25 мкг/мл.

Исследовано влияние хитозана на рост и развитие каллусной ткани пшеницы. Показано, что процессы морфогенеза зависят от концентрации полисахарида в питательной среде и его молекулярной массы. Хитозан с молекулярной массой 10 кДа оказался более эффективным в сравнении с препаратом с большей молекулярной массой (100 кДа). Низкомолекулярный хитозан (10 кДа) имеет способность стимулировать рост каллусных культур и регенерацию побегов в концентрации 25 мкг/мл.

The effect of chitosan on the growth and development of callus tissue of wheat was investigated. It is shown, that processes of morphogenesis depend on concentration of polysaccharide in a nutrient medium and its molecular weight. Chitosan with molecular weight 10 kDa it has appeared more effective in comparison with a preparation high molecular weight (100 kDa). Low-molecular chitosan (10 kDa) has ability to stimulate growth callus cultures and regeneration of shoots in concentration 25 mkg/ml.

БІЛИНСЬКА О.В.

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

ПРОЯВ ГЕНОТИПНИХ ОСОБЛИВОСТЕЙ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО АНДРОГЕНЕЗУ IN VITRO У ЯЧМЕНЮ В ЗАЛЕЖНОСТІ ВІД ЕЛЕМЕНТІВ ТЕХНОЛОГІЇ ГАПЛОЇДНОЇ ІНДУКЦІЇ І УМОВ ВИРОЩУВАННЯ ДОНОРНИХ РОСЛИН

Численні літературні джерела, присвячені теоретичним і практичним аспектам культивування *in vitro* пиляків та ізольованих мікроспор ячменю і інших видів сільськогосподарських рослин, переконливо свідчать про те, що генотипна залежність гаплопродукційного процесу є найбільш серйозною перешкодою для широкого впровадження гаплоїдної технології у селекцію [1, 2]. З огляду на це, велика увага приділяється дослідженню генетичного контролю андрогенезу *in vitro* – явища, яке полягає у індукції багаторазового поділу мікроспор з подальшим формуванням калюсу, ембріоїдів і регенерації гаплоїдних рослин [3, 4].

Разом з тим встановлено, що ступінь завершеності морфогенетичної програми, яка „запускається” при андрогенезі *in vitro*, залежить від багатьох чинників негенетичної природи, зокрема, умов вирощування рослин-донорів пиляків, режиму і способу попередньої обробки колосся, складу штучного живильного середовища, температурно-світлового режиму культивування *in vitro* [5].

Вплив цих чинників є настільки очевидним, що деякі дослідники роблять припущення, згідно з яким причина генотипних відмінностей за здатністю продукувати андрогенні гаплоїди полягає лише у відсутності адекватних умов проведення дослідів [6]. При цьому постулюється як можливість розробки універсальної технології гаплоїдної індукції [6], так і необхідність пошуку спеціальних методичних прийомів для певних генотипів [7].

Таким чином, питання щодо стабільності прояву генотипних особливостей за морфогенетичною реакцією у культурі пиляків *in vitro* дотепер не можна вважати остаточно з'ясованим. На нашу думку, особливої гостроти це питання набуває у зв'язку з застосуванням молекулярно-генетичних маркерів для вивчення генетичних основ експериментального андрогенезу *in vitro*, адже необхідною умовою молекулярно-

генетичного маркування ознаки є наявність об'єктивних даних щодо її фенотипної і генотипної мінливості.

Метою досліджень було вивчення мінливості за здатністю до утворення андрогенних структур і рослин-регенерантів у культурі пиляків *in vitro* ярого ячменю в залежності від варіювання умов вирощування вихідного матеріалу, його попередньої обробки низькою позитивною температурою та складу штучного живильного середовища для культивування пиляків, а також порівняльна оцінка ефективності окремих елементів технології гаплоїдної індукції.

Матеріали та методи

Як модельні генотипи в експериментах з удосконалення технології отримання гаплоїдів у культурі пиляків *in vitro* використано сорти ярого ячменю Екзотик, Фенікс і лінію ДГ00-126, які характеризуються контрастною здатністю до андрогенезу *in vitro*. Зокрема, сорт Фенікс має низьку здатність до утворення андрогенних структур і рослин-регенерантів. Сорту Екзотик притаманні високий вихід новоутворень і низька частота регенерації зелених рослин, а лінії ДГ00-126 – високий рівень усіх показників гаплопродукції з переважанням серед регенерантів нормально пігментованих рослин.

Рослини-донори пиляків вирощували на дослідній ділянці. Узагальнено результати експериментальних досліджень, одержані у 2001-2007 рр., які різнилися за комплексом агрометеорологічних факторів.

Добір колосся, попередню обробку і одержання асептичної культури пиляків проводили, як описано раніше [8]. У дослідях з оптимізації попередньої обробки пиляки висаджували на розроблене нами індукційне середовище NMSмод.2 [9], яке також слугувало контролем у експериментах з удосконалення складу живильних середовищ.

Порівнювали багаторічні дані (ліміти і середнє значення): з культивування пиляків трьох згаданих вище генотипів на середовищі NMSмод.2 за обробки погонів у воді, з дослідження кількох режимів і способів попередньої обробки [10] за культивування пиляків на середовищі NMSмод.2 та оцінки кількох штучних живильних середовищ, які різнилися за мінеральною основою, стимуляторами росту [11] та гелеутворюючими речовинами [12].

Ефективність експериментального андрогенезу *in vitro* визначали за кількістю морфогенних пиляків і зелених рослин-регенерантів у відсотках від кількості культивованих пиляків. Експериментальні дані оброблено за допомогою загальноприйнятих методів варіаційної статистики.

Результати і обговорення

Як видно з наведених у таблиці багаторічних даних, характер варіювання кількісних показників андрогенезу *in vitro* під дією агрометеорологічних умов року, режиму та способу попередньої обробки колосся і складу живильного середовища повною мірою відображав генотипні особливості, залучених до експерименту сортів і ліній.

Таблиця

Мінливість показників ефективності гаплопродукційного процесу у ярого ячменю в залежності від умов року, попередньої обробки та зміни складу штучного живильного середовища для культивування пиляків *in vitro* (2001-2007 рр.)

Генотип	Джерело варіювання						Серед- не
	умови вирощування (рік)		режим і спосіб попередньої обробки		живильне середовище		
	Ліміти						
	min	max	min	max	min	max	
Кількість морфогенних пиляків, %							

Фенікс	3,08± 0,67	10,61± 1,15	0,28±0,28	16,07±1,64	2,22±0,83	16,84±1,90	6,56± 0,19
Екзотик	33,80± 1,88	48,78± 1,78	4,15±1,17	45,81±2,63	13,98±1,82	53,96±3,51	34,42± 0,38
ДГ00- 126	30,03± 2,63	60,26± 2,51	38,92±2,40	56,88±2,37	22,77±1,87	50,99±3,29	31,34± 0,43**
Частота регенерації зелених рослин, %							
Фенікс	0,00± 0,00	1,95± 0,58	0,00±0,00	10,92±1,40	0,00±0,00	5,60±1,22	1,60± 0,09
Екзотик	1,02± 0,35	7,47± 1,29	0,00±0,00	22,06±2,25	0,00±0,00	32,93±2,98	4,82± 0,17**
ДГ00- 126	22,10± 2,12	33,63± 1,88	33,26±2,26	63,68±2,37	5,52±1,26	52,49±2,88	22,60± 0,39

Примітка. ** Різниця між середніми генотипів по трьох факторах істотна при $P \leq 0,01$. Напівжирним шрифтом відмічено максимальні показники для кожного генотипу.

При цьому розмах варіювання залежав від абсолютного значення показника. Зокрема, за кількістю ембріогенних пиляків найменше варіювання при найнижчому рівні прояву ознаки було відмічено у сорту Фенікс. У цього генотипу було отримано і найменшесереднє значення по трьох досліджених факторах.

У сорту Екзотик і лінії ДГ00-126 за найбільш сприятливих умов вирощування донорних рослин та у кращих варіантах дослідів з удосконалення попередньої обробки і складу живильного середовища одержано досить високі показники кількості ембріогенних пиляків (на рівні 45–60 %). Слід зазначити, що у сорту Екзотик порівняно з лінією ДГ00-126 спостерігалось більше зниження показника у варіантах дослідів, в яких виявлено негативний вплив певних чинників на процес індукції новоутворень.

Аналогічні закономірності варіювання відмічені і для ознаки „частота регенерації зелених рослин”.

Заслуговує на увагу питання щодо найбільш результативного методичного прийому, завдяки якому вдалося отримати максимальні показники гаплопродукції у кожного генотипу і в середньому для усіх генотипів.

Аналіз даних таблиці свідчить про те, що у сорту Фенікс максимальний вихід ембріогенних пиляків (близько 16 %) був досягнутий за рахунок оптимізації складу штучного живильного середовища і попередньої обробки колосся. Що стосується частоти регенерації зелених рослин, то найбільш результативним чинником для цього генотипу виявилася попередня обробка.

У сорту Екзотик і лінії ДГ00-126 за оптимальних параметрів усіх трьох досліджених факторів було отримано значення частоти ембріогенних пиляків, які не мали істотних відмінностей. Для лінії ДГ00-126 найбільш ефективним фактором підвищення частоти регенерації зелених рослин була попередня обробка колосся у 0,3 М розчині манітолу (2007 р.), за якої вихід зелених рослин збільшився з 31,29 до 63,68 %, а для сорту Екзотик – штучне живильне середовище з заміном агар-агару Д2 (2006 р.), на якому було отримано частоту регенерації рослин на рівні 32 %, що майже у 4 рази перевищувало цей показник у контролі.

Порівняння середніх значень кількості ембріогенних пиляків і частоти регенерації зелених рослин для трьох генотипів по кожному фактору (дані не наведено) показало відсутність значної переваги жодного з них, що, безумовно, пов'язано з залученням даних, отриманих в усіх варіантах дослідів, в тому числі тих, де результат був негативним. Очевидно, що для оцінки результативності досліджень з удосконалення певного елементу технології слід враховувати в першу чергу дані дослідних і контрольних варіантів експерименту одного року, беручи до уваги якість

вихідного матеріалу, а потім випробовувати кращі варіанти у роки з різними погодними умовами.

Слід зазначити, що аналіз даних по кожному експерименту окремо показав збереження співвідношення між показниками гаплопродукції генотипів, незважаючи на значне зростання кількісних характеристик андрогенезу *in vitro* під дією певних методичних прийомів. Співставлення середніх значень і лімітів по генотипам (табл.) також свідчить в основному про сталість рангів генотипів за кількістю ембріогенних пиляків і рослин-регенерантів, що підтверджує генотипну обумовленість андрогенезу *in vitro*.

Використані у дослідженнях генотипи різнилися за комплексом біологічних і господарсько цінних ознак. Незважаючи на те, що лімітуючим фактором для вирощування рослин-донорів пиляків була посуха, прямого зв'язку між посухостійкістю і здатністю до андрогенезу *in vitro* не виявлено. Навпаки, помітно менший розмах мінливості за ознаками культурабельності відмічено у більш гомеостатичного і посухостійкого сорту Фенікс, що, можливо, є відображенням неспецифічної стійкості цього генотипу до несприятливих умов довкілля.

Висновки.

Проведено аналіз багаторічних даних з удосконалення елементів технології гаплоїдної індукції. Характер мінливості показників гаплопродукції в залежності від умов вирощування рослин-донорів пиляків, режиму і способу попередньої обробки колосся та складу штучного живильного середовища свідчить про збереження рангів залучених до експерименту генотипів, що вказує на суттєвість генетичної складової у загальній мінливості і актуальність поглибленого вивчення механізму генетичного контролю ознак культурабельності.

Література

1. Choo T.M., Reinbergs E., Kasha K.J. Use of haploids in breeding barley // Plant Breeding Review. – 1985. – 3. – P. 219–252.
2. Білинська О.В. Особливості застосування культури пиляків *in vitro* для створення вихідного матеріалу в селекції ячменю // Науковий вісник НАУ. – аграрного університету. 2006. – № 100. – С. 13–19.
3. Manninen O.M. Association between anther-culture response and molecular markers on chromosomes 2H, 3H and 4H of barley (*Hordeum vulgare* L.) // Theor. Appl. Genet. – 2000. – 100. – P. 57–62.
4. Sarrafi A. Genetic control for embryo and haploid production and potential use of doubled haploid lines for QTLs in Cereals // Haploids in Higher Plants III: Abstracts of International Conference. – Vienna, 2006. – P. 28.
5. Manninen O. Optimizing anther culture for barley breeding // Agricultural and food Science in Finland. – 1998. – 6. – P. 389–398.
6. Kasha K.J., Simion E., Oro R., Yao Q.A., Hu T.C., Carlson A.R. An improved *in vitro* technique for microspore culture of barley // Euphytica. – 2000. – v.120, N 3. – P. 319–385.
7. Эмбриологические основы андроклинии пшеницы: атлас / Круглова Н.Н., Батыгина Т.Б., Горбунова В.Ю. и др. ; отв. ред И.И. Шамров. – М.: Наука, 2005. – 99 с.
8. 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.
9. Білинська О.В., Весна С.В., Манзюк В.Т. Застосування культури пиляків *in vitro* для створення вихідного матеріалу в селекції голозерного ячменю // Селекція і насінництво. – 2002. – вип. 86. – С. 164–172.
10. Білинська О.В. Культура пиляків *in vitro* як метод одержання вихідного матеріалу в селекції ячменю // Теоретичні основи селекції польових культур: Збірник наукових праць. – Х., IP ім. В.Я. Юр'єва УААН, 2007. – С. 174–186.

11. Білінська О.В. Підвищення ефективності експериментального андрогенезу *in vitro* у ячменю шляхом оптимізації попередньої обробки колосся в умовах низької позитивної температури // Фактори експериментальної еволюції організмів. – т. 3. – К.: Логос, 2006. – С. 437 – 441.

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

Резюме

Проведено оцінку мінливості показників гаплопродукції в залежності від умов вирощування рослин-донорів пиляків, режиму і способу попередньої обробки колосся та складу штучного живильного середовища. Збереження рангів залучених до експерименту генотипів за здатністю до андрогенезу *in vitro* свідчить про суттєвість генетичної складової у загальній мінливості і актуальність поглибленого вивчення механізму генетичного контролю ознак культурабельності.

Проведена оценка изменчивости показателей гаплопродукции в зависимости от условий выращивания растений-доноров пыльников, режима и способа предобработки колосьев и состава искусственной питательной среды. Сохранение рангов включенных в эксперимент генотипов по способности к андрогенезу *in vitro* свидетельствует о существенности генетической составляющей в общей изменчивости и актуальности изучения механизма генетического контроля культурабельности.

Evaluation of haploid production indicator variability caused by donor plant growth conditions, the regime and the mode of spike pretreatment and the nutrient medium composition has been carried out. Maintained ranks of genotypes including into the experiment show the importance of the genetic component in the whole variability and actuality of a profound investigation on the mechanism of a culturability genetic control

БЛАГОДАРОВА Т.А.¹, СИВОЛАПОВ А.И.², СИВОЛАПОВ В. А.²

¹ФГУП НИИ лесной генетики и селекции, Воронеж, Россия, Россия, 394087, Воронеж, ул. Ломоносова, 105, e-mail: mail@lesgen.vrn.ru

²Воронежская государственная лесотехническая академия, Россия, 394613, Воронеж, ул. Тимирязева, 8, e-mail: leskul@vglta.vrn.ru

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БИОТЕХНОЛОГИИ *IN VITRO* В ЛЕСОКУЛЬТУРНОЙ ПРАКТИКЕ БЫСТРОРАСТУЩИХ ДРЕВЕСНЫХ ПОРОД

В настоящее время наряду с традиционными приемами для воспроизводства ценных форм и сортов лесных древесных растений используют метод культуры изолированных органов и тканей (клональное микроразмножение растений). К преимуществам этого метода относятся: быстрота, исключение вирусных заболеваний, потребность в малом количестве инициальных эксплантов и ограниченных площадей, возможность круглогодичного продуцирования посадочного материала, продолжительная его сохранность при минимальных объемах холодильных камер, продуцирование многих тысяч посадочного материала в год [1].

Массовое воспроизводство генетически улучшенных форм древесных растений с помощью культуры тканей способствует повышению качественного состава лесонасаждений за счет получения клоновых растений, устойчивых к болезням и вредителям, стрессовым и техногенным факторам [2], ускоряет воспроизводство лесных ресурсов (позволяет получать генетически улучшенный материал на 10 – 16 лет раньше, чем при обычных условиях) [3].

Положительные результаты по клональному микроразмножению взрослых деревьев получены для некоторых видов тополя, осины, березы, вяза, туи, эвкалипта, ивы и др. пород, у которых хорошо выражена регенерационная способность. У этих пород в культуре *in vitro* удалось увеличить коэффициент микроразмножения до 10^5 – 10^7 растений в год, что в несколько тысяч раз больше, чем при использовании традиционных методов вегетативного размножения. Использование метода культуры тканей позволяет с достаточной эффективностью проводить микрклональное размножение березы, ольхи и тополя [4 - 13].

В последние годы особую значимость приобретают плантационные культуры березы, ольхи и тополя с коротким периодом ротации на получение мелкотоварной древесины для целей прессования и получения целлюлозы, в связи с высокой эффективностью ее использования.

В лаборатории генетики НИИЛГиС впервые в Центрально-Черноземном районе начаты исследования по микрклональному размножению ольхи черной и серой, тополя сереющего и березы.

Материалы и методы

Материалы исследований – быстрорастущие древесные породы средней полосы России: ольха черная (*Alnus glutinosa* (L.) gaertn.), ольха серая (*Alnus incana* (L.) moench), *Betula verrucosa* (Ehrh.) and *Betula verrucosa* f. *carelica* hort., *Populus canescens* (Sm.).

Методика исследований. Наряду с прямой регенерацией побега из почки, опробировали способ получения регенерантов из каллусных культур.

В первом случае экспериментами явились сегменты с одной почкой на стадии зеленого конуса.

Для каллусных культур ольхи и березы эксплантами служили стеблевые сегменты без почек, листья, листовые черешки.

В качестве базовых сред использовали MS и WPM [4] и их модификации с различным содержанием и соотношением регуляторов роста (6-БАП, ИУК, НУК, ИМК). При прямой регенерации использовали 6-БАП (0,2-1,5 мг/л), индукции множества почек и побегов – 6-БАП в сочетании с НУК (0,2-0,5 мг/л).

Для микрклонального размножения березы использованы: мелкоромбовидно-трещиноватая форма березы повислой воронежского происхождения, продольно-трещиноватая форма березы повислой киевского происхождения и высокоствольная форма березы карельской.

Проведено также микрклональное размножение трудноукореняемых новых сортов тополя сереющего: Хоперский 1 и Приярский 1. Эти тополя характеризуются выраженным гетерозисом по продуктивности и качеству древесины.

Специальные эксперименты проделаны со всем регенерированным материалом ольхи и березы с целью усиления эффекта укоренения. Они предусматривали предобработку раствором ИМК (0,2-0,5 мг/л) в течение 5 минут базального (бокового) конца побега или апикального (АК). Контрольными были побеги без предобработки, питательные среды в этом случае использовали без добавления ИМК. (Исследования показали, что ИМК в среде, увеличивала количество укорененных побегов, резко снижала качество укоренения).

Адаптация регенерантов проводилась в микротеплицах и открытом грунте. технологии микрклонального размножения изучаемых древесных пород (ольхи, березы и тополя) отличаются.

Результаты и обсуждение

Успешное развитие регенерантов ольхи говорит о возможности массового получения посадочного материала.

Исследования проведены в 2-х направлениях – оптимизация условий микрклонального размножения ольхи *in vitro* и определение подходов к созданию системы

методов регенерации ольхи на основе культуры *in vitro* различных эксплантов (помимо почек, стеблевых сегментов, листьев, черенков).

Процессы регенерации в сравнительном плане у эксплантов разных органов ольхи на данный момент мало изучены. Нами исследовано проявление способности каллусогенеза сегментов стеблей, черешков листьев, листьев.

Способность к регенерации каллуса наиболее выражена у стеблевых сегментов, наименее (вплоть до полного отсутствия ткани) у листьев. Из ряда испытанных регуляторов роста, традиционно используемых для индукции каллуса [4] (2,4Д, НУК, ИУК, МК) на темп и интенсивность этого процесса у ольхи заметно влияет ИМК (2 мг/л). Концентрация определена экспериментальным путем: для черешков она явилась стимулирующей, тогда как стеблевые сегменты образуют каллус и при более низком содержании ИМК (0,5 мг/л) в среде. Листья во всех вариантах имели низкие показатели каллусообразования.

Морфогенные культуры получены с помощью аналогичных сред, дополненных 6-БАП. Уменьшением содержания 6-БАП до 0,6 мг/л добивались индукции побегов у ольхи черной, почек и корней – у ольхи серой. Следует отметить, что регенеранты получены в культурах стеблевого происхождения. В случае черешков и листьев отмечены начальные этапы морфогенеза (зеленые меристематические очаги, корни, единичные почки). Эти данные позволили провести сравнительный анализ эффективности морфогенеза у культур различного происхождения: а – каллусных, б – вегетативных почек в зависимости от содержания БАП в среде WPM.

При общей тенденции к небольшим концентрациям 6-БАП (opt_{im}=0,6 мг/л) отмечены более низкие морфогенетические возможности каллусных культур (40% по сравнению с 70% у черной ольхи и 8,3% по сравнению с 41% - у серой). Однако по морфологическим показателям регенерируемые побеги не отличались друг от друга у обеих форм ольхи. Продолжительность жизни морфогенных культур ольхи по сравнению с другими листовыми (тополь, береза) значительно ниже и ограничена 2-3 неделями.

Для их сохранения необходимо повторное рекультивирование. В противном случае независимо от происхождения, в культурах отмечен интенсивный рост каллусной ткани, как правило, подавляющий развитие побега.

Хороший рост, приживаемость, а также сохранность к концу вегетационного периода регенерантов различного происхождения (каллусные культуры, узловыи сегменты) показывает достаточно высокую степень их жизнеспособности и возможности успешной адаптации в открытом грунте.

Для микроклонального размножения березы достаточно эффективным было сочетание следующих способов: активация развития основного (первичного) побега из пазушной почки или индукция дополнительных адвентивных почек с последующим их черенкованием, а также мультипликации вновь образовавшихся на этих черенках пазушных побегов и целых растений.

Использование данного способа позволило существенно увеличить выход растений-регенерантов березы из ограниченного количества исходных эксплантов.

Выявлены факторы, способствующие увеличению количества индуцированных побегов от одного экспланта березы и их эффективному росту, что в дальнейшем определило многочисленность клона и его жизнеспособность.

Из трех испытанных питательных сред (различающихся соляным и гормональным составом) лучшей средой для первичного культивирования эксплантов березы воронежского происхождения и березы карельской была среда Буле с БАП 0,5 мг/л и ИУК 0,5 мг/л; для березы киевского происхождения – 1/2 питательной среды Мурасиге и Скуга с БАП (0,5 – 1 мг/л).

После доращивания и адаптации в теплице саженцы-регенеранты березы, ольхи и тополя использовали для закладки плантационных культур. Весной 1996 года в

квартале 26 Конь-Колодезного лесничества заложены испытательные культуры регенерантами березы повислой воронежского и киевского происхождения а также березы карельской. Впервые в ЦЧР заложены испытательные культуры регенерантами тополя Хоперский 1 и черенками триплоидного тополя бальзамического, полученного Е.М. Гуляевой в НИИ лесной генетики и селекции. Культуры созданы редкой посадкой (3 × 6 м) по раскорчеванной вырубке, в лесорастительных условиях С₂ - С₃. Почвы - серые лесные супесчаные. Учет состояния (жизнеспособности) показал, что все растения – регенеранты, черенковые саженцы и сеянцы хорошего состояния.

Выводы

Показана возможность создания системы методов регенерации ольхи, березы и тополя сереющего на основе культуры *in vitro* различных эксплантов (узловых сегментов, каллусных культур стеблевых сегментов, листьев, черешков).

Определены условия дорастивания регенерируемого материала для успешного его перевода в открытый грунт.

Положительные результаты анализа динамики и степени развития регенерантов в открытом грунте в течение десяти лет подтверждают перспективность метода культуры ткани как для массового воспроизводства, так и для сохранения ценного генофонда лесных древесных растений.

Опыт создания культур ольхи, березы и тополя регенерантами, полученными *in vitro* в Центральном-Черноземном районе России, показал возможность размножения и создания плантационных культур.

Литература

1. *Biondi S.* Practical applications of *in vitro* propagation: present situation and future prospects // *G. Bot. ital.* – 1986. - 120. - № 1 – 6 – P. 29 – 42.
2. *Rutledge G. B.* Culture of meristeme tips and microsporogation of 12 commercial clones of poplars *in vitro* / *G. B. Rutledge, G.C. Douglas* // *Physiol. plant.* – 1988. – 72. - № 2. – P. 367 – 373.
3. *Sadiq Hasnain* . Tissue culture in forestry: economic and genetic potential / *H. Sadiq. C. William* // *Forest. Chron.* – 1986. – 62. - № 4. – P. 219 – 225.
4. *Ryyänen L.* Propagation of adult curlybirch succeeds with tissue culture / *L. Ryyänen, M. Ruynanen* // *Silvae fenn.* – 1986. – 20. - № 2. – P. 139 – 147.
5. *Бутова Г.М.* Способ микроклонального размножения карельской березы / *Г.М. Бутова, Т.М. Табацкая, Л.Л. Скробова* // *Авт. св. 1597386 СССР, МКИ, 12, опубл. 7.10.90. Бюл. № 37.*
6. *Chalupa V.* Micropropagation of malure trees of Birch (*Betula pendula*) and aspen (*Populus tremula*) // *Lesnictvi.* – 1989. – 3. - № 11. – P. 983 – 993.
7. *Старова Н.В.* Культура изолированных почек и микроразмножение лесных древесных растений / *Н.В. Старова, Р.К. Бомбурина, З.Х. Хайрулина* // *Лесная генетика, селекция и физиология древесных растений.* – М., 1989. – С.165 – 167.
8. *Попов В.К.* Регенеранты березы и тополя, полученные *in vitro* в плантационных культурах под Воронежем / *В.К. Попов, Т.М. Табацкая, А.И. Сиволапов* // *Биотехнология в ФЦП «Интеграция»: тез. докл. заочной н.-практ. конф.* – С.-Пб., 1999. – С. 36 – 37.
9. *Sbay M., Guillot I., Danthu P., Prat D.* *In vitro* propagation of interspecific hybrids in alnus // *Ann. Sci forest.* - 1989. - 46. - p. 155-157.
10. *Viera-Aarnio, Ruynanen L.* Growth, crown structure and seed production of birch seedlings, grafts and micropropagated plants // *Silvae Fennica.* - 1995. - V. 29, №1. - p.3-12.
11. *Яцына А.А., Концевая И.И.* Перспективы использования методов культуры клеток и тканей в селекции лесных древесных растений // *Лесная наука на рубеже 21 века.* - Гомель, 1997. - Вып. 49. - с. 127-130.
12. *Табацкая Т.М., Благодарова Т.А., Сиволапов А.И.* Микроклональное размножение ольхи черной и серой. Санкт-Петербург.-1999.- С. 39 - 40.

13. Сиволапов В.А. Получение регенерантов *in vitro* березы для создания лесных культур / В.А. Сиволапов, Т.М. Табацкая, А.И. Сиволапов, А.И. Чернодубов // Восстановление эколого-ресурсного потенциала агролесобиоценозов, лесоразведение и рациональное природопользование в Центральной лесостепи и юге России: сб. науч.-исслед. работ / под ред. авторов; ГОУ ВПО «ВГЛТА», 2007. – С. 157-160.

Резюме

Показаны результаты использования биотехнологии *in vitro* для размножения ценных форм ольхи черной и серой, березы повислой и карельской, тополя сереющего. Получены регенеранты, проведена адаптация в открытом грунте, созданы культуры тополя, ольхи и березы в лесхозах Воронежской области

There were shown the results of the use of *in vitro* biotechnology for the propagation of valuable forms of *Alnus glutinosa* and *Alnus incana*, *Betula verrucosa* and *Betula verrucosa f. carelica*, *Populus canescens*. There were received regenerates, carried out adaptation in field conditions, established same cultures of alna, betula and poplar in the forest rangers of Voronech region.

БУГАРА А.М., ЮРКОВА И.Н., ТЕПЛИЦКАЯ Л.М., БУГАРА И.А., ПАНОВ Д.А.
Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, Украина АР Крым,
95007, г. Симферополь, просп. Вернадского 4
e-mail: nanasilver@rambler.ru

ПОЛУЧЕНИЕ КАЛЛУСНЫХ КУЛЬТУР ФАТСИИ ЯПОНСКОЙ (*FATSIA JAPONICA* DECHE. ET PLANCH) И АНАЛИЗ В НИХ ТРИТЕРПЕНОВЫХ ГЛИКОЗИДОВ

Растения способны синтезировать и накапливать различные вещества вторичного метаболизма, многие из которых представляют интерес для фармакологии. В качестве источников лекарственного сырья используются, как правило, дикорастущие виды. Плантационное выращивание лекарственных растений, содержащих вторичные метаболиты, далеко не всегда дает положительные результаты. При плантационном выращивании может значительно снижаться содержание вторичных метаболитов, а многие растения тропической и субтропической флоры практически не возможно выращивать вне этих климатических зон [1].

Фармацевтическая промышленность может рентабельно использовать вторичные метаболиты, которые синтезируются и накапливаются в клетках культивируемых *in vitro*. Использование клеточных культур для получения вторичных метаболитов имеет ряд преимуществ. Они базируются на возможности получения и использования экологически чистого сырья, управления процессом биосинтеза, создания клеточных культур сверхпродуцентов, накапливающих вторичные метаболиты в значительно больших количествах, чем интактные растения [1,2].

Фатсия японская (*Fatsia japonica* Deche. et Planch) – ценное лекарственное растение, которое содержит целый ряд биологически активных веществ: тритерпеновые гликозиды, протокатехиновую кислоту, холин, танины, эфирное масло и др. Это растение издавна используется в народной медицине как тонизирующее средство и анальгетик при болях в суставах, ревматизме и гастрите. На основе растительной массы фатсии выпускается лекарственный препарат "Фатцифлогин", обладающий противовоспалительным действием. Фатсия японская не выращивается как плантационное растение. В этой связи представляет интерес получение клеточных культур данного вида, как потенциального источника сырья для получения биологически активных веществ.

Целью настоящей работы заключалась в подборе условий получения каллусных культур фатсии японской и анализе в них тритерпеновых гликозидов.

Материалы и методы

Материалом для исследования служили растения фатсии японской, выращиваемые в условиях закрытого грунта. В качестве эксплантов для получения каллусных культур использовали сегменты молодых листьев и черешков листа. Растительный материал поверхностно стерилизовали 50%-ным раствором препарата брадофен в течение 10 минут, а затем трижды промывали автоклавированной дистиллированной водой. В стерильных условиях ламинарного бокса экспланты помещали на поверхность различных модификаций агаризованной питательной среды Мурасиге и Скуга [3], дополненной 2,4-дифенилуксусной кислотой (2,4-Д) и 6-бензиламинопурином (БАП). Экспланты культивировали в темноте и при освещенности 4-5 тыс. люкс (фотопериод 16 часов), температуре 22-24° С и относительной влажности воздуха 60-70 %.

В качестве культуральных сосудов использовали химические пробирки 2x20 см, содержащие 10 мл питательной среды. На каждый вариант питательной среды было высажено по 20 эксплантов определенного типа в трёхкратной повторности. Частоту каллусообразования оценивали в процентах по количеству эксплантов, давших каллус, от общего числа эксплантированных. Субкультивирование проводили через 21 день, при этом масса транспланта составляла около 100 мг. Для субкультивирования использовали восемь модификаций питательной среды Мурасиге и Скуга: оптимальную для индукции каллусообразования, безгормональную и среды, дополненные 2,4-Д, БАП и гибберелловой кислотой в различных концентрациях. Прирост сырой биомассы определяли в процентах от исходной в конце цикла выращивания культуры.

Для определения тритерпеновых гликозидов использовали метод тонкослойной хроматографии [4]. Каллусные культуры второго пассажа, индуцированные из листовых сегментов, находящиеся в стационарной фазе роста, высушивали при комнатной температуре и измельчали в ступке. Сумму тритерпеновых гликозидов экстрагировали изопропанолом. Смесь нагревали на водяной бане до температуры кипения изопропанола. На хроматографические пластины "Sorbfil" наносили по 0,2 мл смеси в потоке теплого воздуха. Разделение гликозидов на фракции проводили в системе растворителей хлороформ : метанол : вода = 100 : 30 : 5. Пластины высушивали и обрабатывали 20% раствором фосфорновольфрамной кислоты, а затем проявляли при температуре 100 – 120°С в течение нескольких минут. В качестве контроля использовали водно-спиртовой экстракт из листьев фатсии японской.

Результаты и обсуждение

При введении в изолированную культуру сегментов листьев и черешков листа фатсии японской индукция каллусогенеза наблюдалась на 12-14 сутки культивирования. Каллус имел светло-зеленую окраску и плотную консистенцию, при этом частота каллусообразования в значительной степени зависела от состава питательной среды и типа экспланта (табл.). Максимальная частота каллусообразования обнаруживалась на питательной среде, дополненной 1 мг/л 2,4-Д и составляла для эксплантов листовых сегментов 50, а для сегментов листовых черешков 70%. На питательных средах, дополненных БАП, наблюдалась тенденция к снижению частоты каллусообразования и она не превышала 40%.

Таблица

Частота каллусообразования в изолированной культуре фатсии японской в зависимости от типа экспланта и состава питательной среды

Типы и концентрации гормональных добавок в питательной среде, мг/л		Тип экспланта	Частота каллусообразования, %
2,4 -Д	БАП		

-	-	Сегменты листа	0
		Сегменты листового черешка	0
0,2	-	Сегменты листа	10,1±0,3
		Сегменты листового черешка	20,4±0,6
1	-	Сегменты листа	50,4±1,3
		Сегменты листового черешка	70,3±1,6
4	-	Сегменты листа	40,4±1,2
		Сегменты листового черешка	60,1±1,6
1	0,5	Сегменты листа	10±0,24
		Сегменты листового черешка	20±0,33
2	0,5	Сегменты листа	20,1±0,3
		Сегменты листового черешка	40,3±0,4
1	2	Сегменты листа	5,1±0,1
		Сегменты листового черешка	7,2±0,1

При субкультивировании была выявлена зависимость прироста биомассы каллусной культуры от состава питательной среды. Максимальный прирост биомассы наблюдался на питательной среде оптимальной для индукции каллусогенеза, содержащей 2,4-Д в концентрации 1 мг/л.

Использование метода тонкослойной хроматографии позволило выявить в интактных листьях фатсии 6 различных фракций монотерпеновых гликозидов, из которых – две фракции хедерагенина (синие-фиолетовые хроматографические зоны **C**, **F**), три фракции олеаноловой кислоты (хроматографические зоны розового цвета **A**, **D**, **E**) и одна фракция эхиноцистовой кислоты (хроматографические зоны розового цвета **B**). Установлено, что фракция **A** представляет собой 3-О- α -L- арабинопиранозид олеаноловой кислоты, фракция **B** – 3-О- α -L-арабинопиранозид эхиноцистовой кислоты, фракция **C** – 3-О- α -L-арабинопиранозид хедерагенина, фракция **D** – 3-О- α -L-рамнопиранозил-(1→2)-О- α -L-арабинопиранозид олеаноловой кислоты, фракция **E** – 3-О- β -D-глюкопиранозил-(1→2)-О- α -L-арабинопиранозид олеаноловой кислоты и фракция **F** – 3-О- β -D-глюкопиранозил-(1→2)-О- α -L-арабинопиранозид хедерагенина (рис).

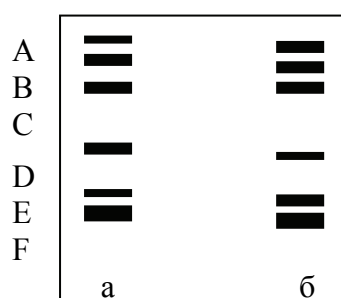


Рис. Хроматограммы фракций тритерпеновых гликозидов, содержащихся в интактных листьях (а) и каллусных культурах (б) фатсии японской

В каллусных культурах, индуцированных из листьев фатсии японской, были выявлены фракции гликозидов, характерные для интактных листьев. Причем концентрации 3-О- α -L-арабинопиранозид олеаноловой кислоты и 3-О- β -D-глюкопиранозил-(1→2)-О- α -L-арабинопиранозид олеаноловой кислоты в каллусе превышали таковую в листьях.

Таким образом, проведенные исследования позволили подобрать составы питательных сред и оптимальные типы эксплантов для получения каллусных культур

фатсии японской. Методом тонкослойной хроматографии показано присутствие в каллусных культурах, индуцированных из листьев, фракций тритерпеновых гликозидов, характерных для интактных органов. Изложенные результаты подтверждают уже известные факты о возможности получения клеточных культур растений, содержащих тритерпеновые гликозиды [2]. В последние годы аналогичные данные удалось получить для каллусных культур *Hedera helix* L., *Clematis vitalba* L., *Cyclamen persicum* Mill. [5-7]. При этом также удалось показать, что в каллусных культурах отдельные фракции тритерпеновых гликозидов могут обнаруживаться в более высоких концентрациях, чем в интактных органах.

Выводы

1. Подобраны составы питательных сред для индукции каллусогенеза в культуре листовых сегментов и черешков фатсии японской. Установлено, что максимальная частота каллусообразования наблюдалась на модифицированной питательной среде Мурасиге и Скуга, дополненной 1,0 мг/л 2,4-Д.

2. Методом тонкослойной хроматографии показано, что пассируемые каллусные культуры фатсии японской содержали фракции тритерпеновых гликозидов аналогичные таковым интактных листьев.

Литература

1. Бутенко Р.Г., Гусев М.В., Кидкин А.Ф. и др. Биотехнология. Клеточная инженерия.- М.: Высшая Школа, 1987. – 127 с.
2. Кунах В.А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. – К.: Логос, 2005.- 730 с.
3. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // *Physiol. Plant.* – 1962. – V. 15, № 13. – P. 473-497.
4. Шаршунова М., Шварц В., Михалец Ч. Тонкослойная хроматография в фармации и клинической биохимии. – М.: Мир, 1980. – 621 с.
5. Фазылов А.Р., Бугара А.М., Юркова И.Н. Горденко С.Л. Каллусные культуры плюща обыкновенного (*Hedera helix* L.) как источник тритерпеновых гликозидов // Ученые записки ТНУ. – 2006. – 19, №1. – С. 101-104.
6. Бугара А.М., Чмелева С.И., Сидякин А.И., Панов Д.А. Введение в культуру *in vitro* вегетативных органов ломоноса виноградолистного (*Clematis vitalba* L.) и анализ тритерпеновых гликозидов в каллусных культурах / Збірник наук. праць "Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології". – 2007. – Т.2– С. 457-462.
7. Юркова И.Н., Бугара А.М. Культивирование в условиях *in vitro* каллусной ткани цикламена – источника биологически активных веществ // Ученые записки ТНУ. – 2006. – 19, №1. – С. 113-117.

Резюме

Подобраны условия для получения каллусных культур фатсии японской. Химический анализ показал присутствие в каллусных культурах основных фракций тритерпеновых гликозидов характерных для интактных органов.

Подобрано умови отримання калусних культур фатсії японської. Хімічний аналіз показав присутність в калусних культурах основних фракцій тритерпенових глікозидів, які характерні для інтактних органів.

Conditions for inductions of *Fatsia japonica* callus cultures were obtained. The chemical analysis showed the presence in callus culture the main fractions of glycosides which are characteristic for intact organs.

ГУЗЕНКО Е.В.¹, ЛЕМЕШ В.А.¹, ЕМЕЦ А.И.², БЛЮМ Я.Б.², КАРТЕЛЬ Н.А.¹

¹Институт генетики и цитологии НАН Беларуси,

Беларусь, 220072, Минск, ул. Академическая, 27, e-mail: E.Guzenko@igc.bas-net.by

²Институт клеточной биологии и генной инженерии НАН Украины,

Украина, 03143, Киев, ул. Академика Заболотного, 148

ТРАНСФОРМАЦИЯ РАЗЛИЧНЫХ ГЕНОТИПОВ ЛЬНА-ДОЛГУНЦА С ПОМОЩЬЮ *Agrobacterium tumefaciens* : ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

Основные методы селекции льна-долгунца, базирующиеся на традиционных приемах – подборе пар для скрещиваний, гибридизации и отборе в расщепляющихся популяциях, остаются трудоемкими и длительными. Развитие методов культуры *in vitro* в совокупности с разработкой эффективных методов генетической трансформации может внести значительный вклад в создание современных сортов льна-долгунца и ускорить включение заданных ценных признаков в уже существующие генотипы. Генетическую трансформацию с помощью *Agrobacterium tumefaciens* довольно широко применяют у многих видов растений (зерновые, бобовые, крестоцветные и др.). Несмотря на то, что лен достаточно пластичный в биотехнологическом отношении вид, работы по агробактериальной трансформации льна, а в особенности льна-долгунца, - единичны [1, 2]. Это связано с тем, что информация о закономерностях регуляции органогенеза и эмбриогенеза у льна как биологического вида в целом, так и у его различных генотипов, остается достаточно ограниченной. Известно, что регенерация растений льна из протопластов [3, 4], семядолей [5], сегментов гипокотилей [6, 7], культуры пыльников [8, 9, 10, 11, 12] и изолированных микроспор [13], а также эффективность трансформации чужеродными генами в значительной степени зависят от выбранного генотипа, который определяет частоту образования морфогенного каллуса, эффективность регенерации проростков. Оптимизация условий культивирования и выявление наиболее отзывчивых сортов ускоряет процесс создания генетически модифицированных организмов.

Цель нашей работы состояла в проведении агробактериальной трансформации шести генотипов льна-долгунца.

Материалы и методы

В качестве исходного материала использовали 6 сортов льна-долгунца: 4 сорта районированных в Беларуси (Дашковский, Нива, Могилевский, Прамень) и 2 сортообразца переданных в Госсортоиспытание (Левит-1, Белита). Семена стерилизовали 70%-ным этиловым спиртом в течение 15 мин. Затем промывали стерильной водой 3 раза по 10 мин.

Эксплантами служили гипокотили 5-суточных проростков длиной 3 – 5 мм. Стерилизованные семена проращивали на агаре (8 г/л) при 23⁰ С и 16-ти часовом фотопериоде. Для индукции морфогенеза использовали среду MS 5524 дополненную фитогормонами: 1 мг/л ВАР (6-Benzyl-aminopurine) и 0,05 мг/л NAA (α -Naphthalene-acetic acid), приготовленную на воде, содержащей катионы Ca²⁺, Mg²⁺, Na⁺, K⁺ и анионы HCO₃, SO₄, Cl, pH 5,7-5,8. Гипокотили инкубировали при температуре 23⁰ С и 16-ти часовом фотопериоде.

Морфогенетический потенциал культуры оценивали как отношение количества каллусов с регенерационными структурами к общему количеству эксплантов, образовавших каллус. Эффективность регенерации определяли через 5 недель после начала культивирования как отношение количества побегов (более 5 мм длиной) к общему количеству эксплантов. Для оценки результатов использовали не менее 30 эксплантов каждого сорта с трехкратным повторением. Статистическую обработку полученных результатов проводили при помощи пакета анализа данных Microsoft Excel.

Агробактериальную трансформацию проводили с использованием высоковирулентного штамма *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404, несущего генетическую конструкцию GFP-TUA1. Сегменты 5-дневных проростков обрабатывали суспензией *Agrobacterium* в течение 1 ч., затем переносили на среду MS 5524 дополненную фитогормонами: 1 мг/л ВАР и 0,05 мг/л NAA. Через 24 ч гипокотили помещали на селективную среду, содержащую канамицин (50мг/л) и цефотаксим (500 мг/л). После трех недель культивирования на селективной среде экспланты переносили на среду для морфогенеза.

Результаты и обсуждение

Основа системы трансформации состоит в эффективной доставке векторных конструкций в клетки-мишени, компетентные к регенерации растений. Однако проникновение чужеродной ДНК приводит к повреждениям в клетке-хозяине и степень выживаемости растительной ткани при трансформации и селективном воздействии среды снижается. Следовательно, до проведения агробактериальной трансформации необходимо оценить морфогенетический потенциал и регенерационную способность генотипов и отобрать наиболее отзывчивые.

Первый этап работы заключался в оценке морфогенетического потенциала и регенерационной способности генотипов. Для получения культуры клеток и тканей анализируемых сортов нами в качестве эксплантов были выбраны гипокотили, так как ряд работ [6, 14] показывают, что данный тип экспланта является наиболее подходящим для успешной инициации каллуса, органогенеза и эмбриогенеза у *Linum usitatissimum*. Процессы дедифференциации у всех исследованных сортов проходили довольно быстро, и уже через неделю от начала культивирования на всех эксплантах формировался каллус, цвет которого варьировал от светло-зеленого до темно-зеленого, структура – от плотной до сахаристой. Спустя 10-12 суток на его поверхности формировались первые почки (рис.1а). В данных условиях культивирования исследуемые генотипы проявили неодинаковую способность к морфогенетическому ответу.

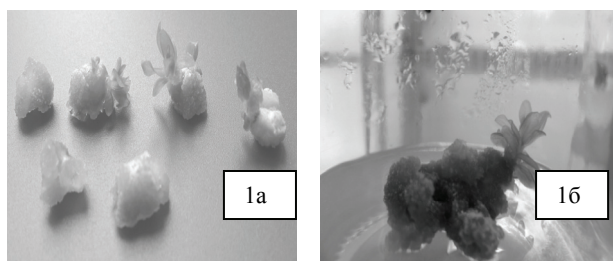


Рис.1. Регенерация побегов у льна-долгунца.

1а – виды каллуса сорта Прамень.

1б – формирование побега сорта Нива, после агробактериальной трансформации при культивировании на селекционной среде.

Анализ полученных данных об эффективности органогенеза в зависимости от генотипа показал, что наибольшее количество морфогенных каллусов образовалось у сорта Дашковский – 97%, а наименьшее у сортообразца Левит-1 – 43% (рис.2)

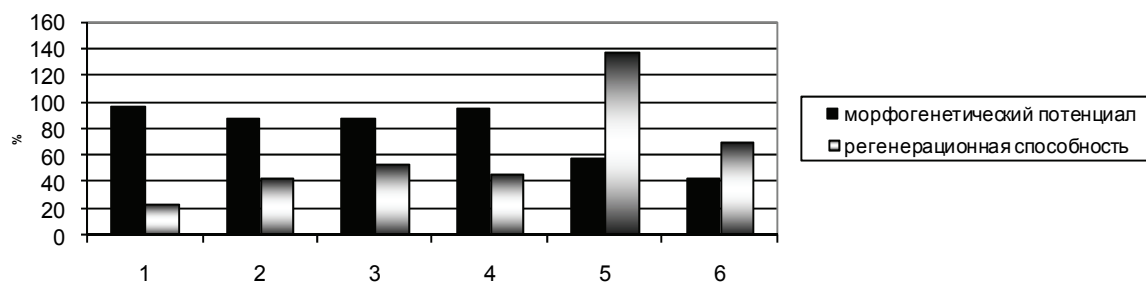


Рис.2. Эффективность морфогенеза и регенерации сортов и сортообразцов льна-долгунца. 1- Дашковский, 2 – Могилевский, 3 – Нива, 4 – Прамень, 5 – Белита, 6 – Левит-1.

При оценке регенерационной способности мы не учитывали точки инициации, так как наблюдения показали, что данные структуры не всегда развиваются в побеги. Несмотря на высокий уровень морфогенеза сорт Дашковский продуцировал наименьшее количество побегов длиной >5 мм – 23,3%. Наибольшая способность к регенерации наблюдалась у сортообразца Белита (137,3%). В ряде работ приводятся данные о том, что морфогенетический потенциал льна зависит от генотипа, который оказывает сильное влияние на дифференциацию клеток в культуре каллуса и последующую регенерацию растений [9, 11, 12], а также, что регенерационная способность сортов более 45% считается высокой и такие сорта предпочтительней использовать в программах с применением методов биотехнологии и генной инженерии [15]. Проведенная нами оценка морфогенетического потенциала и регенерационной способности 4 районированных сортов льна-долгунца и 2 сортообразцов льна-долгунца разных групп спелости также выявила существенную зависимость от генотипа. Установленная частота регенерации сортов Могилевский (43,5%), Нива (54,3%), Прамень (46,2%), Белита (137,2%), Левит-1 (70,5%) позволяет идентифицировать данные генотипы как отзывчивые и использовать их в дальнейшем для трансформации. На отобранных отзывчивых образцах проведена серия экспериментов по трансформации с использованием *Agrobacterium tumefaciens* методом кокультивации. Исследования показали, что эффективность инокуляции гипокотильных сегментов и дальнейшая регенерация также зависит от генотипа. Через 2-3 недели после проведения трансформации по краям среза экспланта и на его поверхности наблюдалось образование каллуса, который имел ярко зеленую окраску, при дальнейшем культивировании на селективных средах на некоторых каллусах формировались побеги (рис.1б). Несмотря на легкость получения каллусных тканей, получение побегов льна-долгунца после проведения трансформации – трудно решаемая задача. Результаты наших экспериментов представлены в таблице. Наибольшей регенерационной способностью обладали трансформированные экспланты сорта Левит-1, трансформированные каллусы сорта Прамень регенерировали наименьшее число побегов.

Таблица

Оценка эффективности морфогенеза и регенерации после проведения агробактериальной трансформации сортов льна-долгунца

№	Сорт	Число эксплантов	Число, выживших эксплантов	Число гипокотилей, образовавших каллус	Число побегов
1	Дашковский	54	54	13	-
2	Нива	158	158	95	6
3	Могилевский	327	207	186	6
4	Прамень	218	151	120	3
5	Левит-1	191	191	109	8
6	Белита	163	80	55	6

Работа выполнена при поддержке БРФФИ.

Литература

1. Поляков А.В., Чикризова О.Ф., Каляева М.А., Захарченко Н.С., Балохина Н.В., Бурьянов Я.И. Трансформация растений льна-долгунца // Физиол. растений. – 1998. – 45, № 6. – С. 882-887.
2. Wang Y.-F., Kang Q.-H., Liu Y., Li X.-C., Liu S.-J., Xu Y. Study on Flax Genetic Transformation Mediated by *Agrobacterium tumefaciens* // J. of Natural Fibers. – 2004. - V.1(1). - P.1-10.

3. *Cunha A., Fernandes-Ferreira M.* Influence of medium parameters on somatic embryogenesis from hypocotyl explants of flax (*Linum usitatissimum* L.) // *Plant. Physiol.* – 1999. – 155. – P. 591-597.
4. *Ling H.Q., Binding H.* Plant regeneration from protoplasts in *Linum* // *Plant Breed.* – 1987. – 98. – P. 312-317.
5. *Белоногова М.А., Ралдугина Г.Н.* Регенерация побегов на семядольных эксплантах льна-долгунца и их укоренение // *Физиол. Растений.* – 2006. – 53, №4. – С.142-148.
6. *Bretagne B., Chupeau M.-C., Chupeau Y., Fouilloux G.* Improved flax regeneration from hypocotyls using thidiazuron as a cytokinin source // *Plant Cell Rep.* – 1994. – 14. – P. 120-124.
7. *Dedičova B., Hricova A., Šamaj J., Obert B., Bobák A., Pret'ova A.* Shoots and embryo-like structures regenerated from cultured flax (*Linum usitatissimum* L.) hypocotyl segments // *J. Plant. Physiol.* – 2000. – 157. – P. 327-334.
8. *Chen Y., Dribnenki P.* Effect of genotype and medium composition on flax *Linum usitatissimum* L. anther culture // *Plant Cell Rep.* – 2002. – 21. – P. 204-207.
9. *Chen Y., Kenaschuk E., Dribnenki P.* Response of flax genotypes to doubled haploid production // *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* – 1999. – 57. – P. 195-198.
10. *Chen Y., Kenaschuk E.O., Dribnenki P.* Pinheritance of rust resistance genes and molecular markers in microspore-derived population of flax // *Plant Breed.* – 2001. – 120. – P. 82-84.
11. *Friedt W., Bickert C., Schaub H.* In vitro breeding of high-linolenic, doubled-haploid lines of linseed (*Linum usitatissimum* L.) via androgenesis // *Pant Breed.* - 1995. – 144. – P. 322-326.
12. *Nichterlein K., Umbach H., Friedt W.* Genotypic and exogenous factors affecting shoot regeneration from anther callus of linseed (*Linum usitatissimum* L.) // *Euphytica.* – 1991. – 58. – P. 157-164.
13. *Nichterlein K., Friedt W.* Plant regeneration from isolated microspores of linseed (*Linum usitatissimum* L.) // *Plant Cell Reports.* – 1993. – 12. – 426-430.
14. *Dedicova B., Hricova A., Samaj J. et al.* Shoots and embryo-like structures regenerated from cultured flax (*L. Ussitatissimum* L.) hypocotyl segments // *J. Plant. Physiol.* – 2000. – 157. – P. 327 – 334. *Tejavathi D. H., Sita G. L., Sunita A. T.* Somatic embryogenesis in flax // *Plant Cell Tissue Organ Cult.* – 2000. – 63. – P. 155 -159.
15. *Шум М.В.* Культура in vitro и регенерация растений льна-долгунца (*Linum usitatissimum* L.), районированных в Беларуси // *Весці НАНБ* – 2005. - №5. – т.2. – с.110 – 112.

Резюме

Проведена агробактеріальна трансформація з допомогою високовирулентного штаму *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404, несущего генетическую конструкцию GFP-TUA1 методом кокультивации гипокотильных эксплантов 4 сортов льна-долгунца (Дашковский, Нива, Могилевский, Прамень) и 2 сортообразцов переданных в Госсортоиспытание (Левит-1, Белита). Показана необходимость предварительной оценки морфогенетического потенциала и регенерационной способности генотипов, так как степень выживаемости растительной ткани при трансформации и селективном воздействии среды снижается.

Проведена агробактеріальна трансформація за допомогою високовирулентного штаму *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404, який несе генетичну конструкцію GFP-TUA1 методом кокультивації гіпокотильних експлантів 4 сортів льону-довгунця (Дашковський, Нива, Могилевський, Прамень) і двох сортозразків, які передані в Держсортвипробування (Левіт-1, Беліта). Показана необхідність попередньої оцінки морфогенетичного потенціалу і регенераційної здатності генотипів, так як проникнення

інородної ДНК призводить до пошкоджень в клітині-господаря, ступінь виживання рослинної тканини при трансформації селективній дії середовища знижується.

Agrobacterial transformation by means of high-virulent strain *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 carrying genetic construction GFP-TUA1 was carried out by the co-cultivation method of hypocotyl explants from 4 fiber flax cultivars (Dashkovsky, Niva, Mogilevsky, Pramen) and 2 accessions presented for State variety tests (Levit-1, Belita). The necessity for preliminary assessment of the morphogenetic potential and regenerative ability of genotypes is shown since penetration of alien DNA results in damages in host cell and the degree of plant cell survival under transformation and selective environmental influence is reduced.

ЗАДОРОЖНА О.А., ЮШКІНА Л.Л.

Інститут рослинництва ім.В.Я.Юр'єва УААН

Україна, 61060, Харків, Московський пр., 142, e-mail: olzador@mail.ru

ОСОБЛИВОСТІ МОРФОГЕНЕЗУ ГОРОХУ (*PISUM SATIVUM L.*) ПРИ КУЛЬТИВУВАННІ *IN VITRO*

Сучасний стан біологічної науки потребує вирішення багатьох проблем в умовах *in vitro*. В цих умовах можливо створення моделей прискореного вивчення реакції певних генотипів на біотичні та абіотичні стреси [1, 2], створення селективних середовищ, проведення процесів трансформації [3], мікроклонального розмноження та вивчення багатьох інших питань.

Така важлива сільськогосподарська культура як горох посівний (*Pisum sativum L.*), має відомі труднощі при культивуванні *in vitro* [3, 4], тому при розробці відповідних методик культивування, крім певного складу живильних середовищ необхідно використовувати генотипи, які легше переносять необхідні етапи культивування.

Метою нашої роботи було дослідження калюсогенезу, утворення пагонів та ризогенезу 10 генотипів гороху на різних живильних середовищах та з'ясування вирішального впливу факторів генотипу та живильного середовища на ці формотворчі процеси.

Матеріали і методи

Матеріалом для досліджень були експланти 10 сортів гороху (таб.1), які культивувалися на чотирьох живильних середовищах. В якості експлантів використовували гіпокотилі, епикотилі, апікальну меристему та меристему сім'ядольного вузла, які одержували з паростків гороху, що вирощували в асептичних умовах на живильному середовищі, що містило 50% макро-, мікросолей та вітамінів B5 [5], 1 г/л сахарози, 8 г/л агару. Для індукції калюсогенезу використовували такі живильні середовища: I - макросолі MS [6], 4 x мікросолі MS, вітаміни B5, з додаванням 1 мг/л НОК (нафтилоцтова кислота), 5 мг/л БАП (6-бензиламінопурин) [7]; II - мінеральні солі та вітаміни B5 з додаванням 2 мг/л БАП, 5 мг/л НОК [8]; III – мінеральні солі та вітаміни B5 з додаванням 0,8 г/л NH₄NO₃, 1 мг/л БАП, 1 мг/л НОК [9]; IV - мінеральні солі MS, вітаміни B5 з додаванням 12 мг/л БАП [9]. Всі середовища вміщували 30 г/л сахарози, 8 г/л агару. Утворені пагони пересаджували на середовище для дорощування, що містило мінеральні солі та вітаміни B5 з додаванням 2 мг/л гібереліну [7]. Далі пагони пересаджували на середовище для укорінення, що містило мінеральні солі та вітаміни MS та 2 мг/л НОК [10]. Культивування *in vitro* проводили при освітленні 4000 лк, світловому періоді 16 годин на добу та температурі 24±2⁰С.

В процесі досліджу обчислювались такі показники: інтенсивність калюсогенезу (за кількістю експлантів, що утворили калюс), інтенсивність морфогенезу (за кількістю експлантів, на яких утворились пагони), “пагоногенез” (за кількістю пагонів на експланті). Інтенсивність ризогенезу обліковували за кількістю пагонів на яких утворювались корінці. Аналіз показників калюсо- та морфогенезу проводився за допомогою методів варіаційної статистики [11].

Результати та обговорення

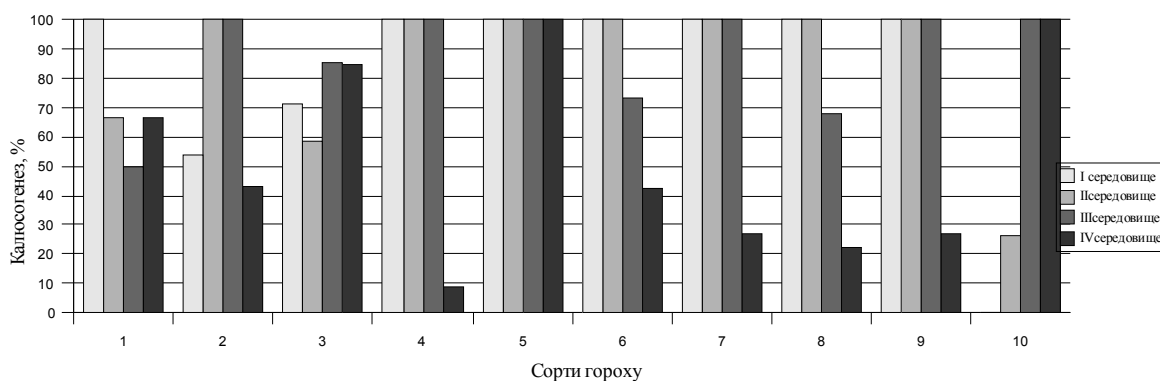
Відомо, що здатність до калюсогенезу характеризується високою усадковуваністю [12]. Ця ознака у більшості випадків контролюється генами з адитивним ефектом [13], часто спостерігається гетерозисний ефект [14]. Дані деяких дослідників свідчать, що здатність до калюсоутворення та темп росту калюсів визначається моногенно [15,16], причому, домінантні алелі пригнічують його ріст, а рецесивні – стимулюють [16]. За даними деяких авторів ця ознака контролюється генами як ядра, так і цитоплазми [17]. Залежність інтенсивності калюсогенезу від генотипу свідчить про наявність генів, які впливають на метаболізм фітогормонів. Попередні дослідження інших авторів доводять, що баланс ендогенних фітогормонів істотно впливає на первинний калюсогенез [15]. Так, при вирощуванні експлантів пшениці з різним відомим вмістом фітогормонів знайдено різницю за частотою морфогенезу та регенераційною здатністю [18].

Таблиця 1

Сорти гороху, що культивувались *in vitro*

№ п/п	Назва сорту	№ Націон. каталогу	Країна походження	Калюсогенез, %	Морфогенез, %	Пагоногенез шт	Ризогенез, %
1	Норд	UD0100434	Росія	70,8	27,6	3,5	90
2	Зубр	UD0100193	Росія	74,2	36,3	2,5	70
3	Совершенство	UD0101375	Росія	74,9	27,7	2,1	90
4	Розоцветущая	UD0101377	Росія	77,2	15,5	2,5	36,7
5	Малиновка	UD0101726	Росія	100	17,7	1,3	10
6	Dunav	UD0102062	Серб/Чор	78,9	29,0	1,5	71,7
7	Asterix	UD0102065	Нідерл	81,7	30,0	2,3	50
8	Sonata	UD0101735	Канада	72,6	24,9	1,9	40
9	Peko	UD0101738	Канада	81,7	25,2	1,6	65
10	Verdi	UD0101734	Канада	56,6	30,5	2,0	50

В проведених дослідженнях встановлено різну здатність до калюсогенезу вивчених генотипів гороху (таб.1). Інтенсивність калюсогенезу на всіх типах живильного середовища коливалась від 8,7% до 100% (рис.1). Найкращим для калюсогенезу виявилось середовище III. За даними інших дослідників [4] у гороха спостерігали внутрішньовидову мінливість за калюсоутворенням в залежності від генотипу на так званому мінімальному живильному середовищі з низьким вмістом фітогормонів. При вирощуванні калюсів на живильному середовищі з високим вмістом фітогормонів ця різниця потім нивілювалась. Результати наших досліджень, обраховані за допомогою двофакторного дисперсійного аналізу, свідчать про те, що інтенсивність



калюсоутворення знаходилась у більшій залежності від живильного середовища ($F=3,02/F_{кр}=2,96$), ніж від генотипу ($F=0,52/F_{кр}=2,25$).

Рис.1. Калюсогенез різних сортів гороху

У проведених нами дослідженнях впливу чотирьох середовищ на калюсогенез встановлено, що у вивчених генотипів цей показник для середовища I склав 82,5%, II – 85,1%, III- 87,6%, IV- майже в 1,5 рази менше – 52%. Середовище IV мало найвищу концентрацію БАП (12 мг/л). На підставі цих даних можна припустити, що гороху притаманний високий ендогенний вміст цитокінінів, тому додавання екзогенного БАПу у високій концентрації перевищує характерну для цього виду біологічну межу і викликає пригнічення інтенсивності калюсогенезу.

Наступний важливий етап культивування *in vitro* морфогенез. Морфогенез на експлантах гороху спостерігався у всіх сортів. Для різних генотипів спостерігали різну його інтенсивність. Регенераційну здатність забезпечує механізм, який виробився в процесі еволюції і впливає на підтримання певного гормонального статусу. Для інших видів рослин, наприклад для кукурудзи, ознака “здатність до регенерації” успадковується за доміантним типом, за цією ознакою проявляється ефект гетерозису [14]. В наших дослідженнях інтенсивність морфогенезу на різних середовищах коливалась в межах від 7,1% до 44%. Найкращим для морфогенезу було середовище IV. Істотних переваг впливу середовища ($F=1,17/F_{кр}=2,96$) та генотипу ($F=1,24/F_{кр}=2,25$) на цей процес не виявлено. В дослідженнях інших авторів [19] встановлено, що причиною внутрішньовидової мінливості гороху за ознакою регенерації на середовищі без фітогормонів є різниця в їх гормональному статусі. Визначений ендогенний вміст фітогормонів та чутливість до них тканин може сильніше вплинути на морфогенез, ніж екзогенне додавання фітогормонів. Ендогенний баланс гормонів, його лабільність є одним з механізмів адаптації вищих рослин до зовнішнього середовища.

Морфогенез без урахування середовища знаходився в межах від 15 до 36% (таб.1). Вважається, що високій регенерації лінії відповідає висока здатність до трансформації. Тому, якщо передбачати таку можливість, можна бачити, як вивчені сорти відрізняються за цією здатністю. (таб.1) .

Пагоногенез у різних генотипів на всіх середовищах, становив від 1,3 до 3,5 шт (таб.1). Найкращим для морфогенезу виявилось середовище IV. За результатами двофакторного аналізу виявлено більший вплив на цей показник середовища ($F=3,6/F_{кр}=2,96$) ніж генотипа ($F=0,76/F_{кр}=2,25$).

Ризогенез *in vitro* у гороху супроводжується певними труднощами [3, 4]. В проведених дослідженнях пагони з усіх чотирьох середовищ висаджували на середовище для дорощування. Після цього пагони переносили на ризогенне середовище. За результатами виконаних нами досліджень ризогенез спостерігався у 10 - 90% пагонів (таб.1). Ризогенез залежав перш за все від генотипу зразка. Попереднє культивування експлантів на середовищах з різним вмістом фітогормонів викликало різницю в ризогенезі в межах 10%. У пагонів з середовища I та IV з вмістом БАП 5 мг/л та 12 мг/л відповідно був інтенсивніший ризогенез. Це явище скоріш за все пов'язано зі зниженням ендогенного синтезу БАП, як наслідок високого екзогенного їх вмісту в середовищі культивування, і як відомо, середовище з високою концентрацією НОК та низькою концентрацією або відсутністю БАП оптимальне для регенерації коренів. Досвід деяких досліджень свідчить, що наявність високої концентрації цитокінінів викликає пригнічення ризогенезу [13], тому низька здатність до ризогенезу гороху може бути непрямым свідченням високого ендогенного вмісту цитокінінів у гороху, що співпадає з відомим досвідом інших дослідників.

Висновки

Таким чином калюсо- та морфогенез гороху у значній мірі залежить від

середовища культивування, тобто від екзогенних фітогормонів. Низька здатність гороху до ризогензу визначається генотипом зразка. Такі особливості культивування гороху *in vitro* слід враховувати при підборі зразків для біотехнологічних досліджень.

Література

1. Kosturkova G., Angelov G., Rodeva R., Tchorbadjieva M., Mehandjiev A. *In vitro* modelling of biotic stress-higher Resistance of pea cultures to *Phoma medicaginis* var. *pinodella* culture filtrates//Proceedings Vth Int.Symposium "BioProcesses'03", Sofia.-2003.-P.186-189.
2. Соболева Г.В., Лаханов А.П. Разработка методов отбора соматоклональных вариантов гороха (*Pisum sativum* L.), устойчивых к действию осмотического стресса // Регуляция продукционного процесса сельскохозяйственных растений: Материалы Всероссийской НПК, посвященной памяти А.П. Лаханова (октябрь 2005 г.), ч.2. -Орел: Всероссийский научно-исследовательский институт зернобобовых и крупяных культур, 2006. -С.177-184.
3. Жаркова Т.В., Дейнеко В.К., Шумный В.К. Скрининг различных образцов гороха (*Pisum sativum*) по морфологической способности в культуре *in vitro* //Цитология и генетика.-1998.-Т.32, №3.-С.36-42.
4. Лутова Л.А., Забелина Е.К. Каллусо- и побегообразование у различных форм гороха (*Pisum sativum* L.) в условиях *in vitro* // Генетика.- 1988.-Т.24.-№9.-С.1632-1640.
5. Gamborg O.L., Miller R.A., Ojima K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells // Exp.Cell. Res. -1968. -50. -№1. -P.151-158.
6. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. -1962. -15. -P.473-497.
7. Kosturkova G., Dimitrova M., Mehandjiev A. *In vitro* organogenic potential of new mutant lines of pea (*Pisum sativum*) // Plant Science (Bg), (Растениеведни науки).-2005.-V.42.-N3.-P.222-225.
8. Соболева Г.В., Зеленов А.Н. Морфогенез и регенерация растений в длительно пассируемой каллусной культуре гороха посевного (*Pisum sativum* L.) //Научное обеспечение производства зернобобовых и крупяных культур.-Орел, 2004.-С.213-219.
9. Кузнецова О.И. Аш О.И., Гостимский С.А. Изучение влияния продолжительности культивирования каллусов на накопление генетических изменений у регенерантов гороха (*Pisum sativum* L.) // Генетика.- 2006.-Т.42.-№5.-С.684-692.
10. Griga M., Tejklova E., Novak F.J. Hormonal regulation of growth of pea (*Pisum sativum* L.) shoot apices *in vitro* culture //Rostl.Vyr.-Olomouc.-1984.-V.30, N.5.-P.523-530.
11. Вольф В.Г. Статистическая обработка опытных данных.-1966.-М. Колос.-255с.
12. Koorneef M., Hanhart C.J., Martinelli L. A genetic analysis of cell culture traits in tomato //Theor. and Appl. Genet.-1987.-74,N5.-P.633-641.
13. Suresh K.A., Reddy T.P., Reddy G.M. Genetic analysis of certain *in vitro* and *in vivo* parameters in pigeonpea (*Cajanus cajan* L.) //Theor. and Appl. Genet.-1985.-70, N2.-P.151-156.
14. Чеченева Т.Н., Труханов В.А. Генетическая обусловленность каллусообразования и регенерационной способности у кукурузы //Цитология и генетика.-1994.-28.-№5.-С.46-50.
15. Кунах В.А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи.-К.Логос, 2005.-730 с.
16. Miah M.A.A., Earle E.D., Khush G.S. Inheratance of callus formation ability in anther cultures of rice, *Oryza sativa* L.// Theor. and Appl. Genet.-1985.-70, N2.-P.113-116.
17. Игнатова С.А., Белоусов А.А.Сидоренко Л.В. Генотипическая специфичность морфогенетических процессов в культуре соматических тканей кукурузы // Цитология и генетика.-1993.-27, №3.-С.39-44.
18. Копертех Л.Г., Бутенко Р.Г. Нативные фитогормоны экспланта и морфогенез пшеницы *in vitro* //Физиология растенийю-1995.-42.-№4.-С.555-558.
19. Лутова Л.А., Бондаренко Л.В., Бузовкина И.С., Левашина Е.А., Тиходеев О.Н., Ходжайова Л.Т., Шарова Н.В., Шишкова С.В. Влияние генотипа растения на регенерационные процессы // Генетика.- 1994.-Т.30.-№8.-С.1065-1074.

Резюме

Результати культивування 10 сортів гороху (*Pisum sativum* L.) *in vitro* свідчать про значну залежність калюсогенезу, морфогенезу від середовища культивування, ризогенезу – від генотипу зразка.

Результаты культивирования 10 сортов гороха (*Pisum sativum* L.) *in vitro*

свидетельствуют о значительной зависимости каллусогенеза, морфогенеза от среды культивирования, ризогенеза – от генотипа образца.

Results of 10 pea (*Pisum sativum* L.) cultivars *in vitro* cultivation show, that callusogenesis, shoot formation more depend from medium components, risogenesis – from genotype.

КОМИСАРЕНКО А.Г., МАЛИНА А.Э., МИХАЛЬСКАЯ С.И., БРОННИКОВА Л.И., ТИЩЕНКО Е.Н.

Институт физиологии растений и генетики НАН Украины,

Украина, 0302, Киев, ул. Васильковская 31/1, e-mail: oltyko@gmail.com

ВЛИЯНИЕ УЛЬТРАЗВУКА НА ИНДУКЦИЮ РЕГЕНЕРАЦИИ ИНБРЕДНЫХ ЛИНИЙ ПОДСОЛНЕЧНИКА

Подсолнечник (*Helianthus annuus* L.) является одной из важнейших масличных культур, однако на мировом рынке еще не появились его биотехнологические продукты. Основными причинами, которые замедляют прогресс в улучшении этой культуры методами генетической инженерии, являются отсутствие рутинной системы регенерации и низкая эффективность стабильной трансформации [1].

Основное внимание исследователей при разработке системы методов генетической трансформации подсолнечника обращено на *Agrobacterium*-опосредованную трансформацию, за счёт которой наиболее часто наблюдается стабильная интродукция рекомбинантных молекул в его геном [2]. Несмотря на компетентность к агробактериальной инфекции, *H. annuus* с трудом поддается классическим методам агробактериальной трансформации. Прогресс в повышении частоты трансформации был достигнут с разработкой способа поранения эксплантатов бомбардировкой микрочастицами вольфрама до инокуляции с агробактериями [4]. Другие подходы связаны с обезвоживанием и последующей регидратацией, инфльтрацией, использованием пектиназ [5,6]. Тем не менее, эффективность трансформации подсолнечника все еще остается на низком уровне, поэтому существует необходимость оптимизации системы методов интродукции Т-ДНК в его геном.

Для повышения частоты трансформации некоторых культур успешно применяют ультразвуковую обработку [8]. В связи с этим на первоначальном этапе работы мы анализировали влияние ультразвука на морфогенетический потенциал инбредных линий подсолнечника, где в качестве эксплантата при культивировании *in vitro* использовали сегмент 4-дневного этиолированного проростка.

Материалы и методы

Объектом исследования служили инбредные линии подсолнечника: 96А/3, 16А/3 и 70А/3 (селекции Одесского селекционно-генетического Института). Зрелые семена стерилизовали 96% раствором этанола на протяжении 2 мин и 10% раствором хлорамина 30-40 мин с последующим трехкратным промыванием в дистиллированной воде. Затем высаживали на питательную среду Мурашиге-Скуга (МС); культивировали 4 дня при температуре 25 °С – 26 °С. В качестве первичного эксплантата использовали часть семядоли с гипокотилем, которые подвергали действию ультразвука с использованием ультразвукового диспергатора УЗДН-1 У4.2 при частоте 44 кГц, 25 °С. После этого эксплантаты высаживали на модифицированную нами питательную среду МС (контроль, МСК) [3], дополненную химическим компонентом, содержащим сульфгидрильную группу (МСХ). Частоту регенерации исследуемых линий оценивали как процентное соотношение регенерантов к общему количеству или эксплантатов (S/E), или регенерирующих эксплантатов (S/RE).

Результаты и обсуждение

Для *H. annuus* за последние 10 – 20 лет предложено ряд протоколов регенерации, которые могут быть использованы при разработке системы методов генетической трансформации, важным фактором при этом является природа и стадия развития эксплантата [8]. Проведенный нами скрининг 11 сортов и гибридов подсолнечника отечественной селекции показал, что для индукции регенерации путём прямого органогенеза наиболее удачным эксплантатом являлся сегмент побега (часть семядоли с гипокотилем) этиолированных проростков на ранних стадиях их роста и дифференцировки, тогда как органогенез из семядолей, гипокотилей, сегментов листьев, зрелых зародышей наблюдался очень редко. Оптимальной для тотипотентности была модифицированная нами среда МС, при использовании которой регенерационная способность изменялась в пределах $\sim 20 \div 95$ %.

Нами введено в культуру *in vitro* и при аналогичных условиях проанализирован регенерационный потенциал инбредных линий подсолнечника 96А/3, 70А/3 и 16А/3, частота регенерации которых составила $31,3 \pm 2,0$, $20,2 \pm 4,6\%$ и $13,9 \pm 2,0$, соответственно (рис.). Индукция побегообразования осуществлялась путём прямого органогенеза, что желательно для снижения уровня соматической изменчивости при генетической трансформации. Дополнительное введение в питательную среду химического агента, содержащего сульфгидрильную группу, повышало эффективность регенерации приблизительно в 1,3, 1,6 и 2,4 раза, где частота регенерации линий 96А/3, 70А/3 и 16А/3 составляла $41,5 \pm 2,3$, $31,7 \pm 1,7$, $32,9 \pm 4,0$, соответственно.

Следует отметить, что в литературе имеются сведения о генотипической зависимости признаков - количество побегов на общее количество эксплантатов (S/E) и на регенерирующий эксплантат (S/RE) [9]. При идентификации генетических факторов, контролирующих органогенез подсолнечника по признакам S/E и S/RE, установлено 13 QTLs. Наличие как общих, так и специфичных QTLs позволяет объяснить различия по каждому из анализируемых признаков органогенеза (S/E, S/RE) среди отдельных генотипов [10]. Что касается S/E тестируемых нами инбредных линий подсолнечника, культивируемых на питательных средах МСК и МСХ, то по этому параметру среди них наблюдаются статистически достоверные различия. Это свидетельствует о различном влиянии химического агента, содержащего сульфгидрильную группу, на морфогенетический потенциал линий 96А/3, 70А/3, 16А/3.

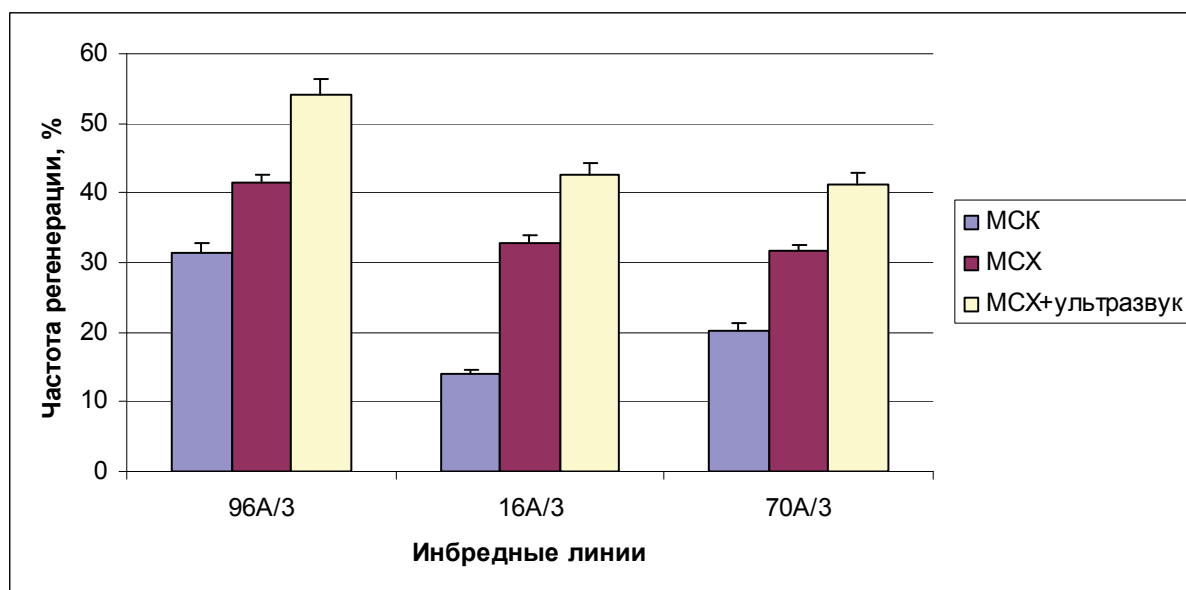


Рис. Влияние ультразвуковой обработки на морфогенетический потенциал инбредных линий подсолнечника

Изучение влияния ультразвука на частоту регенерации из эксплантатов, культивируемых на среде МСХ, показало увеличение частоты побегообразования приблизительно в 1,3 раза для всех изученных генотипов, где значения S/E составили для линий 96А/3, 70А/3, 16А/3 $54,2 \pm 3,4$, $41,3 \pm 2,5$, $42,7 \pm 5,1$, соответственно (рис.). Однако достоверные различия наблюдали только для генотипа 70А/3 и 96А/3, что свидетельствует о генотипической зависимости индукции побегообразования под влиянием ультразвуковой обработки эксплантатов.

В отличие от контроля при культивировании на питательной среде МСХ без и с ультразвуковой обработкой индукция регенерации могла осуществляться и путем множественного побегообразования. Количество побегов на регенерирующий эксплантат варьировало от 1 до 5, где доля первых составляла около 90 - 95 %. Среди оставшихся 5 – 10 % чаще всего индуцировалось по 2 побега на эксплантат, а появление 4 – 5 регенерантов было редкое событие. При биологических повторностях опыта различия по признаку S/RE между всеми тестируемыми линиями были не достоверны. То есть четко выраженной генотипической зависимости множественного побегообразования от ультразвука при выбранных условиях культивирования не наблюдается. Это означает, что определяющим фактором, оказывающим влияние на реализацию морфогенетического потенциала, представленного в виде нескольких побегов, является химический агент с SH-группой.

Таким образом, под влиянием ультразвука для культурного подсолнечника наблюдается тенденция к повышению частоты индукции регенерации, однако на процессы множественного побегообразования этот физический фактор, видимо, не оказывает существенного влияния. Однако, несмотря на генотипическую зависимость реализации морфогенетического потенциала, который по крайней мере может не снижаться при ультразвуковой обработке, как и для других культур, следует ожидать увеличение интродукции Т-ДНК в геном *H. annuus*. Такое допущение основывается на предположениях [цит. по 7], согласно которым микропоранение клеток тканей может приводить к более глубокому проникновению агробактерий, чем при обычных условиях кокультивирования, таким образом повышая её колонизацию и способность к инфицированию. Кроме того, в результате активного деления клеток, сопровождающегося синтезом ДНК, возможно повышение вероятности включения Т-ДНК в ядерный геном.

Литература

1. Тищенко Е.Н., Михальская С.И. Агробактериальная трансформация подсолнечника // Физиология и биохимия культ. растений. – 2006. – т.38, №3. С.187-196.
2. Lappara H., Burrus M., Hunold R., Damm B., Bravoangel A.M., Bronner R., Hahne G. Expression of foreign genes in sunflower (*Helianthus annuus*) – evaluation of 3 gene-transfer methods // Euphytica. – 1995. – 85, N1-3. – P.63-74.
3. Михальская С.И. Усовершенствование методики регенерации подсолнечника *Helianthus annuus in vitro* // Фактори експериментальної еволюції організмів – К.: Аграрна наука, 2003. – С. 425-427.
4. Bidney D., Scelonge C., Martich J., Burrus M., Sims L., Huffman G. Microprojectile bombardment of plant tissue increases transformation frequency by *Agrobacterium tumefaciens* // Plant Mol. Biol. – 1992. – 18. –P.301-313.
5. Albert B., Lucas O., Gall V.L., Albert G. Pectolytic enzyme treatment of sunflower explants prior to wounding and cocultivation with *Agrobacterium tumefaciens* enhances efficiency of transient β -glucuronidase expression // Physiology Plantarum. – 1999. – 106. – P.232-237.
6. Hewezi T., Perrault A., Alibert G., Kallerhoff J. Dehydrating immature embryo split apices and re hydrating with *Agrobacterium tumefaciens*: A new methods for genetically transforming recalcitrant sunflower // Plant Mol Biol Rep. – 2002. – 20, N4. – P.335-345.

7. Amoah B.K., Wu. H. Sparks, C., Jones H.D. Factors influencing Agrobacterium – mediated transient expression of uidA in wheat inflorescence tissue // Journ. of Exper. Botany. – 2001. - V. 52. – N. 358. – P. 1135-1142
8. Alibert G., Aslane-Chanabe C., Burrus M. Sunflower tissue and cell cultures and their use in biotechnology // Plant Physiol. Biochem. - 1994. – 32. – P.31-44.
9. Deglene L., Lesignes P., Alibert G., Saffari A. Genetic control of organogenesis in cotyledons of sunflower (*Helianthus annuus*) // Plant Cell Tiss. Org. Cult. – 1997. – 48. – P. 127-130.
10. Flores Berrious E, Gentzbittel L., Kayyal H., Alibert G., Sarrafi A. AFLP mapping of QTLs for in vitro organogenesis traits using recombinant inbred lines in sunflower (*Helianthus annuus* L.) // Theor Appl Genet. – 2000. – 101. – P.1299-1306.

Резюме

Исследовали влияние ультразвука на регенерационную способность инбредных линий подсолнечника (*Helianthus annuus* L.) 96A/3, 16A/3 и 70A/3. Показано, что повышение частоты регенерации путём прямого органогенеза зависит от генотипа и что ультразвуковая обработка не оказывает существенного влияния на процессы множественного побегообразования.

Досліджували вплив ультразвуку на регенераційну здатність інбредних ліній соняшника (*Helianthus annuus* L.) 96A/3, 16A/3 и 70A/3. Встановлено, що підвищення частоти регенерації шляхом прямого органогенезу залежить від генотипу та що ультразвукова обробка не має значного впливу на процеси множинного пагануотворення.

The ultrasound affect on regeneration possibility of inbred lines (*Helianthus annuus* L.) 96A/3, 16A/3 и 70A/3 are studied. It has been shown that increase of regeneration frequency by direct organogenesis depends on genotype, as well as the sonication don't influence on processes of multiply shoot formation.

КОРМИЛЬЦЕВ Б.Ф.

Институт сельского хозяйства Полесье УААН

Киевское шоссе 131, Житомир, 10007, Украина, E-mail: isgpo@polesye.net

КУЛЬТУРА КАЛЛУСНЫХ ТКАНЕЙ ХМЕЛЯ (*HUMULUS LUPULUS* L)

Хмель является важной технической культурой незаменимой для пивоварения, продукция которого также используется в фармакологии и парфюмерии.

Биотехнологические исследования, проводимые с этой культурой, касались в основном разработки методов культуры апикальных меристем с целью оздоровления растений от вирусных болезней [1,2] и созданию технологий микрклонального размножения [3,4,5].

Работам по изучению каллусогенеза в культуре тканей хмель уделялось мало внимания. Известны лишь отдельные публикации, в которых авторы частично затрагивают некоторые аспекты индукции каллусогенеза в контексте разработки методов размножения [6,7].

Известно, что каллусная ткань может служить источником генетического разнообразия и применяться для создания новых генотипов, а также доработки и улучшения сортов. На основе каллусной ткани разрабатываются биотехнологии для получения различных незаменимых для промышленности и фармакологии органических соединений вторичного метаболизма [8,9].

Целью настоящей работы было изучить условия каллусо- и морфогенеза различных соматических тканей хмеля в культуре *in vitro*.

Материалы и методы

Материалом для исследований служили регенеранты хмеля сортов Альта, Оболонский и Хмелеслав полученные из апикальных меристем методом культуры *in vitro*. В качестве эксплантов использовали сегменты листьев, стеблей и черешков. Индукцию каллусогенеза и дальнейшее культивирование каллуса осуществляли на среде Мурасига – Скуга (MS) с добавлением различных фитогормонов. Пассирование культур проводили через каждые 30 дней. Экспланты культивировали в культуральных комнатах при температуре $25^0 \pm 1$ С, относительной влажности воздуха 70-80%, 16 часовом фотопериоде и освещенности 1,5-2,0 клюкс. Определение роста каллусной ткани проводили по приросту сырой массы каллуса после 30 суток культивирования. Для критерия служил относительный прирост каллусной массы (m_0 / m_t). Опыты проводили в трёхкратной повторности по 25 эксплантов в каждой повторности.

Результаты и обсуждения

Интенсивность развития каллуса у эксплантов хмеля на разных средах существенно отличалась. Экспланты стебля и черешка, высаженные на среду MS не содержащую фитогормонов, сохраняли свою жизнеспособность на протяжении всего времени наблюдения (2мес.), но каллус не образовывали. Ткани листа гибли раньше, но приблизительно у 5% из них отмечалось незначительное образование каллуса.

Из фитогормонов, которые были испробованы в экспериментах только 6-БАП и в меньшей степени 2,4-Д индуцировали каллусогенез (табл.1). Начало каллусообразования у эксплантов хмеля наблюдалось через 1-2 недели после начала культивирования в зависимости от вида ткани и состава среды.

На средах к которым добавляли β- ИУК или НУК в концентрациях 0,5 – 5,0 мг/л каллус не образовывался или был незначительным. В то же время ауксины в концентрациях 2,5 – 5,0 мг/л стимулировали образование корешков у всех видов тканей. Реже всего ризогенез наблюдался у черешков, высаженных на среду отдельно, но черешки, которые содержали сегменты листа, образовывали корни в два раза чаще. Экспланты сортов Хмелеслав и Альта одинаково реагировали на внесение в среду ауксинов, тогда как ризогенез у эксплантов сорта Оболонский на этих средах был менее выражен.

Таблица 1

Влияние фитогормонов на индукцию каллусогенеза различных тканей хмеля.

Состав фитогормонов (мг/л)	стебли			листья		
	Процент каллусообразования (%)	Процент ризогенеза (%)	Интенсивность каллусообразования	Процент каллусообразования (%)	Процент ризогенеза (%)	Интенсивность каллусообразования
ИУК 1,0	-	-	-	-	-	-
2,5	-	16	-	-	-	-
5,0	12	92	+	-	24	-
НУК 1,0	-	-	-	-	-	-
2,5	-	-	-	-	-	-
5,0	16	84	+	-	16	-
2,4Д 1,0	-	-	-	20	-	+
2,5	32	8	+	36	-	+
5,0	64	32	++	84	12	++
кинетин 1,0	-	-	-	-	-	-
2,5	-	44	-	-	16	-

	5,0	48	80	+	28	56	+
БАП	1,0	8	-	+	12	-	+
	2,5	68	-	++	52	-	++
	5,0	80	16	++	88	-	++
ИУК +БАП							
	2,0 + 2,0	100	-	++	100	-	+++
	2,0 + 5,0	100	4	+++	100	-	+++
	5,0 + 2,0	94	24	+++	100	16	+++
	5,0 + 5,0	100	28	+++	100	8	+++

- отсутствие каллуса; + слабое развитие каллуса; ++ среднее развитие каллуса; +++ интенсивное развитие каллуса.

Как видно из таблицы влияние кинетина на каллусо- и ризогенез было подобным действию ауксинов. Тогда как 6-БАП индуцировал главным образом образование каллуса. Ткани листа были более чувствительны к действию цитокининов, чем ткани других органов хмеля и быстрее образовывали каллус и корни.

В меньшей степени реагировали на внесение в среду цитокининов ткани черешка. На всех средах они образовывали незначительное количество каллуса и лишь в отдельных случаях корни.

Наиболее интенсивно образование каллусной ткани наблюдалось на средах, в которые вносили БАП и ауксины одновременно. При этом различие в концентрации фитогормонов не имела значения.

Экспланты стебля на всех средах образовывали плотный крупнозернистый каллус желтоватого оттенка. Сегменты листа и черенка на средах, не содержащих БАП, образовывали мелкозернистый каллус белого или салатного цвета. При дальнейшем культивировании структура каллуса менялась. Основная каллусная масса ещё сильнее уплотнялась, формировала куполообразную форму, на срезе которой чётко выделялась дифференциация тканевых структур. Часть клеток каллуса быстро старела, приобретала темно-коричневый цвет и вскоре отмирала. А часть образовывала молодой рыхлый каллус бесцветный или светло-жёлтой окраски.

С целью оптимизации условий культивирования каллусной ткани нами изучалось влияние фитогормонального состава сред на прирост каллусной массы. Для стабилизации условий эксперимента каллусную ткань выдерживали в течение двух недель на среде MS без фитогормонов. Далее отбирали по 80 ± 2 мг/л молодого рыхлого каллуса и пересаживали на испытываемые среды.

Каллусная ткань довольно хорошо развивалась на среде без фитогормонов в среднем за месяц, увеличивая свою массу в 5 раз. На средах с ауксинами не удалось получить статистически достоверных данных ввиду значительного разброса результатов. По-видимому, уже на начальных этапах развития каллуса хмеля он имеет гетерогенную структуру, из-за чего кажущаяся однородной каллусная ткань содержит разное количество чувствительных к ауксинам клеток.

На средах с 6- БАП формировался рыхлый мелкозернистый каллус, отличавшийся быстрым ростом. С увеличением концентрации 6-БАП скорость роста каллуса увеличивалась (табл.2). Кинетин в концентрации 1 мг/л также стимулировал рост каллуса, хотя и в меньшей степени, чем 6-БАП. Повышение концентрации кинетина приводило к торможению нарастания каллусной массы это, по-видимому, связано с тем, что под действием кинетина происходило её уплотнение. Гиббереллин, добавленный в среду в концентрации 2 мг/л напротив, не оказывал никакого влияния, тогда как при увеличении его концентрации до 5 мг/л существенно инициировал рост каллуса.

Таблица 2

Увеличение каллусной массы

Фитогормон	Концентрация (мг/л)	Относительный прирост
Кинетин	1,0	7,9±07
	2,0	4,8±05
БАП	1,0	8,1±08
	2,0	11,9±09
Гиббереллин	2,0	5,9±04
	5,0	8,7±08
Без гормонов	-	5,6±06

Для инициации побегообразования мы пересаживали каллус на среды содержащие различные цитокинины в концентрации 1-2 мг/л и ИУК в концентрации 0,2 мг/л. Положительные результаты были получены на каллусе, индуцированном из тканей листа. Опыты с каллусной тканью другого происхождения давали отрицательный результат.

На средах, содержащих БАП и кинетин в концентрации 2,0 мг/л, у 40% эксплантов наблюдалось образование проэмбриогенных зон. Каллус в этих зонах отличался более крупной величиной зёрен и интенсивной зелёной окраской, однако, процесс побегообразования отмечался не чаще 1-2 случаев на 40 эксплантов. Иницированный каллус давал от 4 до 12 хорошо развитых побегов, которые при пересадке их на среду, содержащую 3,0 мг/л ИМК, легко регенерировали корни и образовывали микросаженец. Зеатин добавленный в среду, индуцировал образование побегов у каждого третьего экспланта. Но обычно это были единичные сильно утончённые побеги, отличавшиеся слабым ростом, которые не удавалось укоренить.

Трудность инициации побегообразования в каллусной ткани хмеля отмечалась и другими авторами [9,10] и требует более детального изучения, так как зависит от многих факторов в частности от возраста и типа каллусной ткани, происхождении первичного экспланта и состава среды, на которой он культивировался.

Література

1. *Svoboda P.* Diagnostika viro ve slechtitelskev materialu chmele . // Zatec.- 1994, - 23s.
2. *Кормильцев Б.Ф., Бойко А.Л., Горшкова Л.Т.* Використання методу культури апікальних меристем для оздоровлення хмелю від деяких вірусів.// Хмелярство, К.,- Урожай. - 1992, - 14 – с. 20-23.
3. *Ashis Taru Roy, Grey Leccett, Anthony Koutoulis.* Development of a shoot multiplication system for hop.// In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant, - 37, - 2001, - p. 79-83.
4. *Мельничук М.В., Клюваденко А.А., Давиденко О.А.* Отримання безвірусного посадкового матеріалу хмелю (*Humulus lupulus L.*) в умовах in vitro // Науковий вісник Національного аграрного університету. – 2000. – 29. – С.47-52.
5. *Кормильцев Б.Ф.* Ефективність мікроклонального методу при розмноженні хмелю in vitro.// Хмелярство, - Просвіта,- 2006, - 23,- с. 38-44.
6. *Gurriaran M.J., Revilla M.A., Tames R.S.* Adventitious shoot regeneration in cultures of *Humulus lupulus L.* (hop) cvs. Brewers Gold and Nugget.// Plant Cell Reports - 1s,- 1999, - p. 1007-1010.
7. *Langezaal C.R., Scheffer J.J.* Initiation and growth characterization of some hop cell suspension cultures.// Plant Cell Tiss. Organ Cult. - 30, - 1992, - p. 159-164.
8. *Сидоров В.А.* Биотехнология растений. Клеточная селекция // К.: - 1990. – 280 с.
9. *Кунах В.А.* Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. – К.: - 2005. – 730 с.

Резюме

Исследованы особенности индукции каллусогенеза у тканевых сегментов стебля, листа и черешка хмеля. Установлено, что наиболее интенсивное развитие каллуса происходит на средах, которые содержат БАП и ИУК в равных концентрациях. Приведены данные исследований инициации морфогенеза в каллусной ткани хмеля.

Досліджені особливості індукції калюсогенезу у тканинних сегментів стебла, листа та черешка хмелю. Встановлено, що найбільш інтенсивний розвиток калюсу відбувається на середовищах які містять БАП та ІУК у рівних концентраціях. Приведені данні досліджень ініціації морфогенезу у калюсних тканинах хмелю.

Features of an induction callus from tissues segments of a leaves, shoots and petioles hop plant are investigated. It is established, that the most intensify generate callus mediums which contains BAP and IAA in equal concentrations. A data of researches initiation morphogenesis in callus of hop plant tissues are described.

КУЗНЕЦОВА Н.В., МИТРОФАНОВА О.В.

*Никитский ботанический сад – Национальный научный центр, УААН,
АР Крым, г. Ялта. 98648, e-mail: in_vitro@ukr.net*

ВЛИЯНИЕ РЕГУЛЯТОРОВ РОСТА НА РЕГЕНЕРАЦИОННУЮ СПОСОБНОСТЬ ЧЕТЫРЕХ СОРТОВ ЧЕРЕШНИ (*PRUNUS AVIUM* L.) В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

Исследования в области культуры изолированных органов и тканей некоторых представителей рода *Prunus* были начаты в 70-х годах прошлого столетия [1, 6]. Однако многие проблемы клонального микроразмножения растений, относящихся к роду *Prunus*, до сих пор не решены. Трудности возникают, начиная с получения стерильной культуры первичных эксплантов, заканчивая этапами ризогенеза *in vitro* и адаптации растений – регенерантов к условиям *in vivo* [1, 3].

Одной из главных и наиболее сложных задач клонального микроразмножения является подбор питательных сред для основных этапов культивирования в условиях *in vitro*: индукции развития эксплантов, регенерации микропобегов и ризогенеза. Для каждого из них необходимы питательные среды, содержащие определенные концентрации витаминов и регуляторов роста.

Цель данной работы – выявить зависимость регенерационного потенциала органов и тканей черешни от генотипа, трофических и гормональных факторов.

Материалы и методы

В исследованиях были использованы сорта черешни (Рубиновая Ранняя, Сказка, Талисман и Анонс) разных сроков созревания плодов, произрастающие в коллекционных насаждениях степного отделения НБС-ННЦ (п. Гвардейское, АР Крым) и в опытном хозяйстве «Мелитопольское» Института орошаемого садоводства им. Н.Ф. Сидоренко (г. Мелитополь). В исследованиях применяли как общепринятые методы, так и разработанные в отделе биотехнологии и биохимии растений НБС-ННЦ [2-5]. Опыты проводились в 2006–2007 гг. В качестве первичных эксплантов были отобраны вегетативные почки и верхушечная часть активно растущих побегов. Экспланты помещали на поверхность агаризированной питательной среды в условиях ламинарного бокса Fatran Lf. Культивировали на питательных средах Gamborg и Eveleigh (B5) [7], Quoirin и Lepoivre (QL) [8], PS (в нашей модификации). Для изучения морфогенетических потенций органов и тканей в питательную среду добавляли бензиламинопурин (БАП) и гибберелловую кислоту (ГК₃). Пробирки с эксплантами

помещали в культуральную комнату с заданным режимом интенсивности освещения (1,5-2 клк), 16-ти часовым фотопериодом и температурой $23\pm 1^{\circ}\text{C}$.

Результаты и обсуждение

Для индукции морфогенеза использовали питательные среды В5, QL, PS. Начало развития эксплантов отмечали на 4-5 сутки после введения в условия *in vitro*. Установлено, что развитие верхушечной части активно растущих побегов проходило без существенных морфологических изменений эксплантов таких сортов, как Сказка, Талисман и Анонс. Однако, в дальнейшем, их развитие у сорта Анонс прекращалось. Через 14-16 суток культивирования они теряли тургор, листья бледнели и опадали. В отдельных опытах у сорта Рубиновая Ранняя экспланты темнели. У 33,3% неповрежденных эксплантов данного сорта наблюдали отмирание точки роста. При культивировании верхушек сортов Сказка и Талисман в течение 30-45 суток на среде В5 формировались утолщенные, сидячие розетки с ярко-зелеными листьями длиной 1,5-1,8 см (рис. 1).



Рис. 1. Развитие верхушечной части активно растущих микропобегов черешни сорта Талисман

Выявлена зависимость морфологических реакций тканей и органов черешни в условиях *in vitro* от генотипа исходного растения. В одних и тех же условиях культивирования экспланты проявляли различную способность к регенерации микропобегов. Апикальное доминирование снимали введением в питательную среду БАП в концентрации 2,22-8,90 мкМ. Так, на среде В5, дополненной БАП в концентрации 2,22 мкМ для эксплантов исследуемых сортов черешни, введенных в условия *in vitro*, характерно вытягивание и утолщение стебля. Длина микропобега составляла 0,6-1,4 см и многочисленные полураскрытые листья были собраны в розетку. На среде QL, содержащей БАП в концентрации 4,40 мкМ, процент слабо развившихся микропобегов увеличивался до 25-40%. На средах с БАП 6,60-8,90 мкМ у эксплантов отмечали появление хлоротичных листьев и оводнение верхушек микропобегов. При этом происходило удлинение листовой пластинки (2,5-3,5 см) и сильное закручивание (рис. 2).

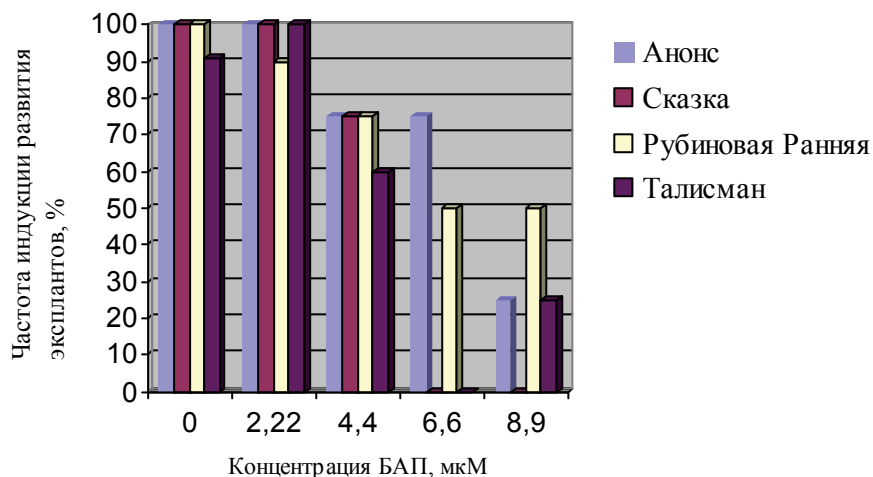


Рис. 2. Влияние БАП на индукцию развития эксплантов (меристем) черешни сортов Анонс, Сказка, Рубиновая Ранняя, Талисман

Для удлинения микропобегов и индукции развития пазушных почек в питательную среду PS добавляли 2,22-4,40 мкМ БАП и ГК₃ в концентрации 0,73-2,89 мкМ. Установлено, что ГК₃ оказывало существенное влияние на развитие первичных эксплантов. Так, у микропобегов сорта Сказка, на питательной среде PS, содержащей БАП и 1,44-2,16 мкМ ГК₃, активно развивались новые зеленые листья, длина листовых пластинок составила 0,8-1,0 см. При этом показано, что у 40% эксплантов исследуемого сорта происходило формирование дополнительных почек (рис. 3).

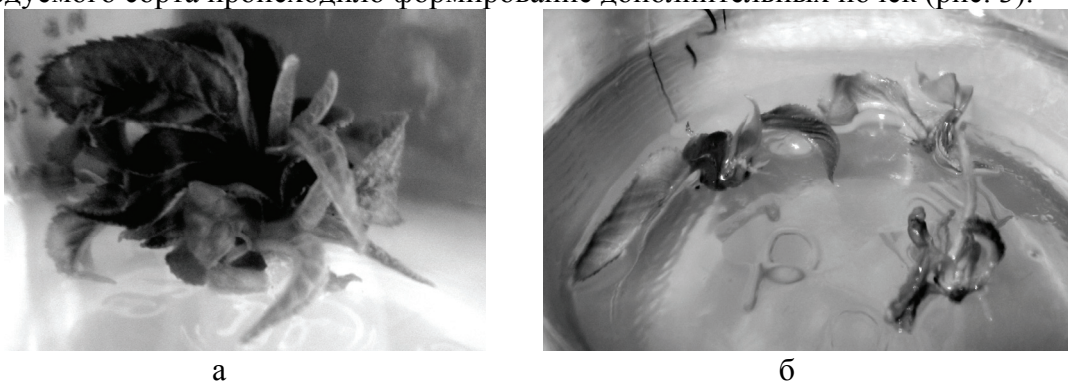


Рис. 3. Образование дополнительных почек сорта Сказка на среде PS с ГК₃:
 а – конгломерат неразделенных микропобегов
 б – отдельные адвентивные микропобеги

Наряду с этим у 8% эксплантов сорта Рубиновая Ранняя адвентивные микропобеги регенерировали на среде, дополненной 0,73-1,44 мкМ ГК₃. Увеличение концентрации ГК₃ (2,16-2,89 мкМ) способствовала оводнению тканей у эксплантов сортов Анонс и Талисман. На данном этапе дополнительные почки у этих сортов не формировались (рис. 4).

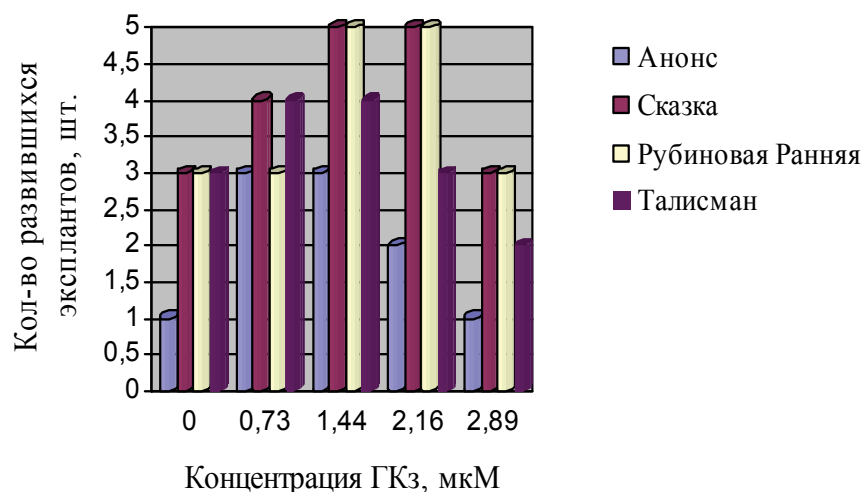


Рис. 4. Влияние ГК₃ на развитие эксплантов черешни в условиях *in vitro*

Таким образом, сравнение морфогенетического потенциала вегетативных почек и апикальной части активно растущих побегов и меристематических тканей четырех сортов черешни в условиях *in vitro* показало зависимость развития экспланта от генотипа исходного растения, регуляторов роста и их концентраций в питательной среде. Установлено влияние БАП и ГК₃ на процессы регенерации микропобегов черешни в условиях *in vitro*. Добавление БАП в питательную среду для индукции морфогенеза в концентрации 2,22 мкМ вызывало формирование микропобегов. Концентрация ГК₃ 1,44-2,16 мкМ стимулировала регенерацию микропобегов и удлинение листовой пластинки у сортов Сказка и Рубиновая Ранняя. Выявлено, что для развития меристематических тканей сортов черешни Анонс и Талисман достаточна более низкая концентрация ГК₃ (0,73-1,44 мкМ).

Литература

1. Бленда А.В. Мікроклональне розмноження *in vitro* представників підродини *Prunoideae* // Физиология и биохимия культурных растений. – 2000. – Т 32, №5. – С. 428-434.
2. Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. – М.: Наука. – 1964. – 272 с.
3. Калинин Ф.Л., Кушнир Г.П., Сарнацкая В.В. Технология микроклонального размножения растений. – Киев: Наукова думка. – 1992. – 232 с.
4. Митрофанова О.В., Митрофанова И.В., Смыков А.В., Лесникова Н.П. Методы биотехнологии в селекции и размножении субтропических и косточковых плодовых культур // Труды Никит. ботан. сада. – 1999. – Т.118. – С.189-199.
5. Митрофанова О.В., Славгородская-Куприева Л.Е., Митрофанова И.В., Лукичева Л.А. Диагностика вирусных болезней и биотехнологические приемы получения безвирусного посадочного материала косточковых плодовых культур. – Ялта: Крымпресс, 2000. – 45 с.
6. Voxus Ph., Quorin M. La culture de meristems apicaux de Quelques especes de *Prunus* // Bull. Soc. Rog. Bot. Belgique. – 1974. – V. 107, №1. – P. 91-101.
7. Gamborg O.L., Eveleigh D.E. Culture methods and detection of glucanases in cultures of wheat and barley // Can. J. Biochem. – 1968. – V. 46, №5. – P. 417-421.
8. Quoirin M., Lepoivre Ph. Etude de milieux adaptés aux cultures *in vitro* de *Prunus* // Acta Hort. – 1977. – Vol. 78. – P. 437-442.

Резюме

Представлены результаты регенерации эксплантов 4-х сортов черешни (Рубиновая Ранняя, Сказка, Талисман, Анонс) в условиях *in vitro*. Установлена

зависимость индукции развития микропобегов от различных концентраций БАП и ГК₃ в питательной среде.

Викладено результати регенерації експлантів чотирьох сортів черешні (Рубінова Ранняя, Казка, Талісман, Анонс) в умовах *in vitro*. Встановлено залежність індукції розвитку мікропагонів від різних концентрацій БАП та ГК₃ у живильному середовищі.

Results of explants regeneration of four sweet cherry cultivars (Rubinovaya Rannaya, Skazka, Talisman, Anons) in conditions *in vitro* have been submitted. Dependence of an induction of microshoots development from various BAP and GA concentrations in culture medium has been revealed.

ЛОБАНОВА Е.И.¹, ИГНАТОВА С.А.¹, ШЕСТОПАЛ О.Л.¹, НАРГАН Т.П.²

¹Южный биотехнологический центр в растениеводстве УААН,
Украина, 65036, г. Одесса, Овидиопольская дор., 3, e-mail: lobanovakatyia@mail.ru

²Селекционно-генетический институт – Национальный центр семеноведения и сортоизучения УААН, Украина, 65036, г. Одесса, Овидиопольская дор., 3.

РЕГЕНЕРАЦИЯ В КУЛЬТУРЕ ПЫЛЬНИКОВ ОЗИМОЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ У ГЕНОТИПОВ С РАЗНОЙ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬЮ ПЕРИОДА «ВСХОДЫ-КОЛОШЕНИЕ»

Одним из методов получения удвоенных гаплоидов пшеницы и других злаков в современной биотехнологии является культура пыльников. Полученный на этой основе линейный материал использовался для ускорения различных этапов в селекции мягкой пшеницы [1-4]. Важным показателем его эффективности является уровень регенерации растений, чем фактически определяется результативность метода при использовании его для целей селекции. Поэтому в плане совершенствования данной биотехнологии поиск путей повышения регенерации растений в культуре пыльников на селекционном материале озимой мягкой пшеницы является актуальным.

В настоящее время в селекции озимой мягкой пшеницы на юге Украины большое внимание уделяется созданию высокопродуктивных скороспелых сортов с непродолжительным периодом «всходы колошение». По мнению исследователей, создание такого материала может быть определяющим фактором в поддержании генотипом оптимального физиологического состояния для эффективной реализации адаптивного потенциала [5-8]. В работах ряда авторов [9-10] было показано, что именно физиологическое состояние донорного материала являются факторами, определяющими результативность метода. Связь между продолжительностью вегетационного периода и показателями андрогенеза *in vitro* была показана на рисе [11], тритикале [12], ячмене [13]. Это обуславливает необходимость проведения исследований, направленных на изучение связи между продолжительностью отдельных фаз онтогенеза и показателями андрогенеза *in vitro* на озимой мягкой пшенице. Целью нашей работы было изучение уровня связи между физиологическим признаком «продолжительность периода всходы – колошение» и показателями андрогенеза *in vitro* и, в частности регенерации растений, у различных гибридов и сортов озимой мягкой пшеницы.

Материалы и методы

В качестве донорного материала для культуры пыльников использовали генотипы озимой мягкой пшеницы, характеризующиеся разной продолжительностью периода «всходы – колошение», сутки: линия Лютеценс 155 (182), сорта – Фантазия одесская (186), Одесская красноколосая (187), Чайка (192), Мерсиа (193), гибриды F₂ –

[Зирка х Зразкова] х Леля (211), [Зирка х Зразкова] х Никония (213), [Зирка х Зразкова] х Куяльник (215), [Зирка х Зразкова] х Кирия (216), Багира х Леля (207), Багира х Бунчук (216).

Донорные растения выращивали в полевых условиях. Для введения в культуру пыльников, побеги с колосьями донорных растений срезали, когда микроспоры в них находились на фазе вакуолизированной микроспоры (ВМК) – от слабо- до сильно-вакуолизированной. Фазу развития микроспор определяли цитологическим методом. У исследуемых сортов и гибридов озимой мягкой пшеницы определяли продолжительность периода «всходы – вакуолизированная микроспора» и «всходы – колошение».

Проводили холодовую предобработку побегов с колосьями в воде, в темноте, при +2+4°C, 3 суток. Стерильно выделенные пыльники культивировали по методике, описанной ранее [14]. Статистическую обработку данных проводили по методике Рокицкого [15] с использованием стандартных компьютерных программ.

Результаты и обсуждение

В процессе работы было проведено исследование показателей эффективности гаплопродукционного процесса у сортов и гибридов озимой мягкой пшеницы: процента новообразований и регенерации растений (табл. 1, 2). В ходе эксперимента отмечена высокая генотипическая специфичность выявленных показателей андрогенеза *in vitro* в культуре пыльников выше указанных генотипов. Это подтверждает мнение исследователей [16-18 и др.], о том, что среди факторов, влияющих на эффективность гаплопродукции в культуре пыльников пшеницы в целом, и на регенерацию растений, в частности, решающая роль принадлежит генотипу донорных растений.

Было выявлено, что наиболее высокие показатели гаплопродукции, как на этапе формирования новообразований, так и на этапе регенерации растений, имели генотипы, отличавшиеся непродолжительным периодом «всходы – колошение» (В-К). Так максимальный уровень сформированных новообразований - 10,12 %, 6,56 % и регенерации растений - 3,47 %, 2,25 % был отмечен у линии Лютесценс 155 и сорта Фантазия одесская, соответственно. Данные сорта характеризовались наименьшим периодом «всходы – колошение» - 182 и 186 суток, соответственно (табл. 1).

Таблица 1

Регенерация растений в культуре пыльников озимой мягкой пшеницы у генотипов с разной продолжительностью периода «всходы – колошение» (В - К) и «всходы – вакуолизированная микроспора» (В – ВМК)

Генотип	Продолжительность периода, сут.		Количество		Регенерация, % от высаженных пыльников		
	В-К	В-ВМК	пыльни-ков, шт.	новообразова-ний, %	зеленых	альбинос-ных	общая
Лютес-ценс 155/89	177	182	346	10,12 ± 1,62	2,89 ± 0,9	0,58 ± 0,41	3,47 ± 0,98
Фантазия одесская	180	186	488	6,56 ± 1,12	2,05 ± 0,64	0,20 ± 0,2	2,25 ± 0,67
Од. красно-колосая	181	187	397	5,04 ± 1,21*	0,50 ± 0,35*	0,50 ± 0,35	1,01 ± 0,5
Чайка	186	192	350	4,86 ± 1,15*	0,29 ± 0,29*	0,29 ± 0,29	0,57 ± 0,4*
Mercia	188	193	505	0,79 ± 0,39*	-	-	-

Примечания: * - разница достоверна при $P \leq 0,05$

Среди сортовых популяций, необходимо отметить сорт Mercia, с продолжительным периодом «всходы – колошение» (193 суток), проявивший наименьшую отзывчивость в культуре *in vitro* (новообразований – 0,79 %, растений не получено). Гибриды [Зирка х Зразкова] х Леля и [Зирка х Зразкова] х Никония отличались высокой регенерацией – 7,8 и 4,8 %, и характеризовались непродолжительным периодом «всходы – колошение» (211, 213 суток, соответственно). В то время как, у генотипов, с более продолжительным периодом «всходы – колошение» (215, 216 дней), показатели андрогенеза были значительно ниже. Так, у гибридов [Зирка х Зразкова] х Кирия (216 суток) не было сформировано новообразований, а у гибрида [Зирка х Зразкова] х Куяльник (215 суток) наблюдали формирование незначительного количества новообразований, которые в дальнейшем не проявили способности к регенерации (табл. 2).

Такая же тенденция сохранилась и среди гибридных потомков других родительских форм. Так, гибриды Багира х Леля, с ранним колошением и продолжительностью периода «всходы – колошение» 207 суток, характеризовался высокими показателями андрогенеза: процент новообразований составили 7,7, регенерации - 4,4. У гибрида Багира х Бунчук, с поздним колошением, не было отмечено формирования новообразований и регенерации (табл. 2).

Таблица 2

Регенерация растений в культуре пыльников озимой мягкой пшеницы у гибридных форм с разной продолжительностью периода «всходы – колошение» (В - К) и «всходы – вакуолизованная микроспора» (В - ВМК)

Примечания: * - разница достоверна при $P \leq 0,05$

Генотип	Продолжительность периода, сут		Количество		Регенерация, % от высаженных пыльников		
	В - К	В - ВМК	пыльников, шт.	новообразований, %	зеленых	альбиносных	общая
[Зирка х Зразкова] х Леля	209	211	578	10,6 ± 1,3	7,1 ± 1,1	0,7 ± 0,3	7,8 ± 1,1
[Зирка х Зразкова] х Никония	210	213	607	8,7 ± 1,2	4,6 ± 0,9	0,2 ± 0,2	4,8 ± 0,8
[Зирка х Зразкова] х Куяльник	213	215	526	1,9 ± 1,0 *	-	-	-
[Зирка х Зразкова] х Кирия	213	216	436	-	-	-	-
Багира х Леля	204	207	181	7,7 ± 2,0	3,3 ± 1,3	1,1 ± 0,8	4,4 ± 1,5
Багира х Бунчук	214	216	435	-	-	-	-

Определена отрицательная корреляционная связь между «продолжительностью периода всходы – колошение» и регенерацией зеленых растений в культуре пыльников озимой мягкой пшеницы. Так, для сортов она составляла -0,96, а для гибридов -0,54. Таким образом, уровень регенерации растений в культуре пыльников пшеницы был

достоверно выше у генотипов, с менее продолжительным периодом «всходы – колошение».

Период развития «всходы – колошение» включает в себя срок развития пыльника - фазу ВМК, с которой начинается введение пыльника в культуру. На этом этапе прекращается начатое *in vivo* развитие микроспор по гаметофитной программе. Дальнейшее развитие микроспор в пыльниках, проходит в условиях *in vitro* по спорофитной программе. По мнению многих исследователей [19, 20] именно фаза ВМК, является оптимальной для развития микроспор по спорофитному пути в условиях *in vitro*. В ходе исследования отмечали календарную дату, соответствующую фазе развития растений, когда в пыльниках первых побегов микроспоры находились на вакуолизированной фазе развития, была определена продолжительность периода «всходы – вакуолизированная микроспора».

Связь периодов развития «всходы – колошение» и «всходы – вакуолизированная микроспора», на использованном в данной работе материале табл.1, 2, бесспорна. Генотипы, характеризующиеся более ранним периодом колошения, раньше проходят фазу вакуолизированной микроспоры. Было установлено, что наибольшей регенерацией зеленых растений (2,89 % и 2,05 %) в культуре пыльников озимой мягкой пшеницы обладали генотипы Лютесценс 155 и Фантазия одесская с непродолжительным периодом «всходы – вакуолизированная микроспора» (177 и 180 суток). Учитывая тот факт, что на фазе ВМК происходит введение пыльников в культуру *in vitro* и переключение развития микроспор, использование данного показателя для оценки гаплопродукционной способности разных генотипов пшеницы, по нашему мнению, является более корректным. Таким образом, его можно использовать в качестве маркера для отбора из разных популяций наиболее отзывчивых к андрогенезу генотипов мягкой пшеницы.

Таким образом, в исследованиях по определению уровня регенерации *in vitro* у генотипов мягкой пшеницы, в качестве дополнительного критерия, был использован показатель продолжительности периода «всходы – вакуолизированная микроспора». Была установлена отрицательная корреляционная связь между регенерацией зеленых растений и продолжительностью периода «всходы – вакуолизированная микроспора», которая составляет для сортов -0,84, для гибридов -6,2. Исходя из этого, продолжительность периода «всходы – вакуолизированная микроспора» является важным показателем эффективности регенерации в культуре пыльников пшеницы. Предложено использовать данный показатель при подборе наиболее «отзывчивых» к андрогенезу в культуре пыльников образцов мягкой пшеницы.

Выводы

1. Уровень регенерации зеленых растений в культуре пыльников пшеницы был достоверно выше у генотипов, характеризующихся низкой продолжительностью периода «всходы – вакуолизированная микроспора» и «всходы – колошение».
2. Установлена корреляционная связь между регенерацией зеленых растений в культуре пыльников *in vitro* и продолжительностью периода «всходы - вакуолизированная микроспора» для сортов ($r = -0,83$) и для гибридов ($r = -0,70$), а также - продолжительностью периода «всходы – колошение» - для сортов ($r = -0,96$) и для гибридов ($r = -0,54$) озимой мягкой пшеницы
3. Предложено использовать показатель «продолжительности периода всходы – вакуолизированная микроспора» и периода «всходы – колошение» для прогнозирования уровня регенерации генотипов озимой мягкой пшеницы в культуре пыльников.

Литература

1. *Hu Han*. Wheat: Improvement Through Anther Culture // Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 2: Crops I (ed. by Y.P.S. Bajaj), 1986.

2. *Han Hu.* In vitro induced haploids in wheat // In vitro Haploid Production in Higher Plants, Vol. 4, 73-97.
3. *Pauk J., Kertesz L., Beke B., Bona L., Csoz M., Matus J.* New Winter Wheat Variety: «GK Delibab» Developed via Combining Conventional Breeding and In Vitro Androgenesis // Cer. Res. Commun. – 1995. – Vol. 23, № 3. – P/ 251-256.
4. *G.S. Knush, S.S. Virmani.* Haploids in plant breeding // In vitro Haploid Production in Higher Plants, Vol. 1, 11-33.
5. *Лыфенко С.Ф., Ериняк Н.И., Нарган Т.П.* Селекция сортов озимой мягкой пшеницы интенсивного типа // Збірник наукових праць СГІ-НАЦ НАІС. – Одеса. – В.3.(43). – 2002. – С. 22-42.
6. *Нарган Т.П., Лыфенко С.Ф.* Эффективность отбора по признаку продолжительность периода всходы – колошение при селекции озимой пшеницы // Фактори експериментальної еволюції організмів. – Київ: Аграрна наука. – 2003. – С. 174-179.
7. *Нарган Т.П.* Залежність господарсько корисних ознак озимої м'якої пшениці від тривалості вегетаційного періоду // Збірник наукових праць СГІ-НАЦ НАІС. – Одеса. – 2004. – В.4(44). – С. 56-62.
8. *Нарган Т.П.* Вплив тривалості вегетаційного періоду на господарсько корисні ознаки сортів і ліній озимої м'якої пшениці на півдні України: Автореф. Дис... канд. с/х. наук.: 06.01.05/ СГІ - Одеса, 2005. – 18 с.
9. *Дьячук Т.И.* Технические и селекционные аспекты гаплоидии (на примере пшеницы и ячменя): Автореф. Дис... д-ра. биол. наук.: 06.01.05 - Саратов, 2003. – 49 с.
10. *Приходько Н.И.* Влияние условий выращивания донорных растений на андрогенез в культуре пыльников пшеницы (*Triticum aestivum* L.) // Генетические исследования злаковых культур. сб. науч. тр. по прикладной ботанике, генетике, селекции, Т.128). – Л., изд. ВИР, 1989. – С. 86-89.
11. *Харченко П.Н.* Получение гаплоидов и гомозиготных линий у риса методом *in vitro*: Автореф. дис... канд.. биол. наук: 03.00.15 - Ленинград, 1986. – 18 с.
12. *Игнатова С.А.* Биотехнологические основы получения гаплоидов, отдаленных гибридов и соматических регенерантов зерновых и бобовых культур в различных системах *in vitro*: Автореф. дис... доктора биол. наук: 03.00.20 - Ялта, 2004. – 48 с.
13. *Литовкін К.В.* Генотипові особливості морфогенетичних реакцій в культурі тканин ячменю: Автореф. дис... канд.. биол. наук: 03.00.20 - Ялта, 2003. – 20 с.
14. *Лобанова К.І., Шестопал О.Л., Ігнатова С.О.* Абсцизова кислота як екзогенний фактор підвищення регенераційного потенціалу в культурі пиляків м'якої пшениці // Вісник Харківського Національного Аграрного Університету. – 2007. – Вип. 1 (10). – С. 102-110.
15. *Рокицкий П.Ф.* Биологическая статистика. – Минск: Изд-во Минского унта, 1973. – 316 с.
16. *Жосонар М.В., Игнатова С.А., Файт В.И., Федорова В.Р.* Гаплопродукционная способность в культуре пыльников сортов и линий озимой мягкой пшеницы, различающихся по генам роста и развития // Вісник Харківського Національного Аграрного Університету. – 2005. – Вип. 2 (7). – С. 94-99.
17. *Золотова Т.М., Никонов В.И.* Оценка коллекции сортов мягкой пшеницы (*Tr. aestivum* L.) по морфогенетической способности в культуре пыльников *in vitro* // Материалы Межд. конф. «Молекулярная генетика и биотехнология». – 1998, С. 178-179
18. *Сатыбалдиев Д.Д., Казкеев Д.Т., Евдакова Н.А., Анапияев Б.Б.* Факторы, влияющие на частоту процессов эмбриогенеза в культуре микроспор пшеницы *in vitro* // VIII International Conference. The Biology of Plant Cell in vitro and Biotechnology. Abstracts, Saratov, 2003, P. 277.
19. *Горбунова В.Ю., Круглова Н.Н.* // Известия РАН. Серия биологии. – 1997, № 6. – С. 668-676.

20. Круглова Н.Н. Микроспора злаков как модельная система для изучения путей морфогенеза: Автореф. ...д-ра биол. наук / 03.00.05. – Институт биологии Уфимского центра РАН. – Уфа. – 2002. – 48 с.

Резюме

Исследована способность к регенерации новообразований в культуре пыльников пшеницы у генотипов, отличающихся продолжительностью периода «всходы-колошение». Показано, что уровень регенерации зеленых растений в культуре пыльников пшеницы выше у генотипов, с более непродолжительным периодом «всходы – колошение». Предложено использовать продолжительность периода «всходы – вакуолизирующая микроспора» при прогнозировании уровня регенерации генотипов в культуре пыльников озимой мягкой пшеницы.

Досліджена регенераційна здатність новоутворень в культурі пиляків у генотипів, які відрізнялися за тривалістю періоду розвитку «сходи-колосіння». Показано, що рівень регенерації зелених рослин в культурі пиляків пшениці вищий у генотипів, із нетривалим періодом «сходи-колосіння». Запропоновано використовувати показник тривалості періоду «сходи-вакуолізована мікроспора» при прогнозуванні рівня регенерації генотипів в культурі пиляків м'якої пшениці.

Research of regeneration ability of new formations in the anther culture of wheat at genotypes different by duration of «ear emergence - heading» period was conducted. It was shown, that the level of regeneration of green plants in the anther culture of wheat is higher at genotypes, with shorter «ear emergence - microspore» period. It was suggested to use duration of period «ear emergence - microspore» at prognostication of genotypes with high level of regeneration in the anther culture of common wheat.

МИТРОФАНОВА И.В., ЕЖОВ В.Н., ИВАНОВА Н.Н., ЧЕЛОМБИТ С.В.

*Никитский ботанический сад – Национальный научный центр,
Украина, 98648, АР Крым, Ялта, e-mail: in_vitro@ukr.net*

РАЗЛИЧНЫЕ ПУТИ МОРФОГЕНЕЗА *IN VITRO* КАЛАДИУМА (*CALADIUM HORTULANUM* BIRDSEY.) КАК СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ И СОХРАНЕНИЯ РАСТЕНИЙ

Каладиум (*Caladium hortulanum* Birdsey.) относится к семейству ароидных и очень популярен среди декоративных растений. Эту культуру в последние годы широко используют для озеленения зимних садов. Однако, известно, что каладиум очень трудно размножается традиционными методами [4].

Первые работы по культуре тканей *C. hortulanum* появились в начале 70-х годов прошлого столетия. Они касались изучения вирусных болезней этой культуры и разработки метода культуры меристем для оздоровления [8]. Значительно позже появились отдельные публикации об исследованиях прямой и непрямой регенерации растений каладиума в условиях *in vitro* [2, 5, 7, 10]. В настоящее время американские ученые работают в области селекции *in vitro* каладиума. Проращивая пыльцу этого растения, они научились в течение короткого времени сохранять ее в условиях *in vitro* [6]. Впервые изучением вопросов соматического эмбриогенеза *in vitro* каладиума начали заниматься в отделе биотехнологии и биохимии растений НБС-ННЦ [3].

Однако результаты всех работ, проводимых с культурой каладиума, показали, что до сих пор не выявлены морфогенетические потенции органов и тканей различных сортов каладиума в условиях *in vitro* и соответственно не разработаны эффективные

биотехнологические системы получения и сохранения этого трудноразмножаемого растения.

Целью настоящего исследования было выявление различных путей морфогенеза растений каладиума (*C. hortulanum*) в условиях *in vitro*.

Материалы и методы

Исследования по культуре органов и тканей каладиума выполняли на базе отдела биотехнологии и биохимии растений Никитского ботанического сада – Национального научного центра в 2001-2005 гг. Для исследований были отобраны два сорта, из коллекционного генофонда НБС-ННЦ и 3 сорта, любезно предоставленные нам сотрудником Литовского аграрного университета Dr. Simas Gliozeris: сильнорослый – сорт *Triumphe de Compte*, среднерослые – сорта *Pink Gem*, *Gypsy Rose*, *White Christmas*, низкорослый – *Frieda Hempel*. Период вегетации этих растений – с апреля по ноябрь.

Для стерилизации растительных эксплантов, отобранных с взрослых растений в период с мая по сентябрь, использовали различные антисептики, такие как 70%-ный этиловый спирт (C_2H_5OH), 1% и 1,8%-ные растворы гипохлорита натрия ($NaClO$), 0,08%-ный раствор $AgNO_3$, 1%-ный раствор *Thimerosal* (*Sigma*, США). Эффективность стерилизации повышали за счет добавления в стерилизующие растворы детергента *Tween-80* (2-3 капли).

Работу по вычленению первичного экспланта проводили в ламинарных боксах марки «*Fatran Lf*» (Чехия).

Для культивирования эксплантов использовали питательную среду, содержащую минеральные соли по прописи Мурасиге и Скуга (МС) [9]. Во все питательные среды добавляли 554,93 мкМ мезоинозита, 0,1 мкМ тиамина- HCl , 2,43 мкМ пиридоксина- HCl , 4,06 мкМ никотиновой кислоты, 3% сахарозы, 0,8% агара. рН среды доводили до показателя 5,6.

Для индукции регенерационных процессов *in vitro* каладиума в питательные среды добавляли 1,36-5,56 мкМ зеатина, 1,0-9,0 мкМ тидиазурона (ТДЗ, *Sigma*, США), кинетин (*Sigma*, США) в концентрации 1,39-4,60 мкМ и 5,37 мкМ НУК (*Sigma*, США), БАП (*Sigma*, США) в концентрации 0,89-4,40 мкМ и 1,07-5,37 мкМ НУК, 0,98-2,48 мкМ ИМК (*Sigma*, США).

Высечки листа культивировали в термостате при температуре 25 °С в отсутствие освещения, а также в культуральной комнате на свету при постоянной температуре 24 ± 1 °С, интенсивности освещения $40 \text{ мкМ м}^{-2} \text{ с}^{-1}$ и 16-часовом фотопериоде.

Субкультивирование тканей и органов проводили через 30 суток. Каждый эксперимент был поставлен трижды в 10-кратной повторности.

Для приготовления препаратов растительную ткань фиксировали в растворах 2,5% глутарового альдегида с 2% формальдегидом, затем пропитывали пропиленгликолем при -20°C, после чего заливали в ПЭГ-1500 [1]. Срезы получали с использованием микротомы «МС-2» (Россия) толщиной 5 и 10 микрон и окрашивали 0,1%-ным водным раствором акридинового оранжевого, 0,5%-ным водным раствором толуидинового синего и DAPI. Препараты исследовали с помощью флуоресцентного микроскопа «*Leica DMLB*» (Германия).

Результаты и обсуждение

Известно, что правильный выбор первичного экспланта, способа стерилизации, применение экзогенных регуляторов роста, условия культивирования позволяют регулировать морфогенетические процессы в культуре органов и тканей и получать желаемый результат. В качестве первичных эксплантов были использованы высечки листа и сегменты черешков каладиума сортов *Pink Gem*, *Triumphe de Compte*, *Gypsy Rose*, *Friedf Hempel*, *White Christmas*. Отбор листьев с черешками исследуемых сортов каладиума и введение их в культуру *in vitro* проводили с началом появления нормальных листьев (май) и в период его вегетации по сентябрь включительно. Было установлено,

что листья, отобранные в период с мая по июль, были наиболее морфогенными, при этом частота образования соматических зародышей достигала 86-100%.

Одной из основных проблем, препятствующих успешному применению биотехнологических методов в размножении растений, является стерилизация исходного растительного материала эксплантов для получения асептической культуры. Нам удалось освободить исходный материал от экзогенной бактериальной и грибной инфекции, применяя метод последовательной стерилизации в 1,8%-ном растворе гипохлорита натрия (5 мин) и 70%-ном этаноле (1 мин). Присутствие в качестве антисептиков нитрата серебра и Thimerosal способствовало выходу $79,3 \pm 5,3\%$ стерильных эксплантов, однако их воздействие вызывало не только сильный ожог тканей, но снижало частоту регенерации микропобегов.

В процессе исследования был модифицирован состав питательной среды МС (С1) и подобраны оптимальные концентрации цитокинина для индукции морфогенетических процессов в тканях листа, приводящих к соматическому эмбриогенезу. Нами было отмечено, что использование зеатина не оказывало индуцирующее действие как на процессы дедифференциации, так и дифференциации тканей листа. В присутствии ТДЗ по периметру высечки листа формировался рыхлый светло-зеленый каллус. Введение кинетина в концентрации 2,32 мкМ способствовало образованию соматических зародышей на 50-72% листовых дисках у исследуемых сортов каладиума.

Вычлняя высечки листа размером 10 x 10 мм из разных зон только что раскрывшейся листовой пластинки и помещая их на питательную среду с кинетином, удалось определить наиболее морфогенные зоны, способные к прямому и непрямому соматическому эмбриогенезу. Это зоны соединения листовой пластинки с черешком и край высечки листа. Период развития от введения первичных эксплантов обоих сортов каладиума в культуру до появления глобулярных структур по краю высечки листа без этапа каллусообразования составил 30 суток.

Наряду с этим было установлено, что путь реализации морфогенетического потенциала эксплантов зависит от условий культивирования. Так, в термостате формировались только соматические зародыши. Эмбриоид в среднем формировал 2-3 корешка. Особых различий в количестве и длине корней у соматических зародышей, образовавшихся из высечек листа и сегментов черешка, отмечено не было. Однако корни у эмбриоидов, развивающихся из листа, были мощнее и имели корневые волоски. На свету происходило три морфогенетических процесса: органогенез в морфогенном каллусе, непрямой и прямой соматический эмбриогенез. В зоне соединения листовой пластинки с черешком эмбриогенные структуры появлялись непосредственно в эпидермальной и субэпидермальной зоне высечки листа. В течение последующих 30 суток наблюдали развитие полноценных соматических зародышей. В присутствии кинетина в питательной среде С1 в концентрации 2,32 мкМ и 5,37 мкМ НУК среднее количество соматических эмбриоидов на эксплант достигало $10 \pm 1,4$ штук. Последующие пассажи соматических зародышей на питательную среду С1 индуцировали вторичный эмбриогенез. Вторичные эмбриоиды формировались непосредственно на первичных соматических зародышах.

В процессе исследований было выявлено, что на индукционной среде растения развивались очень медленно, поэтому для массового образования растений из эмбриоидов концентрацию НУК уменьшали в 10 раз. Весь процесс от введения эксплантов до регенерации растений составил 3 месяца.

При культивировании *in vitro* высечек листа каладиума на средах с БАП и НУК было отмечено различие в особенностях органогенеза и соматического эмбриогенеза у 5 сортов каладиума. Так, меристемоиды, из которых затем развивались адвентивные почки у сорта Pink Gem и Gypsy Rose, формировались в каллусе. При этом у сорта Triumphe de Compte, White Christmas and Frieda Hempel адвентивные почки и

эмбриониды образовывались непосредственно по краю высечки листа без этапа каллусообразования. В результате проведенных исследований установлены оптимальные концентрации регуляторов роста (2,22 мкМ БАП и 2,69 мкМ НУК – питательная среда С2), индуцирующие формирование максимального количества микропобегов и эмбрионидов. Увеличение концентрации регуляторов роста приводило к снижению регенерационного потенциала и оводнению образовавшихся микропобегов. В том случае, когда путь развития экспланта реализовался через непрямую регенерацию микропобегов, в течение 20-30 суток на эксплантах образовывался компактный каллус светло-зеленого цвета. После этапа каллусообразования через 14 суток культивирования отмечали появление меристематидов. Затем на 21 сутки происходила регенерация микропобегов, а в течение последующих 14 суток появлялись корни и развивались полноценные растения. После декапетирования регенерантов в их основании активно закладывались адвентивные почки. Количество адвентивных микропобегов достигало в среднем 15-20 штук на эксплант.

Образование соматических зародышей в эмбрионном каллусе также происходило на питательной среде С2. Однако появление эмбрионидов было отмечено на 7 сутки после образования каллуса. При таком способе формирования эмбрионидов для глобулярных зародышей была характерна более насыщенная зеленая окраска. Формирование соматических зародышей происходило асинхронно: в одно и то же время появлялись новые эмбриониды и развивались растения (рис.). Регенеранты легко отделялись от самого каллуса и их высаживали на адаптацию в условия *in vivo* или дорастивали на питательной среде с 0,02 мкМ НУК.

Путем прямой регенерации микропобегов при последовательных субкультивированиях из одного экспланта в течение года можно получить до $5 \cdot 10^6$ микропобегов. Для укоренения микропобегов каладиума использовали ИМК в концентрации 0,98-2,48 мкМ. Среднее количество корней на эксплант достигало 4,5 штук.



Одновременное развитие эмбрионидов и растений каладиума на среде С2

В результате соматического эмбриогенеза из одной высечки листа можно было получить более $10 \cdot 10^6$ растений, исключая затраты на стадию укоренения.

Эффективность адаптации регенерантов каладиума в смешанном субстрате торфа и песка (3:1) или в перлите составила 90–96%.

Выводы

Таким образом, нами установлены оптимальные сроки отбора листьев каладиума (май-июль) для введения в условия *in vitro*. Показано, что в результате применения 1,8%-ный раствора гипохлорита натрия (5 мин) и 70%-ного этанола (1 мин) получено 96,5% эксплантов, свободных от контаминации. На основе изучения действия

экзогенных факторов (кинетина и НУК) на реализацию морфогенетического потенциала высечек листа 5 сортов каладиума определены основные пути регенерации растений и разработаны биотехнологические системы получения и сохранения каладиума через соматический эмбриогенез и органогенез *in vitro*.

Литература

1. Дженсен У. Ботаническая гистохимия. – М.: Мир, 1965. – 374 с.
2. Калинин Ф.Л., Кушинир Г.П., Сарнацкая В.В. Технология микроклонального размножения растений. – Киев: Наукова думка, 1992. – 232 с.
3. Митрофанова И.В., Соколов О.И., Митрофанова О.В., Иванова Н.Н. Пути реализации морфогенетического потенциала каладиума (*Caladium hortulanum* Birdsey.) и цветной каллы (*Zantedeschia hybrida*) в условиях *in vitro* // Біологічний вісник. – 2006. – Т. 10, № 1. – С. 64-67.
4. Чуб В., Лезина К. Все о комнатных растениях. – М.: ЭКСМО-Пресс, 2002. – 336 с.
5. Chan L.-K., Tan C.M., Chew G.S. Micropropagation of the Araceae ornamental plants // Acta Horticulturae. – 2003. – N 616. – P. 383-390.
6. Deng Z., Harbaugh B.K. Technique for *in vitro* pollen germination and short-term pollen storage in caladium // HortSci. – 2004. – Vol. 39. – P. 365-367.
7. Gliozieris S., Tamosiunas A., Stuopyte L. Effect of BAP and 2,4-D on *in vitro* regeneration of some cultivars of *Caladium hortulanum* // Plant Tissue Culture: Abstracts 4th Intl. Conf. (1-3 Nov. 2001, Dhaka). – Dhaka, 2001. – P. 26.
8. Hartman R.D. Dasheen mosaic virus and other phytopatogen eliminated from caladium, taro and cocoyam by culture of shoot tips // Phytopath. – 1974. – Vol. 64. – P. 237-240.
9. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. – 1962. – Vol. 15, N 3. – P. 473-497.
10. Tamosiunas A., Gliozieris S., Stuopyte L. Prospects for micropropagation of *Caladium* as pot plants production // Plant Tissue Culture: From Theory to Practice: Abstracts Intl. Conf. of Baltic States (27-28 May 2004, Salaspils, Latvia). – Salaspils, 2004. – P. 61.

Резюме

На основе соматического эмбриогенеза и органогенеза каладиума разработаны системы *in vitro* получения и сохранения растений. Исследовано влияние концентрации кинетина и БАП на индукцию формирования соматических зародышей и адвентивных почек. Регенеранты были адаптированы *in vivo*.

На основі соматичного ембріогенезу і органогенезу каладіума розроблено системи *in vitro* одержання та збереження рослин. Досліджено вплив концентрації кінетину і БАП на індукцію формування соматичних зародків та адвентивних бруньок. Регенеранти були адаптовані *in vivo*.

On the basis of somatic embryogenesis and organogenesis of caladium the *in vitro* systems of plants obtaining and preservation have been developed. Influence of kinetin and BAP concentration on inducing of somatic embryo and adventive buds formation has been investigated. The regenerants have been transferred to conditions *in vivo*.

ОРЛОВСКАЯ О.А., САКОВИЧ В.И., ЛЕМЕШ В.А., ХОТЫЛЕВА Л.В.

Институт генетики и цитологии НАН Беларуси,

Беларусь, 220072, Минск, ул. Академическая, 27, e-mail: O.Orlovskaya@igc.bas-net.by

**ВЛИЯНИЕ РАЗМЕРА ЭКСПЛАНТА НА РЕГЕНЕРАЦИЮ ПОБЕГОВ ИЗ
ГИПОКОТИЛЬНЫХ СЕГМЕНТОВ РАСТЕНИЙ ЛЬНА**

Лен принадлежит к одной из важнейших технических культур, значение которой в мире неизменно высоко. Волокно льна используется в текстильной, автомобильной, авиационной и других отраслях народного хозяйства. Льняное масло является незаменимым компонентом лакокрасочной, парфюмерной и многих других отраслей. Жмых – ценный корм для животных, а костра, являющаяся отходом льнотресты, используется для изготовления облицовочных плит и утеплительных материалов.

Для повышения эффективности льноводства ведутся интенсивные разработки новых способов повышения урожая волокна у льна-долгунца и семян у льна масличного. Одним из них является использование биотехнологических методов культивирования клеток и тканей *in vitro*, позволяющих расширить спектр генетического разнообразия, ускоренно получить выровненный по селективируемым признакам материал, быстро размножить и, в конечном итоге, в сжатые сроки создать качественно новые, конкурентоспособные сорта [1,2]. В мировой практике работы по введению льна в культуру *in vitro* начались более четверти века тому назад, однако исследования касались преимущественно масличного льна [3,4,5]. Получение регенерантов и трансгенных побегов льна-долгунца, остается одной из трудноразрешимых проблем. Большая часть исследований находится на стадии методической проработки и не вышла за пределы лабораторных испытаний [6,7].

Цель нашего исследования состояла в изучении влияния генотипа и величины гипокотильного сегмента на процессы каллусогенеза и регенерации растений льна в культуре *in vitro*, для разработки ускоренных методов вегетативного размножения ценных генотипов льна.

Материалы и методы

Материалом для исследования служили 3 гибрида льна-долгунца (Прамень×Оршанский, Прамень×К-65, Прамень×М-12) и 2 гибрида масличного льна (Gold Flax × Ручеек, Gold Flax×Лирина). Для изучения процессов каллусогенеза и регенерации растений льна использовали сегменты гипокотилей 6-дневных проростков. Семена гибридов стерилизовали 30 с в 70% этаноле, затем 7 мин в растворе диацета и 3-4 раза промывали в автоклавированной воде по 10 мин. Стерилизованные семена проращивали в чашках Петри на питательной среде T-med в течение 1-2 суток в темноте, а затем переносили в световую камеру. Спустя 3-5 дней сегменты гипокотилия переносили на питательную среду MS [8] с добавлением 1 мг/л БАП (6-бензиламинопурина) и 0,05 мг/л НУК (α -нафтилуксусная кислота). Культуру инкубировали при температуре 23°C и 16-часовом фотопериоде.

Нами изучена регенерационная способность гипокотильных сегментов различной величины. Для этого экспланты длиной 2-3, 4-6 и 7-10 мм высаживали отдельно. Эффективность каллусообразования оценивали как отношение числа эксплантов, образующих каллус, к общему числу эксплантов. Эффективность регенерации определяли через 5 недель после начала культивирования как отношение количества побегов (более 8 мм длиной) к общему количеству эксплантов.

Результаты и обсуждение

В ходе эксперимента выявлена способность к каллусообразованию для всех изученных генотипов, но частота каллусогенеза и интенсивность роста каллуса у них различалась. Высокая эффективность каллусообразования характерна для гибридных комбинаций Прамень×Оршанский, Прамень×К-65, Gold Flax×Лирина (табл.). Необходимо отметить, что у данных генотипов каллусы формировались одинаково хорошо на эксплантах разной величины, в то время как у гибридов Прамень×М-12 и Gold Flax×Ручеек на сегментах гипокотилия длиной 2-3 мм процесс каллусогенеза протекал с низкой частотой (4,71 и 23,4% соответственно). Экспланты размером 2-3 мм комбинации Прамень×М-12 продуцировали только мелкие каллусы с низкой скоростью наращивания сырой массы, в то время как на сегментах гипокотилия остальных изученных гибридов таких каллусов обнаружено меньше всего (табл.). Можно

подчеркнуть, что на 7-10 мм сегментах гипокотилия гибридного материала льна-долгунца больше формировалось крупных каллусов, чем средних и мелких (табл.).

Таблица

Эффективность каллусообразования у межсортовых гибридов льна из гипокотильных сегментов в зависимости от величины экспланта

Комбинация скрещивания	Длина гипокотильных сегментов, мм	Кол-во эксплантов, шт	Кол-во эксплантов, образующих каллус, шт	Эффективность каллусообразования, %	Размер каллусов, шт		
					мелкие	средние	крупные
Прамень× Оршанский	2-3	92	92	100	7	56	29
	4-6	35	35	100	4	16	15
	7-10	45	45	100	5	15	25
Прамень× М-12	2-3	85	4	4,71	4	0	0
	4-6	58	58	100	8	27	23
	7-10	53	53	100	1	22	24
Прамень× К-65	2-3	66	66	100	5	40	21
	4-6	52	49	94,23	3	27	19
	7-10	38	38	100	0	19	19
Gold Flax× Лирина	2-3	77	77	100	2	49	26
	4-6	44	44	100	0	24	20
	7-10	25	25	100	0	14	11
Gold Flax × Ручеек	2-3	94	22	23,4	4	12	6
	4-6	62	62	100	7	35	20
	7-10	52	52	100	0	29	13

В результате проведенного исследования выявлена зависимость между величиной экспланта и эффективностью регенерации. Частота регенерации возрастала с увеличением размера гипокотильного сегмента у всех изученных гибридных комбинаций, т.е. больше всего регенерантов формировалось на эксплантах длиной 7-10 мм (рис.).

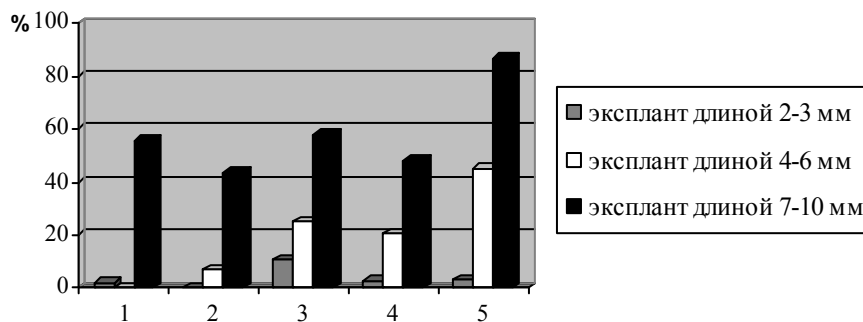


Рисунок. Эффективность регенерации у межсортовых гибридов льна из гипокотильных сегментов в зависимости от величины экспланта (%): 1- Прамень×Оршанский, 2- Прамень×М-12, 3- Прамень× К-65, 4- Gold Flax×Лирина, 5- Gold Flax × Ручеек

Наибольшая эффективность регенерации на сегментах гипокотилия этого размера отмечена для комбинации Gold Flax×Ручеек (86,54%). У остальных гибридов способность к регенерации на данных эксплантах была несколько ниже (рис.). Сегменты длиной 2-3 мм продуцировали меньше всего регенерантов. Исключение составила только комбинация Прамень×Оршанский, у которой частота регенерации была наименьшей в варианте с 4-6 мм эксплантами (рис.).

Выводы

Результаты данного исследования показали, что процессы каллусогенеза и регенерации у растений льна зависят от генотипа исходного материала. Установлена зависимость регенерационной способности побегов из гипокотильных сегментов от

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

Литература

1. Pretova A., Obert B., Bartosova Z. Haploid formation in maize, barley, flax, and potato // *Protoplasma*.- 2006.- Vol. 228, № 1.- P. 107-114.
2. Поляков А. В. Биотехнология в селекции льна. – Тверь.- 2000.- 180 с.
3. Larkin P., Scowcroft W.R. Somaclonal variation – a novel source of variability from cell culture for plant improvement // *Theor. Appl. Genet.*- 1981.- V. 60, №4.- P. 197-214.
4. Nichterlein K., Friedt W. Plaht regeneration from isolated microspores of linseed (*Linum usitatissimum* L.) // *Plant Cell Rep.*- 1993.- V.12, №3.- P. 426-430.
5. Steiss R., Schuster A., Freidt W. Development of linseed for industrial purposes via pedigree-selection and haploid technique // *Industrial Crops Products*- 1998.- V.7, №3.- P. 303-309.
6. Murashige T., Scoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant.*- 1962.- V. 15, №4.- P. 473-497.
7. Rutkowska-Krause I., Mankowska G., Lukaszewicz M., Szopa J. Regeneration of flax (*Linum usitatissimum* L.) plants from anther culture and somatic tissue with increased resistance to *Fusarium oxysporum* // *Plant Cell Rep.*- 2003.- V.22, №2.- P.110-116.
8. Орловская О.А., Сакович В.И., Лемеш В.А., Хотылева Л.В. Особенности каллусогенеза и органогенеза межсортовых гибридов льна F₁ (*Linum usitatissimum* L.) // Доклады НАН Беларуси.- 2008.- Т.52, №1.- С. 88-91.

Резюме

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

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

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

ОСТАПОВЕЦЬ Л.І.

Інститут розведення і генетики тварин УААН

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

e-mail: ost_lara@mail.univ.kiev.ua

ПАРТЕНОГЕНЕТИЧНЕ АКТИВУВАННЯ *IN VITRO* ЯЙЦЕКЛІТИН СВИНЕЙ

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

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

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

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

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

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

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

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

Матеріал і методи

Вилучення ооцит-кумулюсних комплексів (ОКК) із яєчників забитих на бойні свиней великої білої породи проводили шляхом розрізання фолікулів у середовищі 199 з 25 мМ Нерес, яке містило 10% сироватки крові корів. Відібрані ООК для дозрівання переносили в середовище 199 на розчині Ерла, яке містило 20% еструсної сироватки корів і співкультивували протягом 44- 46 годин у присутності клітин гранульози ($3-5 \times 10^6$ клітин/мл), при температурі $+38,8^{\circ}\text{C}$, 4% CO_2 у повітрі. Активування до партеногенетичного розвитку здійснювали 7%-ним розчином етилового спирту протягом 7 хвилин. Активовані гамети переносили в середовище для подальшого культивування при температурі $+38,8^{\circ}\text{C}$, 4% CO_2 у повітрі. За модифікованим нами методом Тарковського [11] готували сухоповітряні препарати гамет, забарвлювали 2%-ним розчином Гімза, проводили їх цитогенетичний аналіз під мікроскопом МБД-15.

Результати та обговорення

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

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

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

Висновки.

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

Література

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

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

Резюме

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

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

ПИРАЛОВ Г.Р., АБРАИМОВА О.Е.

Институт зернового хозяйства УААН,

Украина, 49600, Днепрпетровск, ул. Дзержинского, 14, e-mail: inst_zerna@mail.ru

КУЛЬТУРА ТКАНИ НЕКОТОРЫХ ГЕНОТИПОВ КУКУРУЗЫ ЗАРУБЕЖНОЙ СЕЛЕКЦИИ

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

"модельные", так и низкоотзывчивые. Для выявления таких генотипов мы сравнили особенности каллусогенеза и регенерации в культуре ткани пяти линий кукурузы зарубежной селекции Chi31, W64a, B73, W38 и A357. Линия Chi31 известна своим высоким морфогенетическим потенциалом [3] и использовалась в качестве стандарта. Наиболее контрастной ей по реакции в культуре ткани, судя по данным литературы, является линия B73 [4]. Данные о морфогенетическом потенциале генотипа W64a противоречивы [2], а линии W38 и A357 исследованы недостаточно.

Материалы и методы

Каллусы получали из незрелых зародышей (длина 1,0-2,0 мм, возраст – 15 дней). Растения доноры выращивали в весенне-летний период в поле. Подготовку и стерилизацию первичных эксплантов проводили по общепринятой методике [2]. Их высаживали на среды, содержащие макро- и микроэлементы сред MS и N6, дополненные L-пролином (690 мг/л), гидролизатом казеина (100 мг/л) и сахарозой (20 г/л). Концентрация 2,4-D – 1,0 мг/л, агара – 7 г/л. Культуру получали и выращивали в темноте при $t=25-27^{\circ}\text{C}$. Каждые 20-25 дней материал переносили на свежую среду. Для дифференциации и регенерации каллусы в возрасте 60-90 дней пересаживали на среды того же состава содержащие 0,1 мг/л ауксина, проростки длиной примерно в 1 см – на безгормональные среды. Растения в фазе 2-3 листочков с хорошо развитой и тщательно отмытой от агара корневой системой переносили в вегетационные сосуды и выращивали в стеклянных боксах при $t=22-27^{\circ}\text{C}$ и освещении лампами ДРИ 2000-6 с фотопериодом 16/8 (день/ночь) или же в естественных условиях. Данные обрабатывали по Плохинскому [1] (однофакторный дисперсионный анализ).

Результаты и обсуждение

В первые дни культивирования зародыши увеличивались в размерах и в течение 2-3 недель формировали каллусную ткань. Она различалась по текстуре, степени развитости поверхности, наличию признаков дифференциации, скорости роста и чаще, как видно из таблицы 1, образовывалась на среде MS. Наиболее активно каллусы образовывались генотипами Chi31 и A357 (более 90%), при этом все их новообразования оказывались рыхлыми. Частота индукции каллусов остальными генотипами была ниже и варьировала в интервале 38,0-89,5%%, к тому же часть новообразований этих линий была компактной.

Частота образования эмбриогенных каллусов варьировала в зависимости от генотипа и среды от 0 до 60,9%%, а наибольшие её показатели выявились у линии Chi31 и A357 (25,9-60,9%%). У линии W64a они составили всего 1,8-6,0%%. Определенный интерес представляет реакция линии B73. Частота образования её каллусов была относительно высокой, составив 62,1-89,5%%, но они отличались крайне медленным ростом и очень мелкими размерами. Частота встречаемости среди них эмбриогенных новообразований не превышала 1,2%.

Компактную каллусную ткань поддерживали в культуре 3-4 месяца, рыхлую – более полугода. Наиболее активным ростом характеризовалась рыхлая эмбриогенная каллусная ткань линии Chi31.

Таблица 1

Частота образования каллусной ткани и её морфологические особенности.

Генотип	Среда	Высажено зародышей шт.	Получено каллусов, %					
			всего	эмбриогенных	из них			
					компактных		рыхлых	
					всего	эмбриогенных	всего	эмбриогенных
Chi31	MS	174	98,8	60,9a*	0	0	98,3	60,9a
	N6	131	98,5	25,9b	0	0	98,5	25,9b
A357	MS	105	91,4a	53,3	0	0	91,4a	53,3
	N6	101	100b	42,6	0	0	100b	42,6

W38	MS	127	55,9a	12,6	0a	0a	55,9a	12,6a
	N6	166	38,0b	9,0	38,0b	9,0b	0b	0b
W64a	MS	218	72,9a	1,8a	67,4a	1,4a	5,5	0,5
	N6	249	44,6b	6,0b	39,8b	6,0b	4,8	0
B73	MS	48	89,5a	0	0a	0a	89,6a	0
	N6	161	62,1b	2	39,7b	1,2b	22,4b	0
Всего	MS	672	80,4a	27,1a	21,9a	0,4a	58,5a	26,6a
	N6	808	62,4b	13,5b	28,0b	4,0b	34,4b	9,5b

* разными латинскими буквами обозначены достоверно различающиеся варианты опыта при попарном сравнении ($P=0,05$)

Процесс дифференциации и регенерации морфогенных каллусов носил спонтанный характер и уже в первые 15-20 дней культивирования зародышей на среде с исходным содержанием 2,4-D на каллусах обнаруживались крупные и мелкие глобулы, соматические эмбриониды, мелкие листовидные структуры и т.д. Частота регенерации при снижении в среде концентрации ауксина и выживаемость растений после их пересадки в почву представлены в таблице 2.

Таблица 2

Частота регенерации и жизнеспособность регенерантов R_0

Генотип	Среда	Число изученных каллусов, шт.	Число растений на каллус, шт.	Число регенерантов, шт.	
				высаженных в почву	завершивших вегетацию
Chi31	MS	63	2,6	164	54
	N6	17	0,7	12	3
W38	MS	14	0,2	3	2
	N6	25	1,0	24	13
W64a	MS	8	2,2	18	8
	N6	10	0,9	9	6
A357	MS	74	0,3	23	4
	N6	10	0,4	4	1
B73	N6	2	0	0	0

Как видно из этой таблицы, более активно регенерировали каллусы линий Chi31 и W64a, полученные на среде MS более 2 растений на каллус. При высокой частоте образования эмбриогенных каллусов линия A357 отличалась низкой частотой регенерации и плохой выживаемостью растений. Достоверные различия в частоте регенерации выявились только между линией Chi31 (среда MS) с одной стороны, и линиями W38 и A357 (среды MS и N6) с другой.

В целом, из 257 регенерантов всех линий завершило вегетацию 91 растение. Последние существенно отличались от исходных форм особенностями развития вегетативной и генеративной сферы. Наиболее мощными, жизнеспособными, хорошо развитыми, с меньшим числом отклонений от нормы являлись регенеранты линий W38 и W64a. Большинство из них имело сравнительно более толстый стебель и широкие темно-зеленые листья. В отличие от них, регенеранты линий Chi31 и A357 чаще имели тонкий невысокий стебель и узкие, короткие светло-зеленые листья.

Серьезным препятствием в получении потомства регенерантов являлось отсутствие початка или большой разрыв во времени цветения между метелкой и початком. Эта проблема частично снималась тем, что у ряда растений формировались обоопольные верхушечные соцветия, при изоляции которых в цветках завязывались семена. Как видно из таблицы 3, самоопылиться удалось 24 растения. Часть остальных регенерантов опыляли пылью сестринских растений. Все опыленные растения завязали семена.

Некоторые биологические особенности регенерантов R₀

Генотип	Число растений, шт.					Число початков на растении, шт.	Высота растений, см
	изученных	с метёлкой и початком	без початка	с обоюполюым верхушечным соцветием	само-опылённых		
Chi31	57	40	17	6	6	0-1	7-80
W38	14	13	1	2	3	1-3	20-70
W64a	14	13	1	5	9	0-2	20-60
A357	5	5	0	5	6	1-2	30-50

Выводы

Подводя краткий итог выполненной работе, и оценивая морфогенетический потенциал генотипа совокупностью показателей частоты образования тотипотентной каллусной ткани, темпами её прироста, размножаемостью и частотой регенерации, отметим, что у изученных линий он оказался ниже, чем у Chi31. Несмотря на высокую частоту образования эмбриогенных каллусов незрелыми зародышами линии A357, эти каллусы отличались низкой частотой регенерации, а наиболее низкий морфогенетический потенциал выявился у линии B73. Тем не менее, эти линии должны представлять определенный интерес в дальнейших исследованиях особенностей физиологической, и в частности, гормональной регуляции процессов протекающих в культуре *in vitro*.

Литература

1. *Плохинский А.* Биометрия // М.: Изд-во МГУ. – 1970. – С. 198.
2. *Чеченева Т.Н., Моргун В.В., Рубан Т.А.* Регенерация растений из различных типов каллусных тканей инбредных линий и гибридов кукурузы // ДАН УССР. Геол., хим. и биол. науки. 1988.– Сер.Б.– № 1.– С. 80-84.
3. *Novak F.J., Dolezelova M., Nesticky M., Piovarci A.* Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Zea mays* L. // *Maydica*.– 1983.– XXVIII, № 4.– P.381-390.
4. *Tomes D.T., Smith O.S.* The effect of parental genotype on initiation of embryogenic callus from elite maize (*Zea mays* L.) germplasm // *Theor. and Appl. Genet.*– 1985.– 70, № 5.– P.505-509.

Резюме

В статье приводятся результаты изучения морфогенетического потенциала 5 линий кукурузы зарубежной селекции. Найдено, что на фоне контрольного генотипа китайской селекции Chi31 линии W64a, W38, A357 характеризуются более низким морфогенетическим потенциалом. Самые низкие его показатели выявились у линии B73. Получена и описана большая группа регенерантов R₀.

В статті наведені результати вивчення морфогенетичного потенціалу 5 ліній кукурудзи зарубіжної селекції. Знайдено, що на фоні контрольного генотипу китайської селекції Chi31 лінії W64a, W38, A357 характеризуються більш низьким морфогенетичним потенціалом. Самим низькочутливим генотипом в експерименті виявилася лінія B73. Одержана та описана велика група регенерантів R₀.

In the article the results of morphogenetic potential research of 5 maize inbreds of foreign selection is described. It was established, that on the comparison with inbred Chi 31 as control, inbreds W64a, W38 and A357 have lower morphogenetic potential. The least responsive genotype in experiment was inbred B73. The large group of regenerates R₀ was obtained and described.

БИОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СЕЯНЦЕВ ДУБА ЧЕРЕШЧАТОГО, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ДЛЯ РАЗМНОЖЕНИЯ IN VITRO

Значительная часть дубовых насаждений юго-востока Украины представлена лесами порослевого происхождения (2-3-е поколения), что вызывает снижение деловых качеств древесины, увеличивает восприимчивость деревьев дуба к разнообразному воздействию биогенных и абиогенных факторов, на 30-40 лет раньше начинается усыхание деревьев, снижается их водоохранное и экологическое значение.

Учитывая большое экономическое и экологическое значение насаждений дуба, вопросам размножения лучших генотипов придается большое значение. Одним из широко распространенных является способ размножения древесных *in vitro*. Однако эта техника, часто используемая в плодководстве, оказалась трудно применимой к разным видам дуба, вследствие очень низкой морфогенетической активности эксплантов от взрослых деревьев (5).

Относительно просто могут быть микроклонированы 2-8-месячные сеянцы дуба, в связи с чем во многих странах для отработки методики микроклонирования используется ювенильный материал. Многолетнее изучение 3-8-месячных сеянцев дуба по признаку устойчивости и восприимчивости к такому широко распространенному заболеванию, как мучнистая роса (4), позволило нам выявить некоторые биохимические маркерные признаки (вещества вторичного обмена, фенольные соединения - ФС), которые позволяют еще до начала распространения инфекции дифференцировать сеянцы по их потенциальной устойчивости к вредителю. Далее микроклонально можно размножать сеянцы не просто в соответствии с их ростовой активностью, а с определенными показателями вторичного биохимического признака. В настоящее время известно, что вещества вторичного обмена связаны с ростовой активностью растений и могут влиять на синтез веществ первичного метаболизма (6). Учитывая эти данные, а также то, что в листьях дуба черешчатого синтезируется заметное количество ФС, в том числе такие функционально активные для растительной клетки соединения как кверцетин и его гликозиды (2), анализ сеянцев дополнили определением содержания некоторых веществ первичного обмена – белка и хлорофилла. Целью работы была оценка сеянцев по комплексу признаков, затрагивающих особенности первичных и вторичных метаболитов.

Материалы и методы

Материалом для анализа служили листья 3.5-месячных сеянцев, выращенных из желудей панмиктической популяции дуба черешчатого. Листья фиксировали в кипящем этаноле, высушивали до воздушно-сухого состояния.

Определение фенольных соединений.

20 мг сухих листьев гомогенизировали с 4 мл 70%-ного этанола, центрифугировали при 3000 об. в теч. 20 мин.. Надосадочную жидкость использовали для определения содержания фенолпропаноидной группы веществ – флавонолов в гликозилированной форме и свободных агликонов.

Определение флавонолов. Содержание этой группы проводили по реакции с ALCL3, калибровочная кривая построена по кверцетину (Chemapol), 425 нм, КФК-3 (7).

Содержание свободного кверцетина определяли после разбавления этанольного экстракта дист.водой до концентрации 20% этанола и перевода свободного кверцетина в хлороформно-спиртовую фазу после обработки раствора хлороформом, 374 нм, КФК-3.

Определение белка выполняли по методу (1). Количество хлорофилла определяли по методу (3). Микроклональное размножение сеянцев дуба выполнялось согласно ранее опубликованной методике (4).

Результаты и обсуждение

Листья взрослых деревьев дуба черешчатого накапливают значительное количество ФС, из которых около 3-5% составляют вещества структуры гидролизуемых танинов (ди- и пента-галлоилглюкоза), от 0.3 до 1% составляют вещества структуры флавонолов и 1-3% могут составлять вещества структуры флаван-3-ол и флаван-3,4-ди-ол (катехины и проантоцианидины). Последние три группы веществ относятся к фенилпропаноидам, из которых наиболее изученной является группа флавонолов в агликоновой и гликозилированной форме. В листьях дуба из этой группы веществ присутствует гликозид кверцетин-3-рамнозид (кверцитрин) и свободный кверцетин, а также в незначительном количестве производные кемпферола и мирицетина (8).

Так как свободный кверцетин является токсичным для самой растительной клетки, он достаточно быстро с помощью фермента гликозил-трансфераза превращается в нетоксичную гликозилированную форму. В связи с этим количество свободного кверцетина обычно незначительно и зависит от скорости работы этого фермента. В нашем случае при необходимости анализировать достаточно большую выборку особей, показатель относительной активности фермента заменили показателем степени гликозилирования флавонолов путем расчета пропорционального соотношения количества гликозилированной формы флавонолов (преимущественно кверцитрин) и свободной (кверцетин). Можно отметить также, что другие группы фенилпропаноидной структуры (катехины и проантоцианидины) начинают синтезироваться, начиная с 5-месячного возраста, поэтому в ранние сроки развития в сеянцах отмечается присутствие преимущественно группы флавонолов.

Таблица.

Характеристика 3.5-месячных сеянцев дуба черешчатого по ряду признаков первичного и вторичного обмена (% сухой массы листьев).

Биохимические группы в параметрах нормального распределения признака	Показатели степени гликозилирования комплекса флавонолов	Содержание белка $X \pm m$	Содержание хлорофилла $X \pm m$	Высота сеянцев, см $X \pm m$
1-я группа <(x-1σ)	< 4	11.4 ± 0.58	7.8 ± 0.13	22.3 ± 0.4
2-я группа (x - 1σ)	4.1 – 9.0	12.2 ± 0.3	8.0 ± 0.8	19.7 ± 2.0
3-я группа (x + 1σ)	9.1 – 13.9	12.7 ± 0.24	9.8 ± 0.5	20.0 ± 2.05
4-я группа >(x+1σ)	> 14.0	13.1 ± 0.82	9.6 ± 0.8	19.0 ± 2.9

Различия показателя степени гликозилирования флавонолов указывают на разную скорость превращения свободного кверцетина в гликозилированную форму. Исходя из вариационного распределения, 2-я и 3-я группы ($x \pm 1\sigma$) соответствуют норме реакции признака, то есть отражают наиболее адаптивный диапазон изменчивости. Сеянцы 1-й и 4-й групп выходят за пределы оптимального диапазона значений признака.

Согласно литературным данным, первичным местом синтеза флавонолов и, соответственно, кверцетина, являются хлоропласты, причем кверцетин (и некоторые

другие свободные агликоны) является эффективным природным ингибитором окислительного и фотосинтетического фосфорилирования (3). В свете этих данных наиболее низкий уровень содержания хлорофилла и белка в 1-й биохимической группе совпадает с наблюдаемой низкой степенью гликозилирования флавонолов и соответственно повышенной концентрацией свободного кверцетина. В 3-й и 4-й группах существенно возрастает содержание хлорофилла и белка. В этих группах при высокой степени гликозилирования, видимо, значительно снижается уровень свободного кверцетина, что отражается на заметно более высоком содержании, как хлорофилла, так и белка. Промежуточное положение занимает 2-я биохимическая группа, однако, благодаря более низкой степени гликозилирования флавонолов, эта группа потенциально проявляет более высокую устойчивость к мучнистой росе (4).

Четкой связи с высотой сеянцев не выявляется, что подтверждает ненадежность ориентации в оценке ювенильного материала для микроклонирования только на их ростовую активность.

При микроклональном размножении разных биохимических групп оказывается, что в условиях *in vitro* они проявляют разную ростовую активность, причем заметно отстают в скорости вытягивания побегов и разворачивания листы экспланты 1-й биохимической группы, наиболее активными в этом плане оказываются экспланты 2-й и 3-й биохимических групп, несколько уступает по этому показателю 4-я группа. Однако 3-я и 4-я группы отличаются образованием большего числа листьев на побег и более развернутой листовой пластиной. Подобная тенденция наблюдалась ранее (4), а также при микроклонировании сеянцев проанализированной выше группы (рис.).

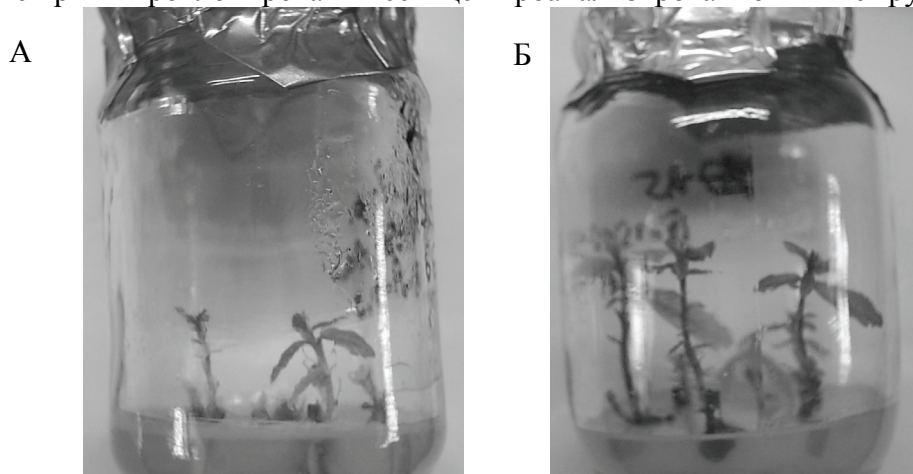


Рис. 1-мес. экспланты сеянцев дуба черешчатого
А- 1-я биохимическая группа, Б – 3-я биохимическая группа

Дифференциация сеянцев дуба по биохимическим группам позволяет вычлнить особи с признаками, указывающими на их возможное потенциальное развитие в будущем. Если 2-я биохимическая группа является потенциально более устойчивой к патогену мучнистой росы (4), то 3-я группа может составить основу для наиболее конкурентно-активных и продуктивных растений за счет наблюдаемого повышенного в листьях уровня таких важных первичных метаболитов, как содержание белка и хлорофилла.

Выводы

1. При анализе листьев сеянцев дуба черешчатого по признаку вторичного обмена - степени гликозилирования флавонолов - обнаруживается связь с такими показателями первичного обмена, как содержание хлорофилла и общее содержание белка.

2. В соответствии со статистическими параметрами нормального распределения признака (степень гликозилирования флавонолов) возможно дифференцировать

ювенильный материал по комплексу биохимических показателей до начала микрорепродуцирования, что позволяет ориентироваться не только на ростовую активность, отмечаемую визуально.

Литература

1. Бузун Г.А., Джемухадзе К.М., Милешко Л.Ф. Определение белка в растения с помощью амидо-черного // Физиол. раст.-1982.-Т.29.-В.-С.198-204.

2. Жесткова И.М., Молотковский Ю.Г. Регулирование фотосинтеза в интактных хлоропластах шпината и клетках эвглены кверцетином и бикарбонатом // Физиол. раст.- 1984.-Т.31.-В.2.-С.266-272.

3. Карначук Р.А., Венгеровская Е.И., Постовалова В.М., Ревина Т.А. Об активности фотосинтетического аппарата некоторых видов *Sedum L.*, адаптированных к свету разного качества // Физиол. раст.- 1981.-Т.28.-В.1.-С.66-72.

4. Полякова Л.В. Особливості мікрорепродуцирования сіяньців дуба звичайного (*Quercus robur L.*) *in vitro* залежно від показників вторинного обміну // Лісівництво і агролісомеліорація.-2006.-В.109.-С.236-243.

5. Ewald D., Naujoks G. Large scale testing of tissue culture of several adult larch clones and of factors influencing the growth behavior of adult oak clones and after transfer to soil // Cost Action 822.-2000.- P.333-336.

6. Haukioja E., Ossypov V., Koricheva J., Hankanen T., Larsson S., Lempa K. Biosynthetic origin of carbon-based secondary compounds: cause of variable responses of woody plants to fertilization? // J.Chemoecology.-1998.-N3.-P.133-139.

7. Julkunen-Tiitto R. Phenolic constituents in leaves of northern willows: methods for the analysis of certain phenolics // J.Agric.Food Chem.-1985.-V.33.-P.213-217.

8. Parker J. Phenolics in black oak bark and leaves // J.Chem.Ecol.-1977.-V.33.-N5.- P.871-880.

Резюме

Листья сеянцев дуба черешчатого анализировали на содержание некоторых групп веществ первичного и вторичного обмена. Из вторичных биохимических признаков определяли степень гликозилирования флавонолов. Определенное сочетание этого признака с уровнем содержания хлорофилла и белка позволяет оценить и дифференцировать сеянцы в плане их потенциальной продуктивности и устойчивости к мучнистой росе.

Листя сіяньців дуба звичайного аналізували на вміст деяких сполук первинного та вторинного обміну. Певне відношення такого показника, як ступінь гликозилування флавонолів, до вмісту хлорофілу і білка дозволяє оцінити і диференціювати сіяньці у плані їх потенційної продуктивності та стійкості до борошнистої роси.

Biochemical characters of oak seedlings for purpose of micropropagation *in vitro*. Some traits of first and second metabolites were analysed in oak (*Quercus robur L.*) seedlings leaves. Defined meaning of flavonol glucosylation grade and level of chlorophyll and protein is possible to use for estimation of potential properties of productivity and resistance to mildew (*Microspheera alphitoides*).

СОРОКА А.И.

Институт масличных культур УААН

Украина, 70417, г. Запорожье, ул. Весенняя 1, e-mail: oilseed@mail.zp.ua

ВЛИЯНИЕ ВОЗРАСТА ЗАРОДЫШЕЙ ПОДСОЛНЕЧНИКА ПРИ ИХ КУЛЬТИВИРОВАНИИ *IN VITRO* НА ЧАСТОТУ И НЕКОТОРЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ НИХ РАСТЕНИЙ

Подсолнечник как основная масличная культура Украины требует к себе

повышенного внимания, что обуславливает привлечение в селекционный процесс методов и приемов, облегчающих и ускоряющих создание его новых форм. Из целого ряда перспективных методов одним из наиболее доступных биотехнологических подходов является метод культуры незрелых зародышей. Этот биотехнологический прием на подсолнечнике используется в разных аспектах, например, для получения отдаленных гибридов, введения в культурные сорта желаемых признаков, а также для ускорения создания новых форм данной культуры [1-5].

Как показано для многих культур, возраст незрелых зародышей имеет существенное значение для сохранения их высокой жизнеспособности и получения из зародышей полноценных растений. Слишком молодые зародыши требуют питательной среды значительно более сложного состава, их сложно выделять из соцветий, они отстают в росте, характеризуются рядом морфологических изменений, легко образуют каллус, что зачастую нежелательно. Зародыши, взятые на очень поздних стадиях развития, труднее вводить в культуру, поскольку они сильнее повреждаются болезнями и вредителями в полевых условиях. В связи с вышеизложенным целью нашей работы было изучить влияние возраста незрелых зародышей подсолнечника на выход жизнеспособных растений, а также исследовать влияние эмбриокультуры на некоторые характеристики полученных растений.

Материалы и методы

В качестве материала для исследований использовали зародыши культурного подсолнечника *Helianthus annuus* L. трех гибридов, двух линий и сорта Прометей, предоставленных лабораторией селекции межлинейных гибридов подсолнечника Института масличных культур УААН (ИМК). После зацветания растений в полевых условиях их самоопыляли, а затем через 14 или 21 день (у гибридов 1812 x 1811, 1813 x 1811, 1814 x 1811) или 1-2 недели (у сорта) из корзинок выделяли незрелые зародыши и высаживали асептически на искусственную питательную среду. Питательная среда представляла собой модифицированную среду МС (Murashige, Skoog, 1962) со сниженным вдвое содержанием минеральных веществ и повышенным содержанием витаминов. Чашки с высаженным материалом культивировали в темноте 1 сутки, а затем при 16-часовом фотопериоде при температуре 20-25°C. После прорастания зародышей сформированные растения пересаживали в почву и анализировали количество прижившихся растений.

Для изучения влияния возраста зародышей при их доращивании *in vitro* на признаки полученных из них растений использовали выделенные через 8-10 дней (приблизительно 1 неделя) и 14-15 дней (около 2 недель) зародыши двух линий - ЗЛ-809 и ЗЛ-95, которые доращивали на той же питательной среде, что и в предыдущем случае. Полученные проростки высаживали в почву. После 2-х недельной акклиматизации их пересаживали в открытый грунт на опытном участке ИМК, где они и находились до созревания. Анализировали высоту растения, сроки зацветания и длительность вегетационного периода.

Результаты и обсуждение

Незрелые зародыши гибридов подсолнечника начинали рост на искусственной питательной среде через несколько дней культивирования *in vitro*. Так, зародыши гибридов с участием отцовской линии 1811 прорастали через 5-7 дней. Однако это происходило только у образцов, зародыши которых формировались в условиях *in vivo* 21 день. Лишь у образца 1814 x 1811 не отмечено развитие за этот период. Зародыши, выделенные через 14 дней после самоопыления, в течение этого периода еще не успевали образовать ни корней, ни побегов. Эти структуры появлялись лишь через 10-14 дней с частотой 15,8-25,0% в зависимости от генотипа. Через 14 дней культивирования незрелые зародыши возрастом 21 день формировали корни и побеги с частотой до 85,7%. После высадки полученных растений в сосуды с почвой их приживаемость (в целом по вариантам) составила около 58% для 14-дневных

зародышей и около 80% - для 21-дневных. В целом же можно констатировать, что нормальные растения подсолнечника возможно получать как из зародышей двух-, так и трехнедельного возраста.

Безусловно, возраст зародышей существенно влияет на эффективность получения из них растений, причем не только у гибридов, но и у сортового материала. Чем моложе зародыши, тем сложнее подобрать для них условия дальнейшего развития. Как видно на рисунке, из зародышей сорта Прометей 14-дневного возраста было получено 60,6% растений, а из 7-дневного - лишь 3,1%. Кроме того, ткани молодых зародышей значительно чаще дедифференцируются и образуют каллус. Это в конечном результате также снижает долю полученных из зародышей нормальных растений. Так, для сорта Прометей частота формирования каллуса у 7-дневных зародышей была более чем в два раза выше чем у 14-дневных (Рис.). У отдельных генотипов количество зародышей, которые образуют каллус, может достигать значительной величины и доходить до 70%.

Высокая частота каллусообразования, в свою очередь, негативно сказывалась на доли полученных из незрелых зародышей растений. Нормальные растения образовывались преимущественно из зародышей старшего возраста. И хотя из молодых растений также было получено определенное количество взрослых растений, однако их частота была низкой и для сорта Прометей не превышала в наших опытах 5%.

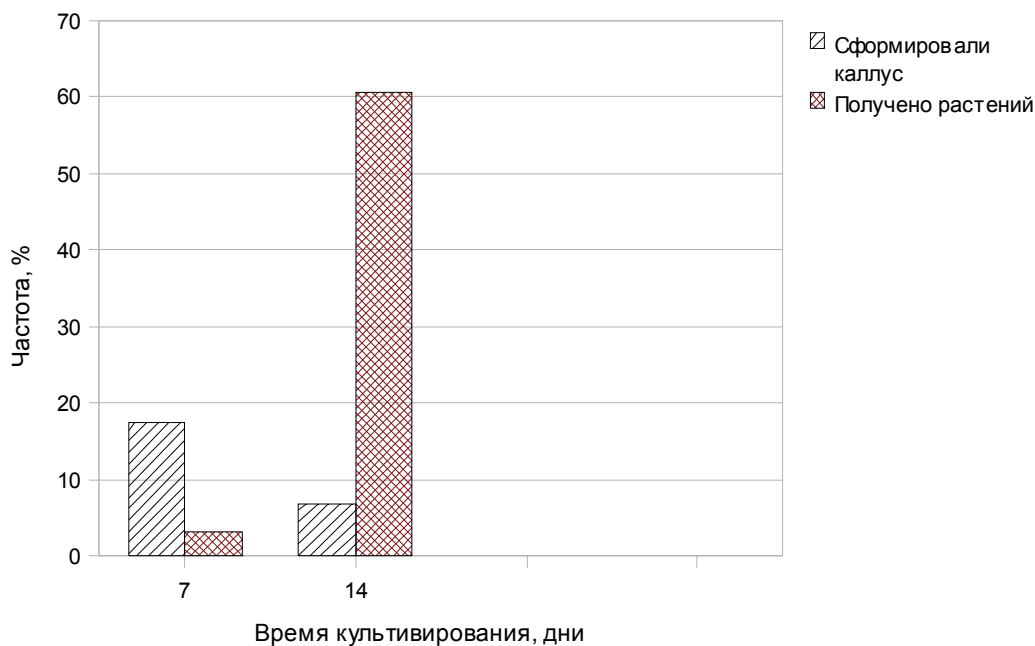


Рис. Эффективность культивирования зародышей разного возраста у сорта подсолнечника Прометей

При использовании метода эмбриокультуры важно знать характеристики растений, полученных из зародышей соответствующего возраста. В связи с этим мы изучали каким образом возраст зародышей подсолнечника влияет на отдельные характеристики продуктивности и состояние экспериментальных растений.

Как было установлено, возраст зародышей подсолнечника существенно повлиял на некоторые количественные характеристики полученных из них растений. Для обеих изученных линий характерным было то, что более молодые зародыши формировали и более низкие растения (Табл.). Вероятно, срок 8-9 дней *in vivo* недостаточен для того, чтобы генетическая программа, отвечающая за развитие вегетативных органов, в частности, признаков, обеспечивающих нормальную высоту изученных линий подсолнечника, полностью включилась в работу. Однако, сроки зацветания растений, полученных из зародышей разного возраста, практически не различались. Это говорит о

том, что сокращение времени развития вегетативной сферы растений приводило к удлинению периода развития генеративных органов (возможно, из-за недостаточного накопления необходимых ассимилятов на предыдущих фазах развития). Задержки в развитии вегетативной сферы при культивировании более молодых зародышей приводили и к удлинению вегетационного периода в целом. Правда, здесь сказались некоторые генотипические различия между линиями. Так, растения линии ЗЛ-809, в отличие от ЗЛ-95, имели одинаковую длину вегетационного периода, независимо от возраста использовавшихся зародышей.

Таблица

Влияние возраста зародышей на некоторые количественные характеристики полученных из них растений у двух линий подсолнечника

Признак	Линия ЗЛ-95		Линия ЗЛ-809	
	8-9 дн.	14-15 дн.	8-9 дн.	14-15 дн.
Высота, см	69,8±4,85	86,2±2,59**	44,3±1,68	55,8±2,58***
Сроки зацветания, дн.	76,5±1,32	75,7±0,84	67,7±0,96	66,4±0,53
Вегетационный период, дн.	127,5±1,74	118,9±1,73***	114,1±0,98	114,8±1,16

Прим. **, *** - различия между зародышами разного возраста существенны при $P < 0,01$ и $0,001$ соответственно.

Сравнивая высоту растений, полученных через культуру зародышей, с высотой растений тех же образцов, выращенных в полевых условиях, было установлено, что степень ингибирования признака «высота растений» при культивировании зародышей на искусственной питательной среде зависела от генотипа. Оказалось, что у линии ЗЛ-809 ингибирование было более сильным, чем у линии ЗЛ-95. Так, степень снижения высоты растений линии ЗЛ-809 для однонедельных зародышей составила 2,1 раза, а для линии ЗЛ-95 - 1,3 раза. Также различались между собой по высоте и растения, полученные из одно- и двухнедельных зародышей (Табл.). Растения, полученные из более развитых зародышей, были выше. Для линии ЗЛ-809 эта разница составила 11,5%, а для линии ЗЛ-95 – 16,4%.

Выводы

Зародыши подсолнечника как одно-, так двух- и трехнедельного возраста формируют в условиях *in vitro* растения, однако частота выхода растений выше при культивировании более зрелых зародышей.

Возраст зародышей влияет на такие признаки как высота растений и длина вегетационного периода. С уменьшением возраста зародышей высота растений уменьшается, а вегетационный период удлиняется.

Отмечены некоторые генотипические различия между образцами при культивировании зародышей разного возраста по признакам длина вегетационного периода и высота растений.

Литература

1. Пушкаренко А.Я. Культура *in vitro* незрелых гибридных зародышей подсолнечника // Сборник научных трудов ОСГИ / Одесса, 1992. - С. 31-38.
2. Bohorova N. In vitro plant development of seeds of *Helianthus* interspecific hybrids // CR Acad. Sci. Bulg., 1982. - V.35. - N1. - P.105-107.
3. Christov M., Shindrova P., Encheva V., et al. Development of fertility restorer lines originating from interspecific hybrids of genus *Helianthus* // *Helia*. - 1996. - 19, № 24. - С. 65-72.
4. Faure N., Serieys H., Cazaux E., Kaan F., Berville A. Partial Hybridization in Wide Crosses between Cultivated Sunflower and the Perennial *Helianthus* Species *H. mollis* and *H. orgyalis* // *Annals of Botany*. - 2002. - 89, № 1. - С. 31-39.
5. Krauter R., Steinmetz A., Friedt W. Efficient interspecific hybridization in the genus *Helianthus* via "embryo rescue" and characterization of the hybrids // *Theor. Appl. Genet.*, 1991. - V.82. - P.521-525.

6. *Murashige T., Skoog F.* A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant.*, 1962. - V.15. - P.473-497.

Резюме

Изучали влияние возраста незрелых зародышей подсолнечника при их доращивании *in vitro* на частоту образования и некоторые признаки полученных из зародышей растений. Установлено, что зародыши всех возрастов формируют в условиях *in vitro* растения, однако возраст зародышей влияет на такие признаки как высота растений и длина вегетационного периода.

Вивчали вплив віку незрілих зародків соняшника при їхньому дорощуванні *in vitro* на частоту утворення й деякі ознаки отриманих із зародків рослин. Встановлено, що зародки кожного віку формують в умовах *in vitro* рослини, однак вік зародків впливає на такі ознаки як висота рослин і довжина вегетаційного періоду.

Influence of age of sunflower immature embryos after *in vitro* germination and growth on the frequency of adult plant production and some traits of the plants raised from the embryos was studied. It was found that embryos of any age can produce plants under *in vitro* conditions, however, the age of embryos was influencing such traits as plant height and vegetative period length.

ТРЕТЬЯКОВА И.Н., ИВАНИЦКАЯ А.С., БАРСУКОВА А.В., ИЖБОЛДИНА М.В., НОСКОВА Н.Е.

Институт леса им. В.Н. Сукачева СО РАН

Россия, 660036, Красноярск, Академгородок, e-mail: culture@ksc.krasn//ru

БИОТЕХНОЛОГИИ ХВОЙНЫХ IN VITRO: ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ

На основании свойства тотипотентности клеток в биотехнологии микрклонального размножения хвойных появились два новых направления – соматический и микроспориальный эмбриогенез. Андроклиния *in vitro* – феномен перехода спорогенных клеток с гаметофитного пути развития, на спорофитный путь в культуре *in vitro*, представляет собой одно из перспективных направлений для получения гаплоидных и дигаплоидных растений-регенерантов в современных биотехнологических исследованиях. Это явление активно изучается у различных представителей покрытосеменных растений [Круглова, Горбунова, 1997, 2001; Круглова, Куксо, 2006] то время как у голосеменных растений подобные исследования редки и только начинаются [Иванова и др. 2006]. Соматический эмбриогенез - это асексуальный способ размножения, был открыт 20 лет назад у *Picea abies* [Hagman et al]. Полученные эмбриогенные клеточные линии сохраняют компетентность длительный период времени и позволяют получить генетически однородный селекционный материал улучшенных форм. Несмотря на активные исследования в области соматического эмбриогенеза у хвойных, регенерация растений данным способом все еще остается проблематичной для большинства видов. Критическим моментом является процесс созревания соматических зародышей, поскольку он влияет на жизнеспособность полученных *de novo* зародышей, и особенно на их способность прорасти и продуцировать нормальные растения-регенеранты.

Изучение соматического и микроспориального эмбриогенеза открывает большие перспективы в познании процесса клеточной дифференцировки и реализации морфогенетических программ в эмбриогенезе и раннем онтогенезе растительного

организма, а так же получении высокопродуктивных генетически однородных чистых линий. Применение эффективных инновационных технологий, таких как соматический эмбриогенез и андроклиния в сочетании с криоконсервацией и различными селекционными программами даст возможность для получения, раннего отбора и испытания ценных генотипов, их быстрого распространения.

Цель настоящих исследований заключалась в разработке биотехнологии получения соматических зародышей и андроклинных эмбриоидов у хвойных видов Сибири, проведении цитоэмбриологического анализа полученных структур и определении гормонального контроля морфогенных и андроклинных каллусов.

Материалы и методы

Объектом настоящих исследований являлись деревья лиственницы сибирской (*Larix sibirica* Ledeb.), произрастающие в естественных насаждениях на территории Республики Хакасия и Тыва, в искусственных насаждениях г. Красноярска. В работе использовали 32 генотипа лиственницы сибирской устойчивых и неустойчивых к поражению лиственничной почковой галлицей. Деревья сосны сибирской (кедра сибирского – *Pinus sibirica* Du Tour), произрастали в естественном древостое Западного Саяна (Ермаковский и Шушенский районы Красноярского края) и на клоновых прививочных плантациях Западно-Саянского Опытного лесного хозяйства. Для взятия образцов использовалось 13 деревьев-доноров из естественного древостоя и 20 клонов, опыленных пыльцой материнских деревьев из естественного древостоя и гетерозисного дерева с однолетним развитием женских шишек..

В качестве эксплантов использовались мегагаметофиты, незрелые зиготические зародыши, а также сегменты однолетних вегетативных побегов, микроспороциты у лиственницы сибирской и сосны сибирской

Для инициации эмбриональной массы из зиготических зародышей использовались базовые MS, ½ MS [Murashige ., Skoog 1962], ½ LV, MSG, DCR [Plant cell...1995] и K₉₉ [Deutch et.al.,2004] с добавлением мезоинозита, L-глутамина, фитогормонов: 2,4-Д и 6-БАП, сахарозы, а также агара или Gelrite. Для пролиферации эмбриональной массы концентрация 6-БАП, 2,4-Д и сахарозы снижалась в 2-4 раза (у разных видов по-разному). Эксперименты по индукции и пролиферации эмбриогенного каллуса проводились в темноте при температуре 24 ± 1°C. Для перехода соматических зародышей к созреванию экспланты культивировались на безгормональных базовых средах с активированным углем в течение 1 нед. Для созревания соматических зародышей в среды добавлялись мезоинозит, L-глутамин, 2,4-Д, АБК, сахароза, а также агар. Культивирование проводилось на свету, при 16-ти часовом фотопериоде и температуре 24 ± 1°C.

Для индукции каллуса из сегментов вегетативных побегов проводилась обработка эксплантов низкой температурой (+2-3°C в течении трех дней) на средах DCR [Malabadi, Van Staden 2005] и ½ MS, содержащих сахарозу, активированного угля и Gelrite без гормонов. Для индукции каллусообразования проводился перенос эксплантов на базовые среды с добавлением L-глутамина, гидролизата казеина, мезоинозита, сахарозы и Gelrite, а также 2,4-Д, 6-БАП и индолилуксусной кислоты (ИУК). Пролиферация каллусных культур проводилась на средах DCR и ½ MS, содержащих сахарозу, 2,4-Д и БАП, а также Gelrite (в темноте, при температуре 24±1°C).

Для индукции андроклинных культур у лиственницы сибирской экспланты вводились в культуру на протяжении зимы и ранней весны, и не подвергались дополнительной предобработке, в то время как индукция андроклинии в весенний период, когда температура воздуха поднималась выше нуля, требовала дополнительной стрессовой обработки эксплантов низкими положительными температурами (2-3°C) в течение 1-3 сут. Андроклинные культуры выращивались на твердых и жидких средах MS, ½ MS, WPM и K₉₉, различающиеся по составу макроэлементов, витаминов и

гормонов. В качестве желирующего компонента использовался агар, в концентрации 6 г/л.

Для проведения цитологического анализа использовались давленные препараты. Окраска эксплантов проводилась сафранином с добавлением капли метиленового синего. Просмотр микроскопических образцов осуществлялся на микроскопе МБИ-6. Статистическая обработка данных проводилась по стандартным методикам при помощи Microsoft Excel. Морфологические изменения фиксировались цифровой фотокамерой Fudjifilm FinePix S7000 (Япония).

Иммуноферментный анализ растительных образцов проводился в лаборатории физиологии растений Института биологии УНЦ РАН по методике, разработанной проф. Г.Р. Кудояровой с соавторами [Кудоярова и др., 1986; Кудоярова, 1990;]. Было определено содержание индолилуксусной кислоты (ИУК), абсцизовой кислоты (АБК) и цитокининов.

Результаты и обсуждение

Соматический эмбриогенез

Эксперименты по культивированию недоразвитых изолированных зародышей и вегетативных побегов у лиственницы сибирской и кедра сибирского на модифицированных средах MS, MSG, LV и DCR с различными концентрациями гормонов и в разном их соотношении друг с другом позволили манипулировать процессами морфогенеза клеток, образующими эмбриогенный каллус и соматические зародыши. Под действием гормонов 6-БАП и 2,4-Д соматические клетки зиготических зародышей на 5-10 сут. культивирования начинали интенсивно растягиваться (до 200-300 мкм в длину), и превращаться в эмбриональные трубки. Эмбриональные трубки подвергались неравному делению, в результате которого на одном из полюсов формировались эмбриональные клетки диаметром 39-47 мкм. В течение следующих 5-7 сут. клетки инициалей активно делились и образовывали эмбриональные глобулы, которые окружались эмбриональными трубками. Наблюдалось образование эмбрионально-суспензорной массы. (ЭСМ). Перенос эксплантов через 1 мес. на среды с пониженным содержанием цитокининов и сахарозы вызывал интенсивную пролиферацию ЭСМ, в которой шел активный кливаж. Через 1 мес. культивирования на этих средах возникали торпедообразные соматические зародыши. При субкультивировании ЭСМ на базовых средах, содержащих АБК, соматические зародыши приобретали биполярную структуру: на одном из полюсов формировались примордии семядолей, на другом – зародышевый корешок и хорошо развитый суспензор.

Формирование ЭСМ из сегментов вегетативных побегов у лиственницы сибирской начиналось на 8-12-е сут. культивирования, после переноса эксплантов с безгормональной среды, на которой они подвергались холодной обработке, на индукционную среду, содержащую 2,4-Д и 6-БАП. ЭСМ, полученная из сегментов вегетативных побегов, представляла собой отдельные клеточные скопления. Через 20 сут. культивирования в ЭСМ были обнаружены зародышеподобные структуры. Полученные эмбриониды обнаруживали строение, характерное для зиготических и соматических зародышей хвойных растений на стадии проэмбрио.

Определение эндогенных гормонов в эмбриогенном каллусе лиственницы сибирской и кедра сибирского показало, что в них происходило резкое возрастание уровня цитокининов (в 2 раза) по сравнению с исходными эксплантами. Содержание ИУК в морфогенном каллусе кедра осталось без изменения, но увеличивалось содержание АБК. В морфогенном каллусе лиственницы содержание ИУК снизилось до 9.5 нг/г и увеличилось содержание АБК. Вероятно, компетентность клеток к гормонам при образовании эмбриогенного каллуса у разных видов зависит от эндогенного содержания гормонов в эксплантах. Были выявлены генотипы донорских

растений лиственницы сибирской и сосны сибирской, способные давать чистые эмбриогенные линии и соматические зародыши.

Андроклинные культуры лиственницы сибирской

У взятых для микроклонирования микростробилов лиственницы сибирской в мейотической стадии развития в течение всего осеннее-зимнего и ранневесеннего периода происходило быстрое завершение мейоза в культуре *in vitro* (в течение нескольких дней) и наблюдалось переключение развития с гаметофитного на спорофитный путь.

При введении микростробилов в период микроспорогенеза (конец марта – начало апреля) на среду MS с 0,2-0,5 мг/л 2,4-Д, через 1-2 сут. культивирования наблюдался распад тетрад и происходило образование микроспор. В течение 7-10 сут. культивирования проходил митоз, и микроспоры делились на две равные клетки, т.е. становились на аномальный (спорофитный) путь развития. В течение 14-21 сут. формировался андроклинный каллус, в котором шли активные клеточные деления – происходило формирование эмбриоидов. При увеличении содержания 2,4-Д до 2-5 мг/л образование андроклинного каллуса у лиственницы не происходило. Наблюдалось формирование некротических очагов.

Иммуноферментный анализ микростробилов лиственницы сибирской, в которых проходит процесс микроспорогенеза, показал, что в них содержатся цитокинины, ауксины и абсцизовая кислота. Наибольшее количество в микростробилах лиственницы содержится цитокининов, количество которых было одинаковым как у деревьев пораженных лиственничной почковой галлицей, так и у здоровых деревьев (288 и 284 нг/г соответственно). Содержание ИУК в микростробилах значительно ниже (\approx в 10 раз). Однако содержание ауксинов в микростробилах пораженных галлицей деревьев оказалось выше, чем у непораженных. Особого внимания заслуживают данные по содержанию АБК, которые у пораженных и непораженных деревьев значительно различаются. Микростробилы пораженных деревьев содержат в 2 раза больше этого гормона (92 нг/г против 49,7 нг/г).

Вероятно, для успешного роста андроклинного каллуса и вызревания эмбриоидов культуры лиственницы сибирской не нуждаются в увеличении концентрации АБК и дополнении цитокининов. Ауксины требуются для роста андроклинных каллусов в небольших количествах

Таким образом, у представителей сибирских видов хвойных путем подбора состава питательных сред на тканевом и клеточном уровне были получены морфогенные каллусы различного генетического и онтогенетического происхождения, способные продуцировать эмбрионально-суспензорную массу, из которой формировались соматические зародыши. Образование морфогенных и андроклинных каллусов требует гормональной регуляции.

Выявлены генотипы донорских растений лиственницы сибирской и сосны сибирской, способные давать чистые эмбриогенные линии и соматические зародыши.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 06-04-08040-офи_а, гранта РФФИ-ККФН «Енисей» № 04-040-96810

Литература

1. *Иванова А.Н., Третьякова И.Н., Вязовецкова А.С.* Индукция андрогенных культур у лиственницы сибирской // Онтогенез. – 2006. – Т. 37. № 1. – С. 32-42.
2. *Круглова Н. Н., Горбунова В. Ю.* Каллусогенез как путь морфогенеза в культуре пыльников злаков // Успехи современной биологии. – 1997. – Вып. 1. Т. 117. – С. 83-94.
3. *Круглова, . Горбунова Н.Н.* Стресс как фактор индукции андроклинии у злаков. Стресс-реакция *in situ* морфогенных спорогенных клеток пыльника // Успехи современной биологии. – 2001. – Т. 121. - №4. – С. 378-387.

4. Круглова Н. Н., Куксо П. А. Стрессовая индукция андроклинии // Успехи современной биологии. – 2006. – Т. 126. № 3. – С. 256-272.
5. Кудоярова Г. Р. Иммуноферментный анализ регуляторов роста: применение в физиологии растений и экологии / Уфа: БНЦ УрО АН СССР, 1990. 132 с.
6. Кудоярова Г. Р., Веселов С. Ю., Еркеев М. И. Иммуноферментное определение содержания индолилуксусной кислоты в семенах кукурузы с использованием меченых антител // Физиология растений, 1986. Т. 33. № 6. С. 1221-1227.
7. Deutsch F., Kumlehn J., Zeigenhagen B., Fladung M. Stable haploid poplar callus lines from immature pollen culture / Physiologia plantarum. – 2004. – V. 120. – P. 613-622.
8. Hakman I., Fowke L. C., von Arnold S., Eriksson T. The development of somatic embryogenesis in tissue cultures initiated from immature embryos of *Picea abies* (Norway spruce). Plant Science. – 1985. – V. 38. – P. 53–59.
9. Malabadi R. B., Van Staden J. Somatic embryogenesis from vegetative shoot apices; of mature trees of *Pinus patula* // Tree Physiology. – 2005. – V. 25. – P. 11-16.
10. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. – 1962. – V. 15. – №4. – P. 473-497.
11. Plant cell, tissue and organ culture: fundamental methods / Eds. O.L. Gamborg, G.C. Phillips. – Berlin: Springer-Verlag, 1995. – 358 p.

Резюме

Инициация соматического эмбриогенеза у хвойных видов – лиственницы сибирской (*Larix sibirica* Ledeb.) и сосны сибирской (*Pinus sibirica* Du Tour) проводилась с использованием зиготических зародышей на разных стадиях их развития и сегментов вегетативных побегов, андроклинии из микроспор и недозрелых мужских гаметофитов. Культивирование велось на среде MS и ½ MS, ½ LV и MSG, DCR и K₉₉ с гормонами 2,4-Д, 6-БАП, ИМК и АБК в разных концентрациях. Образование морфогенного и андрогенного каллусов требует гормональной регуляции. Успешность соматического эмбриогенеза и андроклинии у хвойных видов связана с генотипом дерева и зависит от стадии развития эксплантов.

Induction of somatic embryogenesis in Siberian coniferous species - Siberian larch (*Larix sibirica* Ledeb.) and Siberian pine (*Pinus sibirica* Du Tour) has been conducted from zygotic embryos on different stages and segments of vegetative shoots, androgenesis in vitro from microspores and immature male gametophytes. Culturing was made on MS, ½ MS, ½ LV, MSG, DCR and K₉₉ nutrition media with hormones 2,4-D, 6-BAP, IBA and ABK in different concentrations. The formation of morphogenic and androgenic callus depend on hormonal regulation. Success of somatic embryogenesis procedure of Siberian coniferous species connected with tree genotype and depends on stage of explants development.

ТРУХАНОВЕЦ Н. Л., МОЗГОВА Г. В.

Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси
220072 Минск, ул. Академическая, 27, e-mail: N.Trukhanovets@igc.bas-net.by

УЛЬТРАСТРУКТУРА КЛЕТОК МЕЗОФИЛЛА ЛИСТА АЛЬБИНОСНЫХ И ЗЕЛЕННЫХ РАСТЕНИЙ, ПОЛУЧЕННЫХ В КУЛЬТУРЕ ПЫЛЬНИКОВ ПШЕНИЦЫ

В ходе естественного развития микроспоры растений проходят несколько этапов дифференцировки и превращаются в пыльцевые зерна. Однако при создании определенных условий в культуре клеток и тканей *in vitro* они могут развиваться по пути формирования гаплоидных зародышей. Такой андрогенетический путь развития называется также пыльцевым эмбриогенезом. Индукция пыльцевого эмбриогенеза

часто сопровождается формированием альбиносных растений с различной частотой, в зависимости от генотипа. Это явление довольно обычно для злаков и значительно снижает выход растений-регенерантов у многих хозяйственно-ценных культур [1]. Явление альбинизма, возникающее в культуре пыльников, исследовалось главным образом в плане поиска условий предобработки донорных растений и пыльников с целью снижения доли альбиносных регенерантов [2, 3]. Наиболее существенные нарушения, приводящие в культуре пыльников к формированию мутантного фенотипа должны касаться, прежде всего, процессов синтеза хлорофилла и изменения структуры пластид – основных органелл, связанных с явлением альбинизма, поскольку в их строении происходит синтез хлорофилла и связанный с фотосинтезом метаболизм [4].

Поэтому целью нашей работы было выполнить с использованием различных современных методов сравнительные комплексные исследования процессов, сопровождающих формирование зеленых и альбиносных растений-регенерантов в культуре пыльников пшеницы. Для достижения этой цели, в качестве экспериментальной модели были выбраны дигаплоидные линии пшеницы. Полностью гомозиготное состояние ядерных генов у таких растений позволяет сузить спектр изменчивости, обусловленный гетерозиготностью по генам, участвующим в контроле формирования морфогенетических процессов в культуре клеток и тканей и более четко выявить процессы, связанные с формированием альбиносных растений.

Материалы и методы.

Материалом для исследований служили двадцать три дигаплоидные линии мягкой пшеницы, полученные в лаборатории генетики морфогенеза ИГиЦ НАНБ методом культуры пыльников межсортовых гибридов первого поколения. Двенадцать из них – от скрещивания различных яровых сортов *T. aestivum*, две – от скрещивания ярового сорта Диамант и озимой линии Фло, семь – от скрещивания озимой линии Фло и сорта Диамант и две дигаплоидные линии с ядерным геномом сорта Мироновская 808 и цитоплазмой *T. Turgidum*.

Растения выращивали на экспериментальном поле БОС Института генетики и цитологии НАН Беларуси. Предобработку пыльников, их культивирование и регенерацию растений проводили в соответствии с ранее описанными методиками [5]. Оценивали следующие параметры: частота индукции эмбриогенеза (от числа посаженных пыльников); частота регенерации зеленых растений, частота регенерации альбиносных растений (от числа эмбрионидов); доля альбиносных растений.

Для электронно-микроскопических исследований отрезки листьев фиксировали в 6,5% глутаральдегиде с последующей дофиксацией в 2,0% осмиевой кислоте. Обезвоживали по общепринятой методике и заливали в аралдит. Ультратонкие срезы готовили на ультрамикротоме *LKB* и контрастировали цитратом свинца по Рейнольдсу. Срезы исследовали на электронном микроскопе *JEM 100CX*.

Результаты и обсуждение.

На первом этапе работы нами проводились эксперименты по индукции пыльцевого эмбриогенеза и регенерации растений в культуре пыльников двадцати трех дигаплоидных линий пшеницы. Выполненные исследования выявили широкую изменчивость дигаплоидных линий по признакам, характеризующим способность растений к индукции пыльцевого эмбриогенеза. Так, например, частота индукции эмбриогенеза варьировала от 0 до 79,21%. Для проведения цитологических исследований были отобраны четыре линии, полученные методом культуры пыльников межсортовых гибридов первого поколения от скрещивания различных яровых сортов *T. aestivum*. Данные линии отличались наиболее высокими совокупными показателями, характеризующими способность к эмбриогенезу и регенерации в культуре пыльников, и являлись контрастными между собой по данным признакам (табл. 1).

Таблица 1

Параметры, характеризующие процессы эмбриогенеза и регенерации в культуре пыльников дигаплоидных линий пшеницы, %

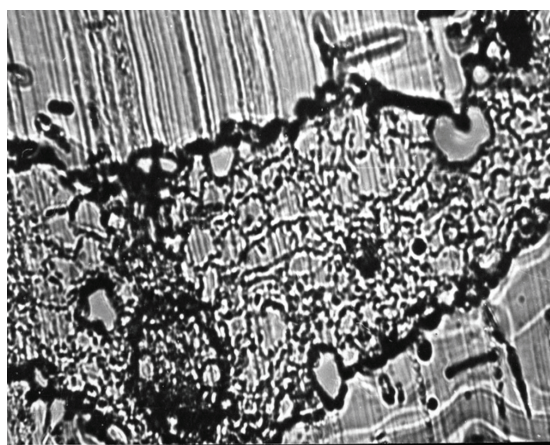
Дигаплоидная линия	Частота индукции эмбриогенеза	Частота регенерации зеленых растений	Частота регенерации альбиносных растений	Доля альбиносных растений
Dh 83 (<i>Ci</i> x <i>Di</i>)	79,21 ± 1,10 <i>a</i>	0,93 ± 0,29 <i>a</i>	1,11 ± 0,32 <i>a</i>	54,55 ± 10,62
Dh 64 (<i>Kt</i> x <i>Sk</i>)	15,90 ± 1,07 <i>b</i>	6,42 ± 1,79 <i>b</i>	9,09 ± 2,10 <i>b</i>	58,62 ± 9,15
Dh 60 (<i>Sk</i> x <i>Kr</i>)	20,77 ± 0,80 <i>c</i>	3,90 ± 0,83 <i>b</i>	4,46 ± 0,89 <i>c</i>	53,33 ± 7,44
Dh 38 (<i>Di</i> x <i>In</i>)	11,54 ± 0,72 <i>d</i>	3,10 ± 1,15 <i>b</i>	9,29 ± 1,93 <i>b</i>	75,0 ± 8,18

Примечание: Различия достоверны для генотипов обозначенных разными буквами (*a*, *b*, *c*, *d*) при $P < 0,01$. Сорта, использованные при создании различных линий: *Ci* – Циано, *Di* – Диамант, *Kt* – Кумт, *Sk* – Скала, *Kr* – Красноярская, *In* – Инеа.

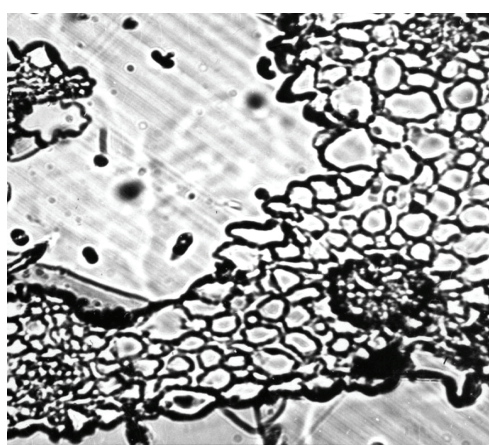
Из представленных данных видно, что все отобранные линии характеризовались повышенным выходом альбиносных растений по сравнению с зелеными. Вместе с тем, у линий *Dh* 60 (*Sk* x *Kr*) и *Dh* 83 (*Ci* x *Di*) соотношение зеленых и альбиносных растений-регенерантов приближалось к расщеплению 1:1. У *Dh* 64 (*Kt* x *Sk*) выход альбиносных растений несколько превышал выход зеленых и составил 59% от общего числа растений. Дигаплоидная линия *Dh* 38 (*Di* x *In*) отличалась от всех высоким выходом альбиносных растений (75,0%). Эти данные соответствуют тому, что частота альбинизма у злаков находится в зависимости от генотипа [6].

Одной из причин различий по частоте регенерации альбиносных растений у дигаплоидных линий могли быть изменения в геноме хлоропластов, возникшие в ходе создания этих линий. Поэтому нами предполагалось, что у них могли возникнуть генетические различия по цитоплазматическим генам, которые в последствии могли приводить к дифференциальной экспрессии генов, участвующих в детерминации регенерации зеленых и альбиносных растений-регенерантов.

Сравнительные исследования структуры листьев и ультраструктурной организации клеток зеленых и альбиносных растений-регенерантов показали, что листья зеленых растений, полученных в культуре пыльников, характеризовались нормальным развитием клеток листа и хлоропластов. Клетки имели типичное для мезофилла листа строение, в них содержались ядра, митохондрии, аппарат Гольджи, хлоропласты. Хлоропласты четырехнедельных хлорофильных растений имели развитую строму с плотными гранами и большим количеством межгранных тилакоидов (Рис1 а, б).



a



б

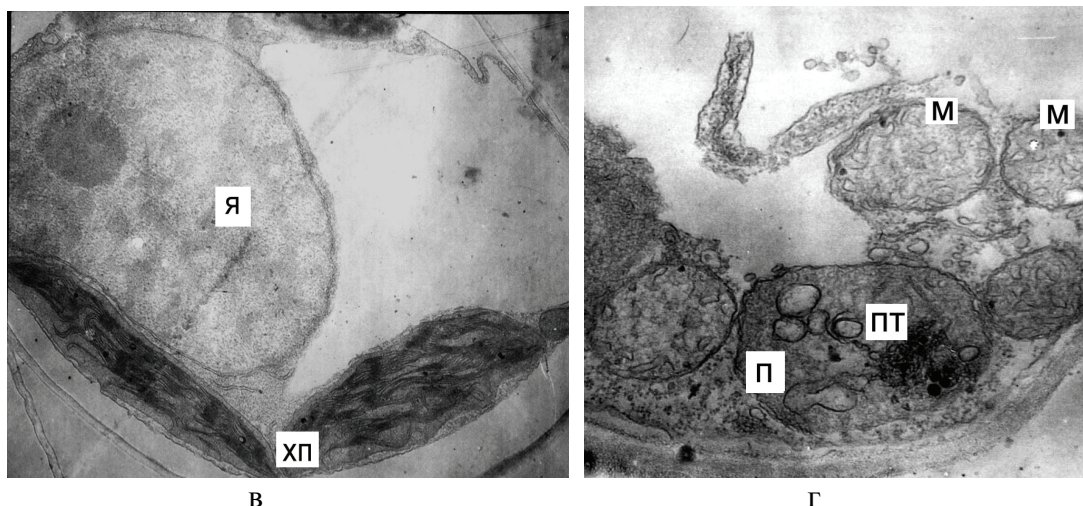


Рис. 1. Поперечный срез листа зеленых (а) и альбиносных (б) растений-регенерантов дигаплоидной линии Dh 83 (Сi x Di), первичное увеличение 120х. Ультраструктурная организация клеток листа зеленых (в) и альбиносных (г) растений-регенерантов дигаплоидной линии Dh 60 (Sk x Kr), возраст - 14 дней, первичное увеличение 14000х: Я – ядро, ХП – хлоропласт, П – пластида, ПТ – проламеллярное тело, М – митохондрии.

Вместе с тем, у альбиносных растений происходили заметные нарушения развития уже на уровне анатомической структуры листа. Они, в частности, выражались в том, что формировалось меньшее количество проводящих пучков, в состав которых входило существенно меньше клеток. Клетки мезофилла листа четырехнедельных альбиносов были значительно крупнее клеток зеленых растений, и в них не обнаруживалось содержимое (Рис 1 в, г).

Более существенные различия были выявлены при исследовании ультраструктурной организации клеток листьев альбиносных растений. В целом изменения в клетках растений-альбиносов напоминали процесс ускоренного старения клеток. Характерный признак этого явления – усиленное накопление пластоглобул в хлоропластах [7]. Кроме того, клетки проростков были сильно вакуолизированы, и вакуолизация усиливалась по мере роста листа; клетки содержали тонкий пристенный слой цитоплазмы. Происходило сокращение числа органелл, органеллы встречались группами. Наряду с этими изменениями было отмечено сохранение митохондрий с развитой системой крист, что может свидетельствовать о дыхательной активности растений-альбиносов. В альбиносных растениях двух- и трехнедельных проростков пластиды были редкими, в основном содержали проламеллярные тела, одиночные тилакоиды, многочисленные пластоглобулы, собранные в группы. Тем не менее, в них обнаруживались рибосомы, в отличие от ранее полученных другими исследователями данных [8]. Это может свидетельствовать о сохранении целостности белок-синтезирующей системы пластид в клетках безхлорофильных растений. В четырехнедельных листьях альбиносов содержались одиночные пластиды с просветленной стромой и редкими группами мелких пластоглобул, происходила гибель клеток.

Анализ полученных нами результатов и их сравнение с имеющимися литературными данными позволяют предположить то, что блок в развитии пластид в хлоропласты в альбиносном растении может происходить уже при введении микроспор в культуру на стадии переключения изначально гаметофитной программы развития на спорофитную. Тогда у генотипов, характеризующихся высокой частотой регенерации, либо выходом только альбиносных растений, дифференцировка пластид по пути развития амилопласта в ходе формирования мужского гаметофита должна происходить

раньше, чем у генотипов, формирующих зеленые растения с высокой частотой. Различия в соотношении зеленых и альбиносных растений могут быть обусловлены также несинхронностью прохождения микроспорогенеза в пределах выборки растений.

Таким образом, ультраструктурный анализ клеток альбиносных растений-регенерантов на разных стадиях развития указывает, на наш взгляд, о том, что в их клетках развитие пластид блокируется на ранних этапах, в них не происходит формирование гранально-ламеллярной мембранной системы, а затем идет постепенная деградация пластид и ускоренное старение клеток.

Литература

1. *Careda S. and Clement C.* Androgenesis and albinism in Poaceae: influence of genotype and carbohydrates// *Anther and Pollen: from biology to biotechnology*. - Berlin, 1999. – P. 211–229.

2. *Kasha K. J., Hu T. C., Oro R., Simion E., Shim Y. S.* Production of haploids in cereals// *Journal of Experimental Botany*. 2001. Vol. 52. P. 1227–1238.

3. *Cistuñ L., Ramos A., Castillo A. M.* Influence of anther pretreatment and culture medium on the production of barley doubled haploids from model and low responding cultivars// *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. – 1999. – Vol. 55. – P. 159–166.

4. *Reinbothe S., Reinbothe C.* Regulation of chlorophyll biosynthesis in angiosperms// *Plant Physiol*. –1996. –Vol. 111.– P. 1–7.

5. *Мозгова Г. В.* Изменение хлоропластного генома и структурных белков фотосинтетического аппарата альбиносных растений, полученных методом культуры пыльников пшеницы // Сборник трудов молодых ученых НАН Беларуси. –2004. – Т. 2. – С. 40–45.

6. *Larsen E. T., Tuveesson I. K. D., Andersen S. B.* Nuclear genes affecting percentage of green plants in barley anther culture// *Theor. Appl. Genet.* – 1991. – Vol. 82. – P. 417–420.

7. Атлас ультраструктуры растительных тканей. / Под ред. М. Ф. Даниловой и Г. М. Козубова. Петрозаводск, 1980. 456 с.

8. *Sunderland N., Huang B.* Barley anther culture: the switch of program and albinism// *Hereditas Suppl.* – 1985. –Vol. 3. – P. 27–40.

Резюме

Ультраструктурный анализ клеток альбиносных растений-регенерантов на разных стадиях развития указывает на то, что в их клетках развитие пластид блокируется на ранних этапах, в них не происходит формирование гранально-ламеллярной мембранной системы, а затем идет постепенная деградация пластид и ускоренное старение клеток.

An ultrastucture analysis of albino regenerant plant cells at various developmental stages indicates that plastid development in their cells is blocked at early stages. Granal-lamellar membrane system is not formed and then gradual plastid degradation and rapid cell senescence proceed.

ЯРУЛЛИНА Л.Г., СУРИНА О.Б., МАКСИМОВ И.В.

*Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН,
Россия, 450054, Уфа, пр. Октября, 71; тел. (347)2356088; e-mail: phyto@anrb.ru*

ТЕХНОЛОГИЯ *IN VITRO* В ИЗУЧЕНИИ МЕХАНИЗМОВ УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ К ПАТОГЕНАМ

Метод культуры *in vitro* открывает широкие возможности для изучения молекулярных и клеточных механизмов иммунитета растений, таких как первичные

этапы узнавания, трансдукции сигнала, индукции и экспрессии защитных реакций, механизмов действия индукторов устойчивости, а также других вопросов, выяснение которых затруднено или невозможно на уровне целого растения.

В настоящее время широко обсуждается участие активных форм кислорода в формировании и проявлении многообразия защитных реакций растений к фитопатогенам. Благодаря работам ряда специалистов в значительной мере стала понятна последовательность событий, развивающихся при контакте растения с патогеном [1; 5]. Важный этап в формировании защитного эффекта – резкая и многократная активация локализованных в клеточной стенке и плазмалемме оксидоредуктаз, регулирующих уровень активных форм кислорода (АФК) [6]. Необходимость такой регуляции диктуется тем, что АФК, являясь вторичными мессенджерами, запускают каскад защитных реакций растений, опосредуют лигнификацию клеточной стенки, и, проявляя биоцидные свойства, подавляют рост микроорганизмов, индуцируют гиперчувствительную гибель клеток хозяина в зоне инфицирования.

В последнее время появились данные о влиянии фитогормонов на экспрессию генов оксидоредуктаз. Так, показано, что транскрипция гена оксалактоксидазы пшеницы находится под контролем ауксина [2], АБК активирует один из ключевых ферментов образования АФК – НАДФН-оксидазу [4], а цитокинины участвуют в регуляции экспрессии гена пероксидазы [3].

В задачу данной работы входило изучение влияния экзогенных гормонов на морфологию и устойчивость к возбудителю твердой головни каллусов восприимчивой пшеницы, в сравнении с каллусами устойчивых образцов, обусловленную накоплением перекиси водорода с участием оксалактоксидазы.

Материалы и методы

В качестве эксплантов для получения каллусов использовали незрелые зародыши пшеницы *Triticum aestivum* L. сортов Жница и Заря и пшеницы *T. timopheevii* Zhuk. (образец к-58666 из коллекции Всесоюзного НИИ растениеводства им. Н.И. Вавилова, С.-Петербург). На 3 сут от начала 2-ого пассажа часть каллусов инфицировали телиоспорами возбудителя твердой головни *Tilletia caries* (DC.) Tul. В опытных вариантах каллусы культивировали в присутствии ИУК и АБК в концентрации 2 мг/л, кинетина в концентрации 0.2 мг/л.

Оксалактоксидазу выделяли с использованием 0.05 М сукцинатного буфера, pH 3.8 по методике [7]. Активность фермента оценивали спектрофотометрически на 10 сут после инокуляции. Единица активности фермента соответствовала количеству окисленного субстрата, дающего прирост оптической плотности ΔA за 1 мин. Содержание перекиси водорода в каллусах определяли с использованием ксиленолового оранжевого на приборе для иммуноферментного анализа АИФ – 340/620-01 (С.-Петербург) при длине световой волны 560 нм. В каждом варианте фиксировали по 5 - 10 каллусов. В таблице и на рисунках представлены средние значения из 3-х биологических повторов и ошибка средней.

Результаты и обсуждение

Контрольные каллусы восприимчивого к возбудителю твердой головни сорта Жница характеризовались как слабо обводненные, рыхлые, крупно глобулярные образования, имеющие небольшое количество плотных участков (в среднем 2-3 на каллус). Присутствие в среде культивирования фитогормонов по-разному влияло на морфологию каллусов. Так, введение АБК или кинетина в среду культивирования приводило к 2-х кратному увеличению количества плотных участков на фоне сокращения площади рыхлого каллуса. Кроме того, присутствие кинетина в среде культивирования в этот срок опыта инициировало появление в каллусах единичных ризоидов. Введение ИУК в среду культивирования приводило к разрыхлению каллусов и инициировало в них ризогенез. Инфицирование каллусов пшеницы сорта Жница

возбудителем твердой головни инициировало ризогенез, что, вероятно, связано со способностью патогена секретировать в растительные ткани ауксины.

Присутствие фитогормонов в среде культивирования изменяло защитные свойства каллусов. Так, если в контроле споры гриба начинали прорастать через 7 сут после инокуляции, то в варианте опыта с ИУК это происходило уже через 5 сут, а с АБК и кинетином только через 8 сут. В ходе инфицирования мицелий гриба рос на контрольных каллусах и на каллусах, культивируемых с ИУК, довольно быстро и через 20 сут после инфицирования покрывал примерно 40-50 % поверхности каллусов. Введение в питательную среду АБК и кинетина замедляло распространение мицелия в каллусе и к указанному сроку мицелий покрывал только около 20 % поверхности каллусов. Таким образом, внесение ИУК в среду культивирования каллусов пшеницы сорта Жница способствовало росту возбудителя твердой головни, в то время как введение АБК и кинетина, напротив, существенно ограничивало распространение мицелия. Вероятно, повышение устойчивости было обусловлено появлением в каллусах плотных участков, а снижение устойчивости - разрыхлением каллусов. Для проверки этого предположения нами были исследованы морфология и развитие защитного ответа каллусов устойчивых образцов пшеницы.

Наши наблюдения показали, что контрольные каллусы устойчивых форм мягкой пшеницы сорта Заря и образца к-58666 пшеницы Тимофеева представляли собой плотные, глобулярные образования. В каллусах пшеницы сорта Заря споры гриба прорастали через 9 сут, в каллусах пшеницы Тимофеева только через 10 сут. Более того, спустя 3 недели после инокуляции мицелий возбудителя твердой головни покрывал только 10 % площади поверхности каллусов устойчивых образцов пшеницы. Совокупность полученных данных показывает, что одним из факторов устойчивости каллусов является их высокая структурированность.

Как известно, H_2O_2 является сигнальной молекулой и участвует в запуске защитных реакций в растениях, в то же время, в нормальных условиях она участвует в процессах морфогенеза. Нашей задачей было выявление связи между уровнем H_2O_2 , структурированностью каллусов пшеницы и их устойчивостью к грибу. В интактных каллусах высоко устойчивого образца пшеницы *T. timopheevii* содержание перекиси водорода было самым высоким и составляло 32.1 ± 1.8 мкМ/г по сравнению с 15.0 ± 0.9 мкМ/г в каллусах пшеницы восприимчивого сорта Жница (табл. 1).

При инфицировании в каллусах всех исследуемых видов пшеницы концентрация H_2O_2 повышалась в различной степени. Так, если в инфицированных каллусах пшеницы *T. timopheevii* содержание H_2O_2 увеличивалось на 66%, пшеницы сорта Заря – на 53%, то у каллусах пшеницы сорта Жница только на 26% относительно контроля. Добавление ИУК в среду культивирования каллусов пшеницы сорта Жница приводило к повышению уровня перекиси водорода на 35%. В то же время в варианте с АБК содержание H_2O_2 превышало контрольный вариант на 45%, а с кинетином – на 57%.

Таблица 1

Содержание H_2O_2 (мкМ/г сырого веса) в каллусах пшеницы при культивировании в присутствии фитогормонов и при инфицировании возбудителем твердой головни (12 сут после инфицирования)

Вариант опыта	Контроль	Инфицирование
сорт Жница		
контроль	15.0±0.9	18.9±0.4
ИУК, 2.0 мг/л	20.2±0.3	23.8±0.5
Кинетин, 0.2 мг/л	23.5±2.7	48.9±3.7
АБК, 2.0 мг/л	21.8±1.2	25.1±1.5
сорт Заря		
контроль	23.7±1.9	36.3±2.1

<i>T. timopheevii</i>		
контроль	32.1±1.8	53.2±2.6

Таким образом, в присутствии АБК и кинетина накопление перекиси водорода в каллусах было намного сильнее, чем на среде, содержащей ИУК. Таким образом, ограничение роста патогена могло быть обусловлено повышением содержания перекиси водорода в каллусах пшеницы сорта Жница под воздействием фитогормонов.

Наблюдаемые изменения в уровне H_2O_2 могли быть связаны с активностью ферментов, локализованных в клеточной стенке и изменениями в биохимической составляющей апопласта, в том числе оксалаксоксидазе. Контрольные каллусы устойчивых форм пшеницы характеризовались более высокой активностью оксалаксоксидазы как в цитоплазматической, так и ионно-связанной с клеточной стенкой фракциях фермента по сравнению с каллусами восприимчивой (табл. 2).

Таблица 2

Влияние фитогормонов на активность оксалаксоксидазы (ед. на 1 г сырой массы) в каллусах пшеницы при инфицировании возбудителем твердой головки *T. caries* (10 сут после инокуляции)

Варианты	контроль		инфицирование	
	во фракции фермента			
	цитоплазматической	ионно-связанной	цитоплазматической	ионно-связанной
сорт Жница				
контроль	15.9±0.8	0.98±0.06	21.3±1.9	0.63±0.04
ИУК	11.3±0.5	0.79±0.04	14.5±0.8	0.58±0.03
Кинетин	26.2±1.7	1.32±0.08	30.9±2.7	1.21±0.07
АБК	20.1±1.4	1.14±0.05	27.8±1.6	0.93±0.05
сорт Заря				
контроль	18.9±1.2	1.09±0.05	29.6±1.9	1.64±0.09
<i>T. timopheevii</i>				
контроль	31.4±2.1	1.36±0.09	50.1±3.5	2.34±1.8

При инфицировании повышение активности оксалаксоксидазы в каллусах восприимчивой пшеницы наблюдалось только в цитоплазматической фракции фермента. В то время как, в устойчивых формах она повышалась как в цитоплазматической, так и в ионно-связанной с клеточными стенками фракциях белка. Введение АБК и кинетина в среду культивирования каллусов восприимчивой пшеницы сорта Жница приводило к индукции оксалаксоксидазы в обеих фракциях фермента, но особо высокое индуцирующее действие эти гормоны оказывали на ионно-связанную фракцию. Стимулирующий эффект АБК был ниже: активность оксалаксоксидазы в цитоплазматической фракции белка повышалась только в 1.3 раза, а в ионно-связанной с клеточной стенкой – в 1.5 раза (табл. 2).

Таким образом, результаты проведенных экспериментов свидетельствуют, что введение в среду культивирования каллусов пшеницы АБК и кинетина инициировало в них образование плотных непоражаемых грибом участков, введение ИУК – к разрыхлению каллусов и увеличивало число ризоидов. Появление плотных участков, усиление ризогенеза под влиянием гормонов было сопряжено с повышением уровня перекиси водорода в каллусах. Можно предположить, что метаболические пути, приводящие к накоплению этого соединения, различаются. Так, если в случае с АБК и кинетина повышение концентрации перекиси водорода было обусловлено индукцией активности оксалаксоксидазы в области клеточной стенки, то при воздействии ИУК более высокий уровень H_2O_2 , вероятно, связан с ингибированием под ее воздействием пероксидазы. В первом случае это способствовало повышению устойчивости каллусов

пшеницы к возбудителю твердой головни, а во втором, приводило к снижению их защитных свойств. Полученные результаты дают основание считать, что фитогормоны участвуют в формировании устойчивости растительных клеток к возбудителю твердой головни за счет регуляции активности ферментов про/антиоксидантной системы, способствующих не только накоплению перекиси водорода в зоне инфицирования, но и ее утилизации в ходе последующих защитных реакций.

Работа выполнялась при финансовой поддержке РФФИ №05-04-48310

Литература

1. *Аверьянов А.А.* Активные формы кислорода и иммунитет растений // Успехи современной биологии. - 1991. - Т. 111. - С. 722-738.
2. *Berna A., Bernier F.* Regulated expression of a wheat germin gene in tobacco: oxalate oxidase activity and apoplasmic localization of the heterologous protein // Plant Mol. Biol. - 1997. - vol. - 33. P. 417-429.
3. *Dong X.* Finding the missing pieces in the puzzle of plant disease resistance // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 1995. - vol. - 92. P. 7137-7139.
4. *Guan L., Scandalios J.C.* Developmentally related responses of maize catalase gene to salicylic acid // Proc Natl. Acad. Sci. USA. - 1995. - vol. - 92. - P. 5930-5954.
5. *Kawano T.* Roles of the reactive oxygen species-generating peroxidase reactions in plant defense and growth induction. // Plant Cell Rep. - 2003. - vol. 21. - P. 829-837
6. *Mittler R.* 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trends in Plant Science. 7: P. 405-410
7. *Vuletić M., Sukalovich V.H.* Characterization of cell wall oxalate oxidase from maize roots // Plant Sci. 2000. - vol. - 157. - P. 257-263.

Резюме

Исследовано влияние фитогормонов на морфологию и устойчивость каллусов мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L. к инфицированию возбудителем твердой головни *Tilletia caries* Tul. Выдвинуто предположение, что накопление перекиси водорода в результате индуцирующего воздействия кинетина и АБК на активность оксалатоксидазы является одним из факторов, повышающих устойчивость каллусов пшеницы к патогену.

The influence of phytohormones on resistance of wheat (*Triticum aestivum* L) calluses to bunt agent *Tilletia caries* Tul. was studied. Probably, the accumulation of hydrogen peroxide in wheat calluses under influence of kinetin and ABA on oxalateoxidase activity is one of the factors increasing wheat resistance to bunt agent.

БИОТЕХНОЛОГИИ В МЕДИЦИНЕ И СЕЛЬСКОМУ ГОСПОДАРСТВУ

АЛЕКСЕЕВА Е.И., СМИРНОВ С.О.,

ГНУ «Центральный ботанический сад» НАН Беларуси,

Беларусь, 220012, г. Минск, ул. Сурганова В

ГНУ ВНИИ зерна и продуктов его переработки Россельхозакадемии, Россия,

г. Москва, Тимирязевский пр.

ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ ПИЩЕВЫХ ЭКСТРУДАТОВ НА ОСНОВЕ ПРОДУКТОВ РАЗМОЛА ЗЕРНА АМАРАНТА

Амарант – новая для Белоруссии культура, привлекающая внимание исследователей и практиков сельского хозяйства своим уникальным составом, включающим во всех частях растения огромное количество биологически активных веществ: заменимых и незаменимых аминокислот, микроэлементов, минералов, витаминов, протеинов, полиненасыщенных жирных кислот, холина, желчных кислот, спиртов, стероидов и сквалена. Экспертами по продовольствию ООН амарант назван наиболее перспективной зерновой культурой XXI века. Известно 60 видов рода *Amaranthus* (семейство *Amaranthaceae*), большинство из них считаются сорными растениями, 12 видов окультурены и используются как овощные, зерновые, кормовые и декоративные растения.

В настоящее время эта культура широко возделывается в Индии, Китае, странах Юго-Восточной Азии, Африки и Европы. В Китае в пищу используют как листья, так и семена амаранта, а в период цветения амарант выступает в качестве медоносной культуры, мед от которой отличался более высокими лекарственными свойствами.

Амарант представляет собой травянистое однолетнее пурпурно-зеленое или желто-зеленое растение, высота которого может достигать 2,5-4 м. Метелка в зрелом состоянии имеет длину до 30 см и диаметр до 15 см. Вес одной метелки доходит до 1 кг. Семена амаранта очень малы, подобно песчинкам, а число их огромно (до 500 тыс. в одной метелке). Зерновой амарант дает семена, по характеристике и свойствам сходные с зерном злаков, однако поскольку он не принадлежит к семейству злаковых его называют псевдозлаковым.

Сравнительный анализ пищевой ценности семян амаранта и традиционных пищевых культур приведен в таблице 1.

Таблица 1

Питательная ценность амаранта и зернобобовых культур традиционного использования, (данные на сухие семена)

Показатели, %	Амарант	Рис	Кукуруза	Пшеница	Фасоль
Протеин	15,54-23	7,60	7,68	13,00	21,48
Клетчатка	5,21	6,40	2,46	2,90	5,70
Зола	3,61	3,40	1,65	1,50	4,61
Жир	7,31	2,20	5,00	1,70	1,96
Кальций	0,14	0,02	0,01	0,02	0,15
Фосфор	0,54	0,18	0,27	0,41	0,41
Магний	0,22	0,08	0,13	0,10	0,19
Калий	0,57	0,12	0,48	0,40	1,30
Натрий	0,12	0,01	0,01	0,01	0,02
Медь (ppг)	6,00	4,00	4,00	4,20	10,00
Марганец (ppг)	12,00	7,00	7,00	28,00	8,00
Цинк (ppг)	21,00	24,00	24,00	41,00	32,00
Энергетическая ценность, ккал	439,90	364,00	361,00	354,00	361,00

В семенах амаранта содержится 7-8 % жирного масла, которое по жирнокислотному составу близко к кукурузному, но имеет ряд существенных преимуществ. Витамин Е в амарантовом масле находится в особо активной токотриенольной форме, и что еще важнее, в нем содержится до 10 % сквалена, который до недавнего времени получали только из печени глубоководной акулы. В связи с этим, амарантовое масло в последнее время популярно и в медицине, и как биологически активная добавка к пище.

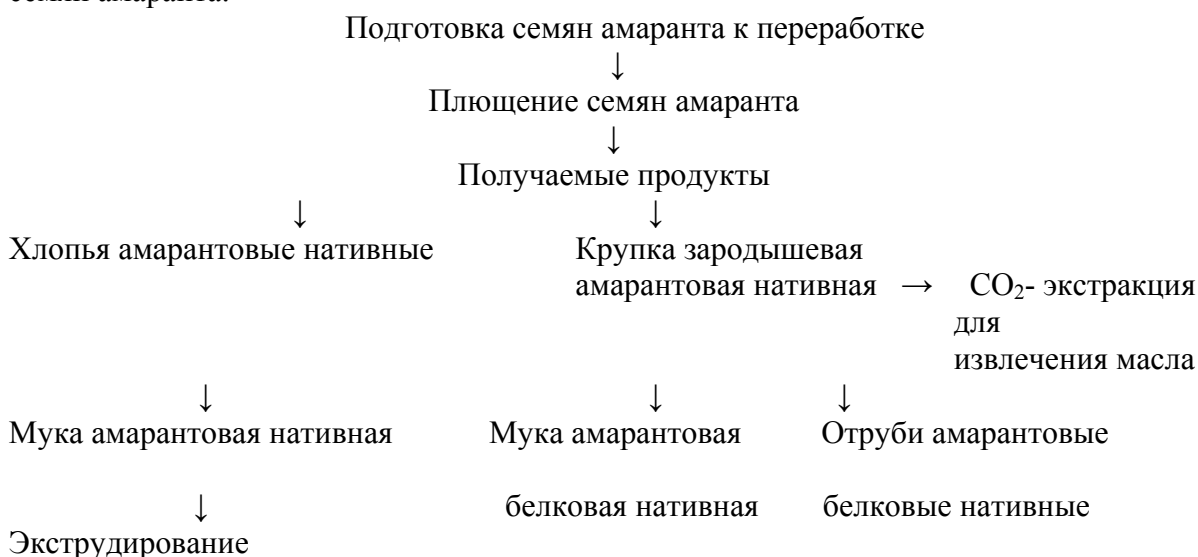
Также большим достоинством амаранта является не только высокий уровень содержания белка, но и его аминокислотный состав. Качество белка амаранта считается очень высоким, из-за значительного содержания незаменимых аминокислот, в частности ценной аминокислоты – лизина (4,3-5,7% к общему белку семян), что в два раза больше, чем у пшеницы и в три раза больше, чем у кукурузы и сорго, и даже сопоставимо по количеству с соей и коровьим молоком.

Крахмал, составляющий до 70% массы амаранта, обладает уникальными свойствами. Размер его зерна в несколько раз меньше, чем, рисового и кукурузного. Благодаря этому крахмал амаранта более предпочтителен в качестве наполнителя при изготовлении колбасных изделий, которые подвергаются заморозке и последующей разморозке.

Для наиболее рационального использования семян амаранта, с учетом его биохимического состава, сотрудниками ВНИИ зерна и продуктов его переработки и компании «Амафор» (г. Москва), разработана технология измельчения, позволяющая осуществить глубокую переработку зерна амаранта и деления его на составляющие части, для обеспечения любого необходимого потребителю анатомического и соответственно, биохимического и гранулометрического состава, и последующего использования в готовом к употреблению виде или дальнейшей обработке.

В результате разработанных технологий получено 18 видов продуктов из семян амаранта. Каждый продукт отличается процентным содержанием белка, жира, крахмала, клетчатки, витаминов и микроэлементов и находит свое применение в том или ином производстве.

На рисунке 1 приведена схема технологических процессов комплексной переработки семян амаранта.



Мука амарантовая всех сортов находит применение в качестве улучшителя (разрыхлителя) в хлебопекарном, кондитерском, макаронном и других производствах. Хлопья имеют самостоятельное применение в качестве диетического пищевого продукта.

Отруби зародышевые используются в производстве макарон.

В таблице 2 приведены сведения о пищевой и энергетической ценности некоторых продуктов размола зерна амаранта

Таблица 2
Пищевая и энергетическая ценность продуктов размола зерна амаранта

Наименование Продукта	Бел ки	Жи ры	Кра х мал	Кле т чат ка	Зо ла	Минеральные вещества						Витамины			Энерге тиче ская ценн ость ккал	
						Na	K	Ca	Mg	P	Fe	B ₁	B ₂	B ₅		
						Грамм в 100 г продукта					Миллиграмм в 100 г продукта					
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1	Амарант плющенный нативный	17,3	7,8	53,4	6,4	2,6	92	487	275	176	540	57	5,42	2,85	2,4	378
2	Хлопья амарантовые нативные	6,6	1,9	70,4	2,6	1,2	74	216	131	106	364	36	3,54	1,45	1,9	335
3	Крупка зародышевая амарантовая нативная	36,3	17,8	11,8	7,1	5,7	117	769	482	279	879	84	8,67	5,75	3,0	381
4	Мука амарантовая обдирная нативная	16,7	5,6	54,5	3,5	2,4	86	376	244	151	480	48	5,73	3,10	1,2	349
5	Мука амарантовая сортовая нативная	6,8	1,8	76,7	2,5	0,8	67	146	85	74	290	22	3,41	1,47	2,1	360
6	Отруби амарантовые белковые нативные	23,3	8,6	8,5	18,1	7,8	214	920	561	395	997	13 1	9,83	4,53	2,5	277
7	Крупка зародышевая амарантовая полуобезжи Ренная	38,8	10,8	12,6	7,0	5,2	113	765	477	274	870	84	8,54	5,70	3,0	330

Как видно из таблицы больше всего крахмала содержится в хлопьях амарантовых нативных до 70,4 % и в муке амарантовой сортовой нативной до 76,7%. Именно эти фракции являлись объектом исследований и дальнейшей обработки на экструдере во ВНИИ крахмалопродуктов. В качестве сырья использовалось зерно светлоокрашенных сортов «Ультра», «Кизлярец», «Сэм», «Крепыш».

Экструзионная обработка является одной из перспективных экологически безопасных способов изменения функциональных характеристик белково-крахмального комплекса амарантового сырья, в процессе которой молекулы растительных биополимеров подвергаются структурным и физико-химическим модификациям без применения химических реагентов и образования вредных отходов.

Во ВНИИ крахмалопродуктов проведены работы по исследованию и получению опытных образцов экструдированной муки амарантовой сортовой нативной. Были получены экструдированные хрустящие палочки при разном влагосодержании исходного сырья (15%-19%) и различной температуре (150⁰ -160⁰С) обработки. В зависимости от этих параметров изменялся коэффициент экспандирования и структурно-механические свойства экструдатов. Образцы были исследованы на

растворимость и водоудерживающую способность. Исследования показали, что водоудерживающая способность увеличилась по сравнению с исходной. При экструзионной обработке происходит частичная денатурация белков, в результате чего их ферментативная атакуемость возрастает почти в два раза. Крахмальные зерна полностью разрушаются, их природная упорядоченная структура претерпевает превращения и переходит в аморфную структуру, что подтверждается рентгеноструктурным анализом экструдатов.

Полученные образцы экструдатов могут использоваться как готовые продукты питания, не требующие дополнительной кулинарной обработки, так и в качестве полуфабрикатов. Благодаря своим прекрасным органолептическим характеристикам (однородная структура, легкий запах и вкус ореха), высокой водоудерживающей способности, представляется перспективным использовать их в качестве обогащающего и модифицирующего компонента в технологии кисломолочных продуктов и творожных изделий, салатных заправках, а также продуктов подверженных процессам замораживания-оттаивания.

Таким образом, экструзионная обработка муки амарантовой сортовой нативной позволяет значительно расширить ассортимент экологически чистых и безопасных пищевых продуктов общего, функционального и лечебно-профилактического назначения.

Литература

1. Дулаев В.Г., Медведев А.Е., Меньшенин А.И., Смирнов С.О., Технологические аспекты комплексной переработки семян амаранта, издательство – Труды научно-практической конференции. РАСХН «Технологические аспекты комплексной переработки сельскохозяйственного сырья при производстве экологически безопасных пищевых продуктов общего и специального назначения по направлению: 2Пищевые технологии будущего. Гипотезы. Теории. Эксперименты»; М.: Углич, 2002. - С.175
2. Дулаев В.Г., Меньшенин А.И., Смирнов С.О., Новая технология и ассортимент продуктов глубокой переработки семян амаранта// Научное обеспечение и тенденции развития производства пищевых добавок в России. Материалы докладов международной конференции/ Россельхозакадемия, ГУ ВНИИПАКК. – СПб. 2005.- С.66.
3. Жушман А.И., Карпов В.Г., Иващенко П.А., Изменение свойств и структуры кукурузных крахмалов и муки при экструзионной обработке. –М.: сахарная пром.,1993.-№3.- С. – 39-42.
4. Краус С.В., Линниченко В.Т., Кривенцова Л.Д., Тупица В.Ю., Экструдирование муки для детского питания// Изв. Вузов. Пищевая технология.-1988.-№1.-С.62-64.

БАЄР О.О.¹, ЄМЕЦЬ А.І.¹, РАДЧУК В.В.², БЛЮМ Я.Б.¹

¹Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України,
вул. акад. Заболотного, 148, Київ, 03680, Україна, e-mail: alyemets@univ.kiev.ua

²Інститут генетики рослин та дослідження культурних рослин,
Німеччина, 06466, Гатерслебен, Корренттрассе, 3

ПЕРЕНЕСЕННЯ СТІЙКОСТІ ДО ДИНІТРОАНІЛІНОВИХ ГЕРБІЦИДІВ У РОСЛИНИ ЛЬОНУ-ДОВГУНЦЯ ЗА ДОПОМОГОЮ *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*

Льон культурний (*Linum usitatissimum* L.) впродовж багатьох років залишається основною прядильною культурою, що продукує високоякісне волокно, яке йде на

виробництво побутових, технічних і пакувальних тканин (Карпець і ін., 2001). Враховуючи важливість даної культури, вдосконалення її агрономічних характеристик на сьогоднішній день залишається надзвичайно актуальним. Важливою складовою агротехнічного менеджменту цієї сільськогосподарської культури залишається використання гербіцидів. Серед гербіцидів, які можуть використовуватися для боротьби з бур'янами у посівах льону, одне з визначальних місць посідають антимітотичні сполуки або руйнівники мікротрубочок, яким належить близько чверті ринку всіх гербіцидів (Molin & Khan, 1997; Vaughn, 2000). Динітроанілінові гербіциди, які широко використовуються, зокрема трифлуралін, пендиметалін і оризалін, належать саме до цієї групи. Основною мішенню дії динітроанілінів є тубулін (Емец и Блюм, 1999; Morejohn & Fosket, 1991), структурний компонент мікротрубочок будь-якої еукаріотичної клітини. Відомо, що тубуліни рослин зв'язуються більш специфічно з даними речовинами і в більш низьких, мікромолярних, концентраціях, ніж тубуліни тварин. Для отримання ліній рослин, стійких до динітроанілінових гербіцидів, було створено конструкцію для агробактеріальної трансформації, що містить мутантний ген альфа-тубуліну (*Tuam1*), ізольованого із резистентного до цих гербіцидів біотипу гусячої трави (*Eleusine indica* L.) (Yamamoto et al., 1998). Цей ген забезпечує стійкість не лише до широкого спектру не тільки динітроанілінових гербіцидів, але й перехресну стійкість до гербіцидів з класу фосфоротіоамідів.

Таким чином, метою даної роботи було перенесення гену стійкості до динітроанілінових гербіцидів у рослини льону-довгунцю за допомогою *Agrobacterium tumefaciens* і отримання гербіцид-стійких трансгенних ліній льону.

Матеріали та методи

Для агробактеріальної трансформації використовували бінарний вектор pBITUBA8, який містив мутантний ген α -тубуліну *Tuam1* з *E. indica* і ген β -тубуліну *HvTUB1* з ячменю (*Hordeum vulgare*). Обидва гени знаходилися під контролем 35S-промотора вірусу мозаїки цвітної капусти (Yemets et al., 2007). Оскільки конструкція pBITUBA8 також містила селективний маркерний ген *ntpII*, що забезпечує стійкість до канаміцину, було проведено тестування життєздатності експлантів льону на поживних середовищах, які містили різні концентрації антибіотика (0-200 мг/л), для визначення оптимальної селективної концентрації даного агента. Для цього сегменти гіпокотилів п'ятиденних проростків розміром 2-3 мм переносили в чашки Петрі (по 25-30 експлантів на чашку) з відповідною концентрацією канаміцину і інкубували 28 діб при температурі 24-26°C в умовах 16/8 годинного періоду.

Для трансформації льону використовували нічну культуру агробактерії, яку вирощували на середовищі LB (Sambrook et al., 1989) з рифампіцином (100 мг/л) і канаміцином (100 мг/л). Бактерію інкубували на орбітальному шейкері при 28°C. З метою запобігання негативного впливу метаболітів на процес трансформації після закінчення часу нарощування культуру агробактерії очищали центрифугуванням (1000 об/хв.), супернатант видаляли, а осад перед інокуляцією розбавляли свіжим рідким середовищем МС-БН (Баер и др., 2004) до досягнення оптичної щільності $OD_{600} = 0,5$.

В якості експлантів для трансформації використовували сегменти гіпокотилів п'ятиденних проростків льону-довгунцю сорту Могилевський 2 розміром 2-3 мм, які розміщували на чашки Петрі з агаризованим середовищем МС-БН, де протягом 48 год. вони проходили період прекультивування. Трансформацію і ко-культивування з агробактерією проводили згідно методу (Дрейпер и др., 1991). Після ко-культивування експланти переносили у чашки з культурою агробактерії і залишали на 2 год. Контрольну частину експлантів на цей час розміщували на рідкому середовищі МС-БН без агробактерії. Далі експланти переносили на середовище МС-БН, в яке було додано антибіотик цефотаксим у концентрації 200 мг/л для інгібування розвитку колоній агробактерій і канаміцин (100 мг/л) для створення селективного тиску на нетрансформовані клітини. Рослини, які вижили і регенерували в селективних умовах,

в подальшому переносили на безгормональне середовище МС (Murashige and Skoog, 1962) для укорінення та проведення молекулярно-біологічного аналізу.

Отримані трансгенні рослини аналізували за допомогою ПЛР-аналізу та блотинг-гібридизації за Саузерном. Рослинну ДНК виділяли за допомогою набору DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, ФРГ). Умови реакції і праймери для ампліфікації гену *npt II* були описані раніше (Радчук и др., 2000). Для аналізу по Саузерну 5 мкг рослинної ДНК кожної лінії і 100 нг ДНК вектору pBITUBA8 обробляли ендонуклеазою *Hind III* ("Ферментас", Литва), розділяли у 0,8%-ному агарозному гелі і переносили на нейлоновий фільтр Hybond-NX („Amersham“, США) відповідно до стандартної методики (Sambrook et al., 1989). Наступну гібридизацію, відмивку і експозицію проводили, як описано раніше (Radchuk et al., 2005). В якості зондів використовували фрагменти генів *Tuam1*, *HvTUB1* та *nptII*, отримані за допомогою ПЛР.

Результати та обговорення

Для трансформації льону-довгунцю використовували конструкцію, що містила обидва гени гетеродимерного білку тубуліну: мутантний ген α -субодиниці (*Tuam1*) з природного високостійкого до динітроанілінів біотипу *E. indica* і повнорозмірний ген β -субодиниці тубуліну (*HvTUB1*) з *H. vulgare*. Відомо, що наявність генів саме обох одиниць екзогенного тубуліну повинна забезпечувати їх стабільну експресію в клітинах трансгенних рослин (Anthony et al., 1998).

Важливою передумовою для розробки успішної системи трансформації рослин є також відпрацювання методики введення їх в культуру та отримання регенерантів. В попередній роботі нами було введено в культуру сорти льону вітчизняної та зарубіжної селекції, проведено скринінг на відбір сортів з високим регенераційним потенціалом (Баер и др., 2004). На основі отриманих результатів було виділено сорт Могилевський 2, що характеризується високим ембріогенним потенціалом, який також має високі господарські показники щодо якості волокна.

Для агробактеріальної трансформації використовували сегменти гіпокотилів, оскільки вони, як було показано раніше, демонструють найбільшу регенераційну здатність і є найбільш оптимальними експлантами (Поляков и др., 1998; Dong & McNughen, 1991). Оскільки плазмід рBITUA8 містить маркерний ген *nptIII*, селекцію трансгенів проводили на середовищі з канаміцином. Попередньо було проведено оцінку впливу різних концентрацій цього селективного агенту на життєздатність клітин льону. Канаміцин додавали в середовище МС-БН для індукції калусогенезу та регенерації пагонів в концентраціях 0, 50, 75, 100 і 200 мг/л. При використанні антибіотика на всіх середовищах спостерігали пригнічення калусоутворення у порівнянні з контролем. Впродовж чотирьох тижнів культивування утворення калусів спостерігали при використанні концентрацій канаміцину 50 і 75 мг/л. Хоча калусні колонії були життєздатними, формування пагонів при цьому не відмічали. При використанні концентрацій канаміцину 100 і 200 мг/л калусоутворення взагалі було відсутнє, а через місяць після початку культивування експланти повністю відмирили. Тому враховуючи отримані дані, для селекції трансгенних рослин льону була вибрана концентрація 100 мг/л канаміцину. Для льону-довгунця на сьогоднішній день існує лише одна робота по трансформації, в якій для регенерації трансформантів з гіпокотилів також використовували 100 мг/л даного антибіотику (Поляков и др., 1998).

Як наслідок, через 3-4 тижні після інокуляції сегментів гіпокотилів льону спостерігали активне формування калусів по краях експлантів на середовищі, що містило селективний агент. У результаті селективного відбору були відібрані лише зелені колонії, з яких в подальшому регенерували рослини. У результаті роботи було відселектовано 120 таких канаміцин-стійких ліній. Раніше аналогічним чином через стадію калусу було регенеровано трансгенні рослини льону (Basiran et al., 1987; Поляков и др., 1998). Ефективність агробактеріальної трансформації оцінювали по

співвідношенню кількості сегментів гіпокотилів, що давали життєздатний калус на селективному середовищі, до загальної кількості експлантів, що трансформували. Через місяць після початку культивування у присутності канаміцину для сорту Могилевський 2 ефективність складала 65%. Не дивлячись на високу ефективність трансформації зі збільшенням часу селекції та продовженням періоду культивування різко знижувалася частота регенерації з отриманого калусу та коренеутворення трансформантів льону. Встановлено, що ефективність регенерації трансформантів знаходилась в межах 10-12%.

Для підтвердження трансгенної природи отриманих регенерантів було проведено молекулярно-біологічний аналіз за допомогою ПЛР. При ампліфікації з використанням специфічних праймерів до перенесеного *npt II* гену були отримані фрагменти, що відповідають позитивному контролю (плазмідна ДНК). При аналізі нетрансформованого контролю ампліфікація гену не відбувалась. Оскільки як α -, так і β -тубулін рослин кодуються відносно великою кількістю генів з подібними послідовностями, то специфічна ампліфікація перенесених генів з конструкції рВІТUBA8 в трансгенних рослинах була неможливою, тому для виявлення наявності даних генів α - та β -тубуліну в трансформованих рослинах використовували метод гібридизації за Саузерном. Як видно з представлених результатів (Рис. 1 А і Б), ендогенні послідовності як α -, так і β -тубуліну льону гібридизувались з зондом до α -тубуліну гусячої трави та β -тубуліну ячменю, відповідно, що призводило до появи ідентичної кількості і розміщення гібридизаційних полос ДНК трансгенних і контрольних рослин.

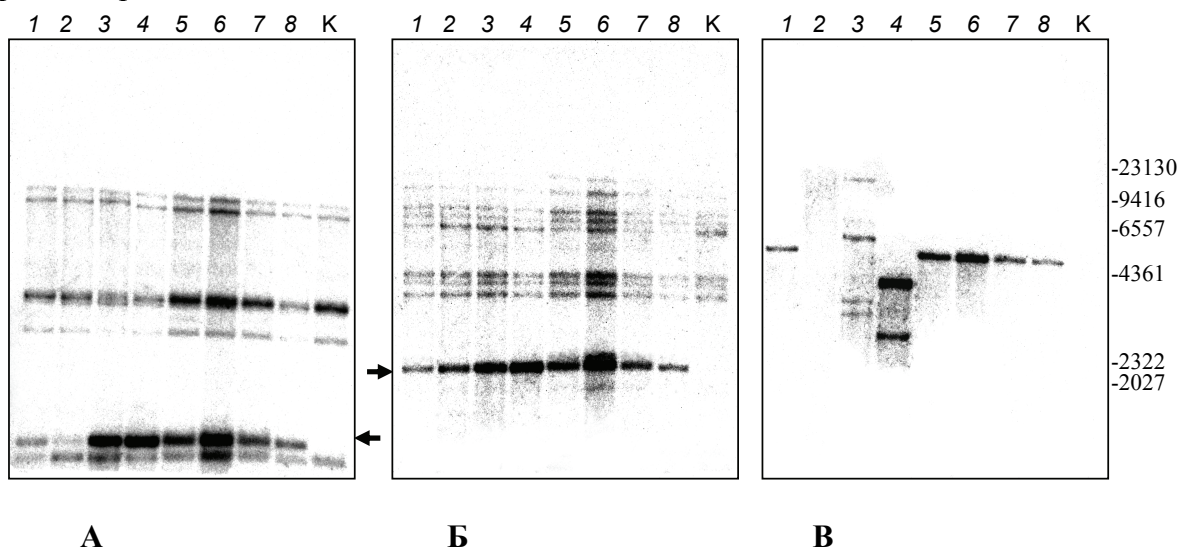


Рис.1. Аналіз трансгенних рослин льону-довгунця методом блотинг-гібридизації по Саузерну з пробами до *Tuam1*(А), *HvTUB1* (Б) та *nptII* (В) генів. 1-8 – незалежні трансгенні рослини; К – контрольна нетрансформована рослина. Положення фрагментів молекулярного маркера вказано в парах основ праворуч. Стрілками показано положення специфічних гібридизованих фрагментів для *Tuam1*(А) і *HvTUB1* (Б) генів відповідно.

За допомогою Саузерн-гібридизації з використанням зонду до *nptII* гену (Рис. 1В) було також встановлено, що число копій Т-ДНК в трансгенних рослинах льону коливалась від 1 до 4, однак більшість рослин містила лише 1 послідовність Т-ДНК.

Висновки

Результати проведених досліджень демонструють успішну трансформацію льону-довгунця за допомогою *A. tumefaciens* та стабільну інтеграцію мутантного гену α -тубуліну, що забезпечує стійкість до динітроанілінових гербіцидів.

Література

Баер О.А., Баер Г.Я., Емец А.И., Блюм Я.Б. Введение в культуру *in vitro* и регенерационная способность сортов льна-долгунца с различной устойчивостью к полеганию // Физиол. биохим. культ. растений. – 2004. – т. 36, № 1. – С. 48-54.

Генная инженерия растений. Лабораторное руководство / Под ред. Дж. Дрейпера, Р. Скотта, Ф. Армитиджа, Р. Уолдена. – М.: Мир, 1991. – 408 с.

Емец А.И., Блюм Я.Б. Устойчивость растений к гербицидам с антимикротрубочковым механизмом действия: от природных мутантов до переноса генов // Физиол. раст. – 1999. – т. 46, № 6. – С. 899–907.

Карпець І.П., Карпець А.І., Динник О.В. Нова методика визначення якості волокна у поодиноких стеблах льону-довгунця у зв'язку з селекційними і генетичними дослідженнями // Генетика і селекція в Україні на межі тисячоліть. – К.: Логос, 2001. – т. 3. – С. 68-70.

Поляков А.В., Чиркизова О.Ф., Каляева М.А., Захарченко Н.С., Балохина Н.В., Бурьянов Я.И. Трансформация растений льна-долгунца // Физиол. раст. – 1998. – т. 45, № 6. – С. 882-887.

Радчук В.В., Клоке Э., Радчук Р.И., Нойманн М., Блюм Я.Б. Получение трансгенных растений рапса (*Brassica napus* L.) с помощью *Agrobacterium tumefaciens* // Генетика. – 2000. – т. 36, № 7. – С. 932-941.

Anthony R., Waldin T., Ray J., Bright S., Hussey P. Herbicide resistance caused by spontaneous mutation of the cytoskeletal protein tubulin // Nature. – 1998. – vol. 393. – P. 260-263.

Basiran N., Armitage P., Scott R.J. & Draper J. Genetic transformation of flax (*Linum usitatissimum*) by *Agrobacterium tumefaciens* regeneration of transformed shoots via a callus phase // Plant Cell Rep. – 1987. – N 6. – P. 396-399.

Dong J.Z., McHughen A. Patterns of transformation intensity on flax hypocotyls inoculated with *Agrobacterium tumefaciens* // Plant Cell Rep. – 1991. - vol. 10. - P. 555-560.

Molin W.T. & Khan R.A. Mitotic disrupter herbicide: recent advances and opportunities. In: Herbicide Activity: Toxicology, Biochemistry and Molecular Biology, 1997.

Morejohn L.C., Fosket D.E. The biochemistry of compounds with anti-microtubule activity in plant cells // Pharm. Ther. – 1991. – vol. 51. – P. 217–230.

Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. – 1962. – vol. 15. – P. 473-497.

Radchuk V.V., Sreenivasulu N., Radchuk R.I., Wobus U., Weschke W. The methylation cycle and its possible function in barley endosperm development // Plant Mol. Biol. - 2005. – vol. 59. - 289-307.

Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbour Press, Cold Spring Harbour, NY (1989).

Vaughn K.C. Anticytoskeletal herbicides/ in: P.Nick (Ed.). Plant Microtubules: Potential for Biotechnology, Springer, New York.- 2000. – P. 193-205.

Yamamoto E., Zeng L., Baird W.V. α -Tubulin missense mutations correlate with antimicrotubule drug resistance in *Eleusine indica* // Plant Cell. – 1998. – vol. 10. – P. 297–308.

Yemets A., Radchuk V., Bayer O., Bayer G., Pakhomov A., Baird V., Blume Ya. Development of transformation vectors based upon a modified plant α -tubulin genes as a selectable marker // Cell Biol. Int.- 2007.-doi:10.1016/j.cellbi.2007.11.012

Резюме

Представлено дані по агробактеріальній трансформації рослин льону-довгунця *L. usitatissimum* сорту Могилевський 2, що характеризується високим ембріогенним потенціалом, геном стійкості до динітроанілінових гербіцидів. Молекулярно-генетичний аналіз підтвердив наявність та експресію перенесеного мутантного гену α -тубуліну в трансгенних лініях льону.

Представлены результаты по агробактериальной трансформации растений льна-долгунца *L. usitatissimum* сорта Могилевский 2, который характеризуется высоким эмбриогенным потенциалом, геном устойчивости к динитроанилиновым гербицидам. Молекулярно-генетический анализ подтвердил наличие и экспрессию мутантного гена α -тубулина в трансгенных линиях льна.

Data on *Agrobacterium*-mediated transformation of flax *L. usitatissimum* cultivar Mogilevsky 2 with high embryogenic potential by dinitroaniline herbicide resistant gene are presented. Molecular genetic analysis confirmed presence and expression of mutant α -tubulin gene in transgenic flax line.

БАЕР Г.Я.¹, БАЕР О.А.¹, ШИША Е. Н.¹, ЛЕМЕШ В.А.², КАРТЕЛЬ Н.А.², ЕМЕЦ А.И.¹, БЛЮМ Я.Б.¹

¹*Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины, Украина, 03680, Киев, ул. акад. Заболотного, 148, e-mail: galinabayer@univ.kiev.ua*

²*Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Беларусь, 220072, Минск, ул. Академическая, 27*

ВИЗУАЛИЗАЦИЯ МИКРОТРУБОЧЕК В КЛЕТКАХ ЛЬНА-ДОЛГУНЦА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ХИМЕРНОГО ГЕНА GFP- TUA6

Лен-долгунец является одной из древнейших технических культур, успешно выращиваемой в мире, и, в частности, в Украине. Основную ценность льна-долгунца составляет стебель, где содержится 20-30 % волокна. Известно, что из тонких стеблей льна получают волокно более высокого качества, однако такие растения, как правило, характеризуются сниженной устойчивостью к полеганию. Льняное волокно также называют лигноцеллюлозным, поскольку оно состоит в основном из целлюлозных фибрилл (70 %), а также гемицеллюлозы, пектина и лигнина. Считают, что целлюлозные микрофибриллы являются основным механическим элементом клеточной стенки и их ориентация зависит от ориентации кортикальных микротрубочек клеток (Baskin 2001; Baskin 2005). В ряде работ показано, что нарушения нативной организации микротрубочек (Whittington et al., 2001; Baskin 2004) или отложения целлюлозных микрофибрилл (Sugimoto et al., 2001; Williamson et al., 2001) после обработки химическими веществами, а также вследствие генетических мутаций, приводят к изменению нормального роста клеток и появлению аномального фенотипа у растений. С помощью методов иммунофлуоресцентной микроскопии ранее было установлено, что ориентация отложения целлюлозных фибрилл при формировании клеточной стенки всегда происходит параллельно направлению кортикальных микротрубочек в клетке (Giddings & Staehelin, 1991). Для более детального изучения роли микротрубочек в процессах формирования и отложения целлюлозных фибрилл в клеточной стенке, а также особенностей организации кортикальных микротрубочек в клетках сортов льна-долгунца, характеризующихся различной устойчивостью к полеганию, было решено провести трансформацию льна химерным геном тубулина, слитым с репортерным геном GFP (green fluorescent protein). Успешная экспрессия GFP-меченого тубулина в клетках трансформантов, детектируемая с помощью конфокальной микроскопии, позволила бы глубже изучить особенности организации микротрубочек в живых клетках этих линий.

Поэтому целью нашей работы являлась агробактериальная трансформация генотипов льна с разной устойчивостью к полеганию, районированных на территории

Украины и Беларуси, с использованием конструкции, несущей химерный ген GFP-TUA6 для прижизненной визуализации микротрубочек.

Материалы и методы

В работе использовали сегменты гипокотилей асептически выращенных растений льна-долгунца (*Linum usitatissimum* L.) ряда генотипов, районированных на территории Украины и Беларуси: Глазур, Могилевский 2, Светоч, Зоря 87, Рушничок, Украинский 3, Свитанок, Томский 16 (семена предоставлены Институтом лубяных культур УААН), Вита, Весна, Дашковский, Нива (предоставленные Институтом цитологии и генетики НАН Беларуси). Стерилизацию и проращивание семян осуществляли по раннее разработанной нами методике (Баер и др., 2004). Среда для регенерации растений содержала макро- и микроэлементы МС (Murashige and Skoog, 1962), 300 мг/л мезо-инозитола, 400 мг/л МЕС, 18 мг/л сахарозы, 0,8 %-ный агар, pH 5,8. Для изучения влияния фотогормонального баланса на эффективность регенерации льна использовали шесть вариантов сред, содержащих БАП (1-3 мг/л) в комбинации с НУК (0,01 и 0,05 мг/л). Культуры инкубировали при температуре 22-24°C и 16-часовом фотопериоде.

В экспериментах по трансформации использовали супервирулентный штамм *Agrobacterium tumefaciens* [LBA 4404 (pBI121)], Т-ДНК которой содержала химерный ген GFP-TUA6 под контролем 35S промотора вируса цветной мозаики капусты. В качестве селективного маркерного гена конструкция содержала *nptII* ген, который обеспечивает устойчивость к канамицину (Ueda et al., 1999). Конструкция была любезно предоставлена Dr. T. Hashimoto (Nara Institute of Science and Technology, Japan).

Трансформацию растений льна проводили, используя ночную культуру агробактерии, которую выращивали на среде LB с добавлением 100 мг/л канамицина. Бактерию выращивали при температуре +28°C при постоянном качании на орбитальном шейкере. По истечении времени наращивания культуру агробактерии очищали осаждением на центрифуге со скоростью 1000 об/мин. Супернатант удаляли, осадок перед инокуляцией разбавляли жидкой средой МС до достижения оптической плотности $OD_{600} = 0,4$. В качестве эксплантов для трансформации использовали гипокотили пятнадцатидневных проростков льна-долгунца размером 2-3 мм. Трансформацию и кокультивирование с агробактерией проводили согласно методу, описанному ранее (Дрейпер и др., 1991). Селекцию трансформантов проводили на среде для регенерации с добавлением 100 мг/л канамицина, а также цефотаксима в концентрации 200 мг/л для ингибирования развития агробактерии. Для укоренения побеги переносили на безгормональную среду МС (Murashige and Skoog, 1962).

Инкорпорацию меченого GFP тубулина в микротрубочки клеток трансгенных линий льна визуализировали с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа LSM 510 META (Carl Zeiss, Германия).

Полученные трансгенные растения также анализировали с помощью ПЦР с использованием праймеров к последовательности 35S-промотора CaMV, а именно 5'-GCTCCTACAAATGCCATCA-3' и 5'-GATAGTGGGATTGTGCGTCA-3'. Растительную ДНК выделяли с помощью Plant DNA Isolation Kit (Sigma, Германия). В состав реакционной смеси для ПЦР входило 500 нг геномной ДНК, 0,1 U Taq-ДНК полимеразы (Репликон, Россия), 5× буфер (Репликон, Россия), 0,2 mM каждого dNTP (Sigma, Германия) и праймеры в концентрации 1,0 мкМ. Реакцию проводили на амплификаторе PCR Apply Biosystem 2720 (США) при следующих условиях: первичная денатурация 4 мин при 94°C; далее 25 циклов 1 мин - 56°C, 1 мин - 94°C, 1,5 мин - 72°C, конечная элонгация 7 мин - 72°C. Полученные продукты реакции впоследствии разделяли в 1 %-ном агарозном геле.

Результаты и обсуждение

Для изучения роли микротрубочек в формировании клеточной стенки использовали генотипы льна-долгунца, которые отличались различной устойчивостью к

полеганию, а именно, сорта: Глазур, Зоря 87, Томский 16, Вита, Нива - устойчивые к полеганию, Могилевский 2, Рушничок, Свитанок, Вручий - со средней устойчивостью, сорта Светоч, Весна и Дашковский – неустойчивые к полеганию. Для создания успешной системы трансформации растений необходимо было подобрать условия для эффективной регенерации растений *in vitro*. Известно, что регенерационный потенциал культуры клеток или органов проявляет генотипическую зависимость, что достаточно сильно выражено у льна (Баер и др., 2004). Поэтому для сортов, используемых в работе, был проведен анализ по подбору оптимальных сред для введения в культуру и регенерации растений из разных типов эксплантов. Было установлено, что для всех сортов оптимальной была среда, содержащая 1-2 мг/л БАП и 0,05 мг/л НУК, тогда как повышение концентрации цитокинина до 3 мг/л существенно снижало количество регенерировавших побегов.

В качестве эксплантов для агробактериальной трансформации были использованы сегменты гипокотилей, поскольку они являются наиболее подходящим материалом для регенерации растений (Поляков и др., 1998; Dong & McHughen, 1993). Через 8-10 дней после трансформации гипокотилей льна наблюдали формирование зеленых каллусов на среде с канамицином. Спустя две недели после трансформации каллусы увеличивались в размере в 2,5-3 раза и достигали 0,5-1 см в диаметре. Несмотря на то, что большинство эксплантов продуцировали зеленый каллус на селективной среде, лишь на немногих из них наблюдали образование почек и побегов спустя три недели после трансформации. Большая часть эксплантов со временем становилась белой или бледно-зеленой и погибала, другая часть оставалась зеленой, способной к дальнейшему росту.

Поскольку рост на селективной среде является лишь опосредованным доказательством трансгенной природы полученных линий, нами был проведен молекулярно-биологический анализ отселектированных образцов с помощью ПЦР на наличие последовательности 35S-промотора CaMV. При амплификации с использованием специфических праймеров были получены фрагменты, соответствующие позитивному контролю (конструкции pVI121), тогда как при анализе ДНК контрольных растений, специфических фрагментов не наблюдали.

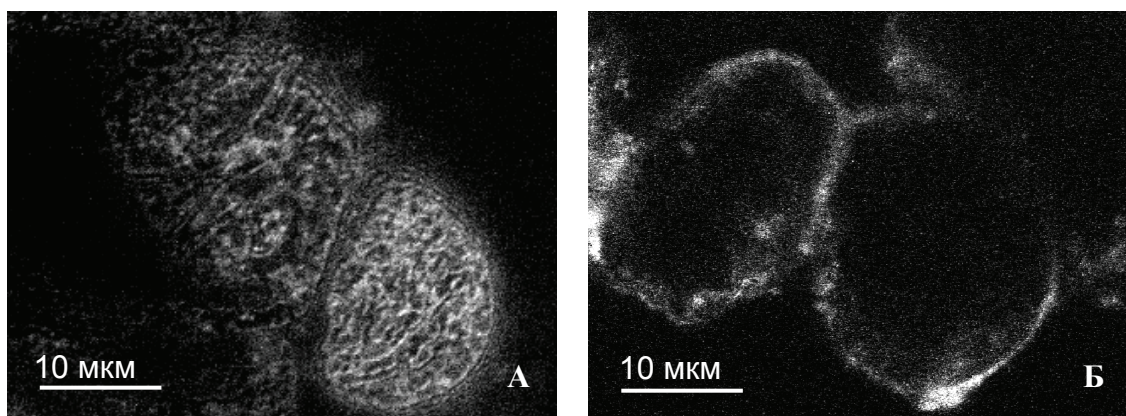


Рис.1. Визуализация микротрубочек в трансформированных клетках льна-долгунца сорта Глазур (А), Б – нетрансформированный контроль.

Визуализацию GFP-меченого тубулина в живых клетках отобранных трансгенных линий льна генотипов Глазур, Вита, Рушничок, Весна, Вручий осуществляли с помощью лазерной сканирующей конфокальной микроскопии. Как изображено на Рис. 1 химерный ген GFP-TUA6 успешно экспрессировался, кополимеризировался с эндогенным тубулином и участвовал в построении кортикальный микротрубочек в клетках трансформантов льна-долгунца (Рис.1). Ранее было также показано, что GFP-TUA6 успешно инкорпорируется в микротрубочки растительных клеток без видимого влияния на их организацию и динамику (Abe & Hashimoto, 2005;

Ueda et al., 1999; Vassileva et al., 2005). Более того, было продемонстрировано, что данный химерный ген способен экспрессироваться в разных типах тканей трансгенных растений (Ishida et al., 2007; Ueda et al., 1999).

Выводы

Результаты проведенных экспериментов демонстрируют успешную трансформацию генотипов льна-долгунца, характеризующихся различной устойчивостью к пролеганию, химерным геном GFP-TUA6. Экспрессия перенесенного гена в клетках трансформантов позволяет изучать особенности организации микротрубочек в клетках, что является огромным потенциалом для установления роли данной структуры в формировании механической устойчивости к полеганию у этих растений.

Работа была выполнена при поддержке Фонда фундаментальных исследований Украины, грант № 14.4/023 (2007-2008 р.р.).

Литература

Альбертс Б., Брей Д., Льюис Дж. Молекулярная биология клетки.- Мир.-1994-Т 3.- 504 с.

Баер О.А., Баер Г.Я., Емец А.И., Блюм Я.Б. Введение в культуру *in vitro* и регенерационная способность сортов льна-долгунца с различной устойчивостью к полеганию // Физиол. биохим. культ. растений. – 2004. - Т. 36, № 1. – С. 48-54.

Дрейпер Дж., Скотт Р., Армидж Ф., Уолден Р. / Генная инженерия растений. Лабораторное руководство.– М.: Мир, 1991. – 408 с.

Поляков А.В., Чиркизова О.Ф., Каляева М.А., Захарченко Н.С., Балохина Н.В., Бурьянов Я.И. Трансформация растений льна-долгунца // Физиол. растений. – 1998. – Т. 45, № 6. – С. 882-887.

Abe T., Hashimoto T. Altered microtubule dynamics by expression of modified α -tubulin protein causes right-handed helical growth in transgenic *Arabidopsis* plants // Plant J.- V. 43.- P.191-204.

Baskin T. I., Beemster G.T., Judy-March J.E., Marda F. Disorganization of cortical microtubules stimulates tangential expansion and reduces the uniformity of cellulose microfibril alignment among cells in the root of *Arabidopsis* // Plant Physiol.- 2004.-V. 135.- P. 2279-2290.

Baskin T. I. Anisotropic expansion of the plant cell wall // Annu. Rev. Cell Dev. Biol. – 2005. – V. 21.-P.203-222

Baskin T. I. On the alignment of cellulose microfibrils by cortical microtubules: a review and a model // Protoplasma.-2001. – V. 215. – P. 150-171.

Dong J.Z., McHughen A. Transgenic flax plants from *Agrobacterium tumefaciens* transformation – incidence of chimeric regenerants and inheritance of transgenic plants // Plant Sci. – 1993. – V. 91. – P. 139-148.

Giddings, T.H. and Staehelin, L.A. Microtubule-mediated control of microfibril deposition: a re-examination of the hypothesis // In The Cytoskeletal Basis of Plant Growth and Form. Edited by Lloyd, C.M. Academic Press, London. – 1991. – P. 85–99.

Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. – 1962. – V. 15. – P. 473-497.

Sugimoto, K., Williamson, R.E. and Wasteneys, G.O. Wall architecture in the cellulose-deficient *rsw1* mutant of *Arabidopsis thaliana*: microfibrils but not microtubules lose their transverse alignment before microfibrils become unrecognizable in the mitotic and elongation zones of roots // Protoplasma. – 2001.- V.215.- P. 172–183.

Ueda K., Matsuyama T., Hashimoto T. Visualisation of microtubules in living cells of transgenic *Arabidopsis thaliana* L. // Protoplasma.-1999.- V.206-P. 201-206.

Vassileva V.N., Kouchi H., Ridge R.W. Microtubule dynamics in living root hairs: transient slowing by lipochitin oligosaccharide nodulation signals // The Plant Cell.-2005.- 17.-P. 1777-1787

Whittington, A.T., Vugrek, O., Wei, K.J., Hasenbein, N.G., Sugimoto, K., Rashbrooke, M.C. and Wasteneys, G.O. MOR1 is essential for organizing cortical microtubules in plants // Nature. -2001. – V.411. – P. 610–613.

Williamson, R.E., Burn, J.E., Baskin, T.I., Arioli, T., Cork, A. Morphology of rsw1, a cellulose-*Arabidopsis thaliana* // Protoplasma. – 2001. – V. 215. – P. 116–127.

Резюме

Представлені результати по агробактеріальній трансформації різних сортів льону-довгунця з використанням конструкції, що містить химерний ген GFP-TUA6. Трансгенна природа отриманих ліній була підтверджена за допомогою ПЛР-аналізу. Показано, що GFP-мічений тубулін здатен успішно ко-полімеризуватися з ендogenous тубуліном і приймати участь у формуванні кортикальної сітки мікротрубочок в клітинах трансгенних ліній льону.

Представлены результаты по агробактериальной трансформации разных сортов льена-долгунца с использованием конструкции, несущей химерный ген GFP-TUA6. Трансгенная природа полученных линий была подтверждена с помощью ПЦР-анализа. Показано, что GFP-меченый тубулин успешно ко-полимеризуется с эндогенным тубулином и принимает участие в формировании кортикальной сетки микротрубочек в клетках трансгенных линий льна.

The results of *Agrobacterium*-mediated transformation of different flax cultivars by plasmid carrying chimeric GFP-TUA6 gene are presented in this study. Transgenic nature of obtained lines was confirmed by PCR analysis. It was shown that GFP labeled tubulin is capable to co-polymerize with endogenous cell tubulin and to participate in cortical microtubule network organization in transgenic flax cells.

ГОЛОВНЕВА Н.А.¹, ЩЕТКО В.А.¹, НАЙДЕНКО И.А.¹, ДЕНИСЕНКО В.В.¹, РЯБАЯ Н.Е.¹, КРАСОЧКО П.А.², ЛОМАКО Ю.В.²

¹Институт микробиологии НАН Беларуси, Беларусь, 220141, Минск, ул. Акад. Купревича, 2, e-mail: vental@yandex.ru

²РНИДУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелецкого», Беларусь, 220003, Минск, ул. Брикета, 28, e-mail: bievmt@tut.by

ИЗУЧЕНИЕ АНТАГОНИСТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ БИФИДО- И МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ В ОТНОШЕНИИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЙ МОЛОДНЯКА СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ

Актуальным направлением развития современной биотехнологии является разработка и применение в ветеринарной практике и медицине бактериальных препаратов-пробиотиков на основе микроорганизмов нормофлоры человека и животных, наиболее значимыми компонентами которой являются бифидо- и лактобактерии. Востребованность таких препаратов в настоящее время особенно возросла в связи с развитием множественной лекарственной резистентности и усилением факторов патогенности возбудителей различных заболеваний [1].

Антагонистическая активность нормофлоры по отношению к патогенным и условно патогенным бактериям является одним из основных критериев отбора штаммов бактерий для включения в состав пробиотических препаратов. Антимикробные взаимодействия оказывают влияние как на структуру микробиоценоза, т.е. на состав и разнообразие видов бактерий, так и на их функционирование. Изучение антагонистических свойств лакто- и бифидобактерий важно для характеристики

симбиотических отношений пробиотических микроорганизмов с организмом хозяина и с микроорганизмами других таксономических групп, что необходимо учитывать при создании многокомпонентных препаратов-пробиотиков.

Антимикробный эффект молочнокислых и бифидобактерий обусловлен комплексом их антагонистических свойств и определяется способностью ингибировать адгезию патогенных бактерий, а также продукцией таких метаболитов, как молочная кислота, перекись водорода, лизоцим, бактериоцины и др. [2 - 4]. Состав и активность секретлируемых метаболитов, продукция ферментов, витаминов, олигосахаридов и др. веществ существенно различаются в зависимости от родовых, видовых, штаммовых характеристик микроорганизмов-пробиотиков.

Целью работы был скрининг молочнокислых и бифидобактерий с высокой антагонистической активностью по отношению к возбудителям бактериальных инфекций сельскохозяйственных животных циркулирующих в хозяйствах Беларуси, исследование спектра антимикробного действия бесклеточной культуральной жидкости в условиях *in vitro*. Представляло также интерес изучение возможности применения препарата для коррекции микробиоценоза желудочно-кишечного тракта при болезнях молодняка сельскохозяйственных животных.

Материалы и методы

В качестве объектов исследования были использованы 45 штаммов бифидобактерий и молочнокислых бактерий родов *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus* из коллекции лаборатории молочнокислых и бифидобактерий Института микробиологии НАН Беларуси.

Культивирования бифидо- и молочнокислых бактерий проводили на стандартных питательных средах [5].

Для изучения антагонистической активности внеклеточных метаболитов использовали бесклеточную культуральную жидкость. Клетки отделяли центрифугированием при 10000g и 4°C в течение 20 мин. Полученный супернатант стерилизовали фильтрованием через мембраны с диаметром пор 0,2 мкм в стерильных условиях.

Антагонистическую активность молочнокислых и бифидобактерий по отношению к патогенным микроорганизмам определяли общепринятыми методами при культивировании тест-бактерий в агаризованных (метод диффузии в агар) питательных средах [6]. Об антагонистическом эффекте судили по величине зон подавления роста тест-организмов.

В качестве тест организмов использовали штаммы бактерий - возбудителей гастроэнтеритов крупного рогатого скота родов *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Proteus*, *Klebsiella*, и *E.coli*, циркулирующих в хозяйствах Беларуси.

Результаты и обсуждения

В результате проведенных экспериментов показано, что бесклеточная культуральная жидкость бифидо- и молочнокислых бактерий эффективно ингибируют рост патогенных штаммов. Наиболее выраженный антимикробный эффект оказывают метаболиты, продуцируемые штаммами *Bifidobacterium adolescentis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus rhamnosus* (таблица 1).

Таблица 1

Скрининг молочнокислых и бифидобактерий по антагонистической активности

Бактерии	Количество активных штаммов по отношению к патогенным микроорганизмам						
	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Staphylococcus sp.</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Streptococcus sp.</i>	<i>Pasteurella haemolytica</i>

<i>Enterococcus faecalis</i>	0	1	2	0	2	0	1
<i>Lactococcus sp.</i>	2	1	1	1	2	0	0
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	1	0	2	1	2	1	0
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	0	0	0	1	0	0	0
<i>Lactobacillus brevis</i>	2	3	2	2	4	2	1
<i>Lactobacillus buchneri</i>	1	0	3	2	4	1	0
<i>Lactobacillus plantarum</i>	5	6	8	4	8	4	2
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	2	2	2	1	2	1	0
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	6	5	6	6	6	5	2
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	3	2	3	2	2	1	1

Для дальнейшей работы были отобраны 3 штамма бифидобактерий относящихся к виду *Bifidobacterium adolescentis*, и 3 штамма молочнокислых бактерий видов *Lactobacillus plantarum* и *Lactococcus lactis*. Бесклеточную культуральную жидкость данных бактерий смешивали в различных комбинациях и изучали антагонистическую активность по отношению к патогенным микроорганизмам. Было установлено, что смешивание препаратов культуральной жидкости молочнокислых бактерий и бифидобактерий приводило к усилению антагонистического эффекта в 1.5 - 2 раза в зависимости от используемого тест-штамма. Наиболее эффективно подавляла рост патогенных штаммов микроорганизмов смесь бесклеточных культуральных жидкостей штаммов *Bifidobacterium adolescentis* и *Lactobacillus rhamnosus*.

На основе экспериментальных данных получен бесклеточный препарат, содержащий продукты метаболизма *B.adolescentis* и *L. rhamnosus*. Установлено, что бесклеточный препарат является непатогенным и безвредным для лабораторных животных, не обладает токсичностью, аллергенностью и токсигенными свойствами.

Исследована эффективность препарата бесклеточной культуральной жидкости, проявляющей антимикробную активность в условиях *in vitro*, для лечения желудочно-кишечных заболеваний телят. Эффективность препарата исследовалась на телятах возрастом 7-10 сут, больных гастроэнтеритами. В результате установлено, что после 2-3 кратного введения препарата у телят прекращались симптомы гастроэнтеритов, выздоровление наступало на второй день лечения. У телят контрольной группы болезнь продолжалась 4-6 дней. Анализ результатов проведенных испытаний показал, что бесклеточный препарат на основе метаболитов *B.adolescentis* и *L.rhamnosus* обладает высокой антагонистической активностью по отношению к патогенным бактериям, вызывающим гастроэнтериты у телят, и может использоваться для профилактики и лечения желудочно-кишечных заболеваний молодняка крупного рогатого скота.

Выводы

Таким образом, проведен скрининг бактерий - представителей нормальной микрофлоры, по антагонистической активности в отношении сапрофитных, условно патогенных, а также некоторых патогенных бактерий родов *Salmonella*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Pasterella* и патогенных серотипов *E. coli*. Показано, что препараты бесклеточной культуральной жидкости бифидо- и молочнокислых бактерий эффективно ингибируют рост патогенных штаммов. Наиболее выраженный антимикробный эффект оказывают метаболиты, продуцируемые штаммами *Lactobacillus rhamnosus* и *Bifidobacterium adolescentis*. Препарат, содержащий продукты метаболизма штаммов *B.adolescentis* и *L. rhamnosus*, эффективно подавляет рост бактерий, вызывающих гастроэнтериты у телят, перспективен для профилактики и лечения желудочно-кишечных заболеваний молодняка сельскохозяйственных животных.

Литература

1. Малик Н. И., Панин А. И. Ветеринарные пробиотические препараты // Ветеринария. -2001. - №1.- С. 46-51.
2. Holzapfel W.H., Haberer P., Geisen R., Björkroth J., Schillinger U. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition // Am. J. Clin. Nutr. 2001. V. 73. P. 365-373.
3. Drakes M., Blanchard T., Czinn S. Bacterial probiotic modulation of dendritic cells // Infect Immun. 2004.- V.72, N 6.- P. 3299-3309.
4. Астапович Н.И, Головнева Н.А., Щетко В.А., Кондратьева Л.В., Грель М.В. К механизму антимикробной активности бифидобактерий / Н.И. Астапович [и др.] // Доклады НАН Беларуси – 2004. – Т. 48, №4. – С. 57 – 61.
5. Man J.C., Rogosa M., Sharpe M.E. A medium for the cultivation of *Lactobacilli* // J. Appl. Bacteriol.- 1960.- Vol.23, N1.- P. 30-135.
6. Егоров Н.С. Микробы-антагонисты и биологические методы определения антибиотической активности. – М.: Высшая школа, 1965, 211 с.

Резюме

Исследована антагонистическая активность бифидо- и молочнокислых бактерий по отношению к возбудителям бактериальных инфекций сельскохозяйственных животных. Отобраны штаммы для создания комплексного бесклеточного препарата, для коррекции микробиоценоза желудочно-кишечного тракта при болезнях молодняка сельскохозяйственных животных.

Досліджена антагоністична активність біфідо- і молочнокислих бактерій по відношенню до збудників бактерійних інфекцій сільськогосподарських тварин. Відібрані штами для створення комплексного бесклеточного препарату, для корекції мікробіоценозу шлунково-кишкового тракту при хворобах молодняка сільськогосподарських тварин.

Antagonistic activity of bifido- and lactic acid bacteria against causative agent of bacterial infection of farm livestock was investigated. Strains for complex cell-free drug for correction of gastrointestinal tract's microbiocenosis of farm animals were selected.

ДЕНИСЕНКО В.В., НАЙДЕНКО И.А.

Институт микробиологии НАН Беларуси

Беларусь, 220141, Минск, ул. акад. Купревича, 2, e-mail: naidenko@mbio.bas-net.by

ВЛИЯНИЕ ИСТОЧНИКА УГЛЕРОДА В СРЕДЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НА ПРОДУКЦИЮ ЭКЗОПОЛИСАХАРИДОВ *LACTOBACILLUS SP.*

Молочнокислые бактерии широко используются в разных отраслях народного хозяйства, в частности в медицине и ветеринарии для создания препаратов пробиотического действия. Биологическая активность этих микроорганизмов в значительной степени связана с продуктами метаболизма, в том числе внеклеточными полисахаридами. Благодаря своим реологическим свойствам экзополисахариды молочнокислых бактерий традиционно используются в пищевой промышленности в качестве загустителей, стабилизаторов консистенции [1]. Установлена противоопухолевая, иммуномодулирующая активность [2,3], а также пребиотические свойства [4] этих соединений.

Физиологическая роль внеклеточных полисахаридов молочнокислых бактерий до конца не установлена. В литературе имеются данные о том, что экзополисахариды повышают выживаемость клеток в условиях температурного стресса [5], снижают чувствительность бактерий к бактериоцинам и бактериофагам [6], стимулируют

адгезию микроорганизмов к биологическим поверхностям и, таким образом, способствуют колонизации различных экологических ниш.

Экзополисахариды, продуцируемые молочнокислыми бактериями, могут прикрепляться к поверхности клетки (капсульные полисахариды) или секретироваться в окружающую среду. По составу их можно разделить на две группы: гомополисахариды (состоят из одного типа моносахарида) и гетерополисахариды (состоят из нескольких типов моносахаридов). Гетерополисахариды молочнокислых бактерий обычно состоят из повторяющихся единиц длиной до 8 остатков. Длина полисахаридной цепочки и степень ветвления могут сильно варьировать у разных штаммов. Реологические свойства и биологическая активность полисахаридов зависят от их мономерного состава, количества боковых цепей, длины цепи и заряда, а также аномерной конфигурации моносахаридов и последовательности, в которой они расположены.

Цель настоящей работы – подобрать условия экстракции и изучить продукцию внеклеточных полисахаридов молочнокислыми бактериями, выращенными на средах с разными источниками сбраживаемого углевода.

Объектом исследования служил образующий слизь штамм *Lactobacillus sp.*, ранее отобранный нами как перспективный для включения в состав препарата пробиотического действия для сельскохозяйственных животных.

Глубинное культивирование молочнокислых бактерий проводили при 28⁰С на стандартной среде MRS [7], а также модифицированной среде, содержащей сахарозу или лактозу в концентрации 7,5%. Клетки осаждали центрифугированием в течение 20 мин при 11 тыс. об./мин. Для осаждения секретированных в среду культивирования полисахаридов супернатант обрабатывали этанолом в разных концентрациях. Экстракцию капсульных полисахаридов с поверхности клеток проводили согласно методике, описанной Cheirsilp с соавторами [8]. Содержание полисахаридов в экстрактах оценивали с использованием антронового метода [9], содержание белка – по Bradford [10].

Установлено, что повышение pH бесклеточного супернатанта перед экстракцией приводило к незначительному увеличению количества осаждаемого полисахарида (Рис.1, А). Содержание примесного белка также увеличивалось.

Повышение соотношения этанола и бесклеточного центрифугата с 1:1 до 2:1 при экстракции привело к увеличению количества осажденных полисахаридов в 1,8 раза, однако при этом в осадке несколько повышалось содержание примеси белка (Рис.1, Б).

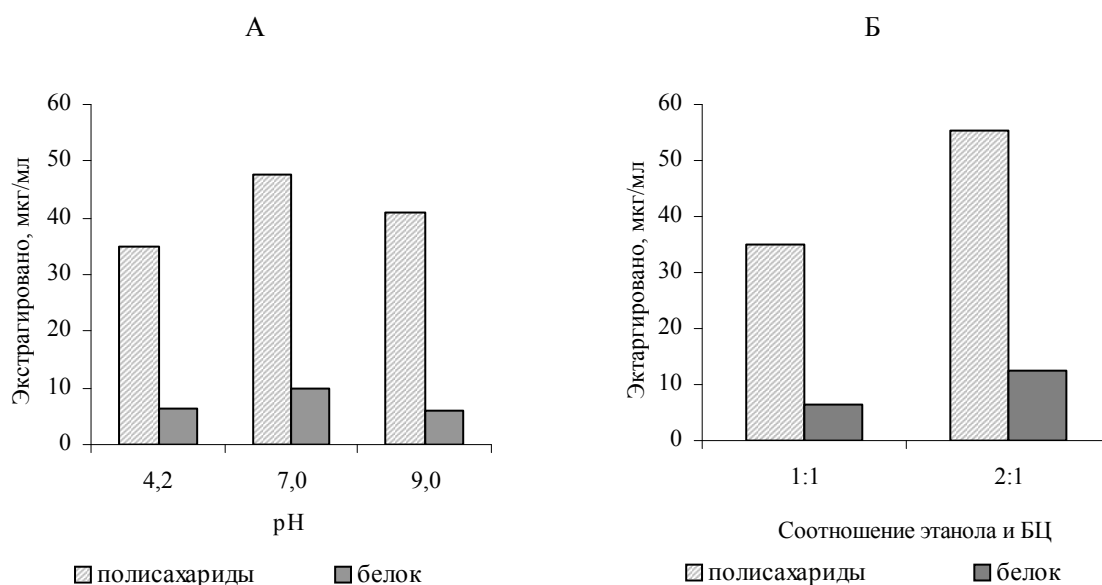


Рисунок 1. Влияние pH (А) и соотношения объемов этанола и бесклеточного центрифугата (БЦ) (Б) на количество выделяемых экзополисахаридов

Для дальнейших исследований использовали метод экстракции полисахаридов двойным объемом этанола при pH 4,2.

Выявлено, что при культивировании на стандартной среде MRS, молочнокислые бактерии *Lactobacillus sp.* продуцировали около 150 мкг секретируемых полисахаридов в 1 мл культуральной жидкости. Незначительное увеличение продукции полисахаридов (в 1,1- 1,3 раза) было отмечено на средах с повышенным содержанием сахарозы и лактозы (Рис. 2). Содержание примеси белка в экстрактах во всех вариантах не превышало 8 мкг/мл.

Показано, что в контрольном варианте количество связанных с поверхностью клетки капсульных полисахаридов было значительно ниже, чем содержание секретируемых, и не превышало 50-52 мкг/мл. На средах с 7,5 % сахарозы и лактозы происходило значительное увеличение содержания капсульных полисахаридов (в 2,5 и 2,4 раза соответственно) (Рис.2). Белок в экстрактах капсульных полисахаридов обнаружен в следовых количествах.

Проведенные исследования позволили подобрать условия экстракции внеклеточных полисахаридов у молочнокислых бактерий *Lactobacillus sp.* и сделать вывод о том, что повышенное содержание сахарозы и лактозы в питательной среде стимулировало накопление капсульных полисахаридов при незначительном влиянии на продукцию секретируемых экзополисахаридов в культуральной жидкости исследуемых лактобацилл.

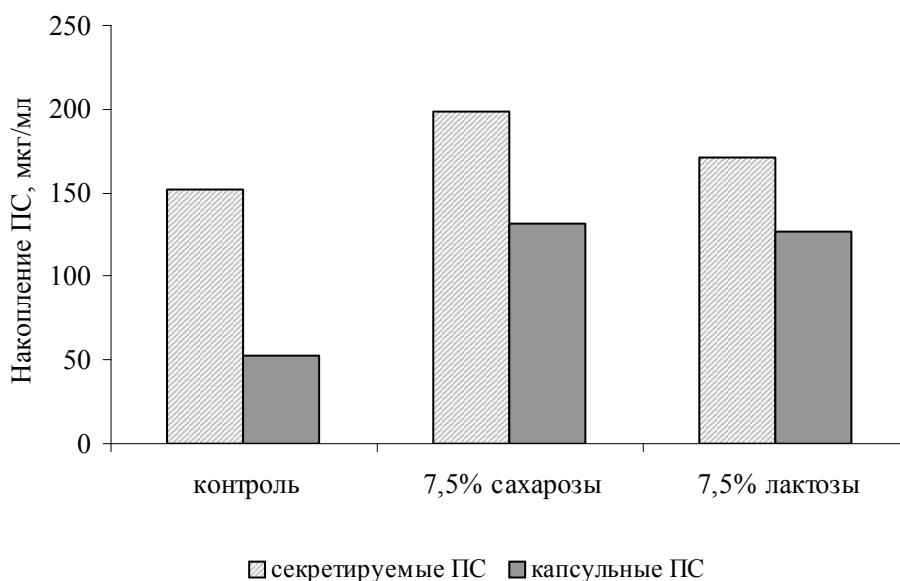


Рисунок 2. Влияние источника углерода в среде культивирования на накопление секретируемых и капсульных полисахаридов (ПС) бактериями *Lactobacillus sp.*

Полученные данные будут использованы при разработке технологии производства препарата-пробиотика для ветеринарии.

Литература

1. Ruas-Madiedo P., Hugenholtz J., Zoon P. An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria // Int. Dairy J.- 2002.- vol.12, № 2-3.- P.163-171.

2. Vinderola G., et al. Effect of the oral administration of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* on the gut mucosal immunity // Cytokine.- 2006.- vol. 36, № 5-6.- P.254-260.
3. Chabot S., et al. Exopolysaccharides from *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M stimulate TNF, IL-6 and IL-12 in human and mouse cultured immunocompetent cells, and INF- γ in mouse splenocytes // Lait.- 2001.- vol. 81.- P.683-697.
4. Korakli M., Ganzle M.G., Vogel R.F. Metabolism by bifidobacteria and lactic acid bacteria of polysaccharides from wheat and rye, and exopolysaccharides produced by *Lactobacillus sanfranciscensis* // J. Appl. Microb. -2002. – vol. 92. – P. 958-965.
5. Hong S.H., Marshall R.T. Natural exopolysaccharides enhance survival of lactic acid bacteria in frozen dairy desserts // J. Dairy Sci.- 2001.- vol. 84.- P.1367-1374
6. Durlu-Özkaya F., Aslim B., Ozkaya M.T. Effect of exopolysaccharides (EPSs) produced by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strains to bacteriophage and nisin sensitivity of the bacteria // Food Sci. Tech.- 2007.- vol. 40, № 3.- P.564-568.
7. Man J.C., Rogosa M., Sharpe M.E. A medium for the cultivation of Lactobacilli // J. Appl. Bacteriol. - 1960. - vol. 23, № 1. - P.130-135.
8. Cheirsilp B., et al. Interaction between *Lactobacillus kefiranofaciens* and *Saccharomyces cerevisiae* in mixed culture for kefiran production // J. Biosci. Bioengin. - 2003.- vol. 96, № 3.- P.279-284.
9. Томпсон А., Вольфром М.Л. Методы химии углеводов. - М., Мир. - 1967. - 512с.
10. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Analytical. Biochem.- 1976.- vol. 72, № 1.- P.248-254.

Резюме

Изучено влияние повышенного содержания сахарозы и лактозы в среде культивирования на продукцию экзополисахаридов бактериями *Lactobacillus sp.*, отобранными для включения в состав препарата пробиотического действия для сельскохозяйственных животных.

Вивчений вплив підвищеного вмісту сахарози і лактози в середовищі культивування на продукцію екзополісахаридів бактеріями *Lactobacillus sp.*, відібраними для включення до складу препарату пробіотичеського дії для сільськогосподарських тварин.

Effect of increased level of sucrose and lactose in the culture medium on production of exopolysaccharides by selected for probiotic preparations *Lactobacillus sp.* was studied.

ДМИТРУК О.В., ДМИТРУК К.В., ВОРОНОВСЬКИЙ А.Я., СИБІРНИЙ А.А.

Інститут біології клітини НАН України, відділ молекулярної генетики і біотехнології, Україна, 79005, Львів, вул. Драгоманова 14/16, e-mail: verba@cellbiol.lviv.ua

ЗМІНА КОФАКТОРНОЇ СПОРІДНЕНОСТІ КСИЛОЗОРЕДУКТАЗИ ТА ПОСИЛЕННЯ ЕКСПРЕСІЇ КСИЛИТОЛДЕГІДРОГЕНАЗИ ПОКРАЩУЄ АЛКОГОЛЬНУ ФЕРМЕНТАЦІЮ КСИЛОЗИ У ТЕРМОТОЛЕРАНТНИХ ДРІЖДЖІВ *HANSENULA POLYMORPHA*

Рослинна біомаса має величезний потенціал як сировина для виробництва біопалива, зокрема, паливного етанолу. Основними складовими рослинної біомаси є глюкоза та п'ятиуглецевий цукор ксилоза. Досягти економічно вигідної ферментації ксилози можна, забезпечивши ефективність початкових етапів метаболізму цієї

пентози, котрі визначають і ефективність алкогольної ферментації в цілому. У ксилозоферментуючих дріжджів на перших етапах метаболізму цього цукру задіяні два фермента, що належать до класу оксидоредуктаз, НАДФН-залежна ксилозоредуктаза (КР) (ЕС 1.1.1.21.) і НАД-залежна ксилітолдегідрогеназа (КДГ) (ЕС 1.1.1.9.). Оскільки КР використовує в якості кофактора переважно НАДФН, а КДГ – НАД, то це призводить до виникнення дисбалансу нікотинамідних коферментів у клітині, що в свою чергу призводить до формування побічного продукту – ксиліту, замість етанолу.

Для підвищення рівня ферментації ксилози до етанолу у нашій лабораторії за допомогою сайт-специфічного мутагенезу було сконструйовано модифіковану форму КР *H. polymorpha* зі зміненою кофакторною спорідненістю. Для цього лізин в положенні 341 було замінено на аргінін, а аспарагін в положенні 343 - на аспарагінову кислоту. Було отримано рекомбінантні штами *H. polymorpha*, що надекспресують нативну та модифіковану форми КР у поєднанні з КДГ. Штами, які містили модифіковану КР характеризувалися зменшенням нагромадження ксиліту в середовищі та підвищенням виходу етанолу при ферментації ксилози.

Матеріали і методи

Штами мікроорганізмів та поживні середовища. У роботі використовували штам *H. polymorpha* CBS4732 *leu2-2*. Дріжджі вирощувалися на багатому середовищі YPD (0,5% дріжджовий екстракт, 1% пептон, 2% глюкоза) або на мінімальному середовищі YNB (0,67% YNB (Yeast Nitrogen Base), 4% ксилоза або 2% глюкоза) при 37°C. Для забезпечення росту ауксотрофних мутантів до мінімального середовища додавався лейцин у концентрації 40 мг/мл.

Бактерійний штам *E. coli* DH5 α (Φ 80 d lacZ Δ M15, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17*(r_K^- , m_K^+), *supE44*, *relA1*, *deoR*, Δ (*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 50 мг/мл і зеоцин у концентрації 150 мг/л.

В роботі були використані стандартні молекулярно-генетичні методи (Sambrook *et al.*, 1989). Геномну ДНК *H. polymorpha* виділяли за допомогою Wizard[®] Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA). Ендонуклеази рестрикції і лігазу використовувалися згідно з інструкцією виробника (Fermentas, Vilnius, Lithuania). Виділення плазмідної ДНК з бактерій *E. coli* проводили за допомогою Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega, Madison, WI, USA). Полімеразні ланцюгові реакції (ПЛР) проводили на ампліфікаторі GeneAmp[®] PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) з використанням Platinum[®] Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) згідно з інструкцією виробника. Трансформацію дріжджів *H. polymorpha* проводили методом електропорації (Faber *et al.*, 1994).

Для визначення рівня алкогольної ферментації ксилози клітини дріжджів нарощували в багатому середовищі YPX (1% дріжджовий екстракт, 2% пептон, 4% ксилоза) протягом двох діб. Біомасу (2 мг/мл клітин) переносили на мінімальне середовище YNB з 8% ксилози. Ферментацію проводили при температурах 37°C і 48°C за умов обмеженої аерації (140 обертів/хв.). Концентрацію етанолу в середовищі визначали за допомогою стандартного набору “Алкотест” (Gonchar *et al.*, 2001).

Результати і обговорення

2.1. Конструювання модифікованої КР *H. polymorpha* за допомогою методу сайт-специфічного мутагенезу. За допомогою методу сайт-специфічного мутагенезу в гені, що кодує КР *H. polymorpha* лізин в положенні 341 було замінено на аргінін, а аспарагін в положенні 343 - на аспарагінову кислоту. Для цього фрагменти величиною 1,044 т.п.н. і 0,166 т.п.н. було ПЛР ампліфіковано з геномної ДНК *H. polymorpha* використовуючи праймери HpX1for (CCC AAG CTT ATG CAC ACG CAG ATT AGC AAA AAT CTT G)/HpX1Mrev (CAG TCT CTC CTT TTG GTC GGA CCT TGG AAT

GAC CAA GAT G) і HpX1Mfor (CAT CTT GGT CAT TCC AAG GTC CGA CCA AAA GGA GAG ACT G) і HpX1rev (CGC AAG CTT TTA GAT AAA GGT TGG AAT TTC GTT CCA GGT CC) відповідно. В праймери HpX1Mfor і HpX1Mrev попередньо були внесені нуклеотидні заміни. Використовуючи одержані ПЛР продукти як матриці, за допомогою праймерів HpX1for і HpX1rev було одержано ПЛР продукт величиною 1,170 т.п.н., що являє собою модифіковану КР (ORF *XYL1-M*). Коректність замін нуклеотидів *XYL1-M* було перевірено секвенуванням.

2.2. Конструювання плазмід рX1N-Z і рX1M-Z. Плазмиди рX1N і рX1M були сконструйовані на основі плазмиди рUC57. На початку роботи з плазмиди рUC57 було видалено сайти рестрикції *NdeI* і *HindIII* шляхом лінеаризації цими рестриктазами з наступним затупленням Т4-ДНК-полімеразою і самолігуванням. Одержана плазміда отримала назву рUC57(-H-Nd). Конструкцію, що містить промотор *HpGAP* і термінатор *HpAOX* було отримано із плазмиди рKO8-GAPrg шляхом обробки рестриктазами *BamHI* і *SacI* та напрямлено клоновано в плазмиду рUC57(-H-Nd), отримана конструкція одержала назву рUC57(-H-Nd)-GAPrg-AOXtr. З плазмиди рUC57(-H-Nd)-GAPrg-AOXtr було видалено сайти рестрикції *NdeI* і *NotI*. ORF *XYL1-N* і ORF *XYL1-M* було ПЛР ампліфіковано із геномної ДНК CBS4732 *leu2-2*, оброблено ендонуклеазою рестрикції *HindIII* і клоновано у *HindIII*-лінеаризовану і дефосфорильовану плазмиду рUC57(-H-Nd)-GAPrg-AOXtr(-Nt-Nd), отримані конструкції назвали рX1N і рX1M. Фрагмент величиною 1,2 т.п.н., що несе ген резистентності до зеоцину було ПЛР ампліфіковано із плазмиди рPICZB (Invitrogen) використовуючи праймери Ko58 (CGG GGT ACC TG CAG ATA ACT TCG TAT AGC ATA C) і Ko59 (CGG GGT ACC TG CAG TAA TTC GCT TCG GAT AAC), оброблено рестриктазою *PstI* і клоновано у *PstI*-лінеаризовані і дефосфорильовані плазмиди рX1N і рX1M. Таким чином було сконструйовано плазмиди рX1N-Z і рX1M-Z, що містять ORF *XYL1-N* і ORF *XYL1-M*, відповідно, під контролем промотора гена *HpGAP*.

2.3. Конструювання плазмід рX1N-Z-X2 і рX1M-Z-X2. Промотор *HpGAP* було ПЛР-ампліфіковано із геномної ДНК CBS4732 *leu2-2* використовуючи праймери L1 (CTC GGA TCC CAA TTA TCA TTA ATA ATC) і Ko135 (CAG CAG AAG GAT TGT TCA TTT TGT TTC TAT ATT ATC). Фрагмент, що містить ORF *XYL2-A* і термінатор гена *XYL2-A* було ПЛР-ампліфіковано із геномної ДНК CBS4732 *leu2-2* використовуючи праймери Ko134 (GAT AAT ATA GAA ACA AAA TGA ACA ATC CTT CTG CTG) і Ko133 (ACA GGA TCC ATC CAT GAG AAA CG). За допомогою ПЛР, що перекривається, використовуючи праймери L1 і Ko133 було отримано фрагмент *HpGAP-XYL2-A*. Для проведення цієї ПЛР було одночасно використано дві матриці, отримані в попередніх реакціях (*HpGAP* і ORF *XYL2-A*). ПЛР-продукт *HpGAP-XYL2-A* було оброблено рестриктазою *BamHI* і клоновано у *BamHI*-лінеаризовані і дефосфорильовані плазмиди рX1N-Z і рX1M-Z. Таким чином було одержано конструкції рX1N-Z-X2 і рX1M-Z-X2, що містять ген *XYL1-N* або *XYL1-M* і ген *XYL2-A* під контролем промотора *HpGAP*.

2.4. Отримання штамів *H. polymorpha*, що містять гени *XYL1-N/XYL1-M* або *XYL1-N/XYL1-M* і *XYL2-A* під контролем промотора *HpGAP*. Штами що несуть гени *XYL1-N/XYL1-M* або *XYL1-N/XYL1-M* та *XYL2-A* було одержано шляхом трансформації вихідного штама *Δxyl1* (Voronovsky *et al.*, 2006) плазмидами рX1N-Z/рX1M-Z або рX1N-Z-X2/рX1M-Z-X2, попередньо лінеаризованими рестриктазою *SacI*. Після трансформації клітини висівали на селективне середовище YPD з зеоцином (150 мкг/мл). Колонії здатні рости на селективному середовищі з'являлися після 3 днів інкубації з частотою 20 трансформантів на 1 мкг ДНК. Наявність в одержаних трансформантів ORF *XYL1-N/XYL1-M* і/або ORF *XYL2-A* під контролем промотора *HpGAP*, а також гена резистентності до зеоцину була підтверджена за допомогою ПЛР.

2.5. Визначення спорідненості КР до нікотинамідних кофакторів та активності КДГ. Для визначення спорідненості нативної і модифікованої КР до

кофакторів (НАДН і НАД(Ф)Н) рекомбінантні штами вирощували в середовищі YNB з 4% ксилозою протягом двох діб. Активність КР визначали у безклітинних екстрактах, використовуючи чотири різні концентрації кофакторів. Було показано, що спорідненість модифікованої КР до НАД(Ф)Н зменшилася приблизно в 17 рази порівняно з нативною КР, тоді як спорідненість до НАДН залишилась практично незмінною. Рекомбінантні штами з надекспресією КДГ характеризувалися підвищенням активності цього фермента в 2-2.1 рази (табл. 1).

Таблиця 1

Вихід етанолу, кількість ксиліту та активності КР і КДГ у штамів *H. polymorpha*

Штам	Етанол, г/л	Ксиліт, г/л	Активність U/мг білка		
			КР		КДГ
			НАДРН/К _М (μМ)	НАДН/К _М (μМ)	
<i>XYLI-N</i>	0,153	0,087	0,091/9	0,016/100	0,551
<i>XYLI-M</i>	0,237	0,077	0,019/152	0,014/112	0,504
<i>XYLI-N+XYL2</i>	0,288	0,074			1,3
<i>XYLI-M+XYL2</i>	0,442	0,038			1,485
CBS4732 <i>leu2-2</i>	0,181	0,102	0,034/7	0,012/85	0,697

2.6. Визначення рівня алкогольної ферментації ксилози та кількості ксиліту у рекомбінантних штамів *H. polymorpha*. Рівень алкогольної ферментації ксилози у штамів, в яких було надекспресовано модифіковану КР підвищився в 1,3 рази порівняно з CBS4732 *leu2-2*. У штамів, які окрім модифікованої КР надекспресували ще й КДГ, вихід етанолу підвищився в 2,4 рази в порівнянні з CBS4732 *leu2-2* (табл. 1). Завдяки зміні кофакторної специфічності КР кількість ксиліту у штамів з надекспресією модифікованої КР та КДГ зменшився приблизно в 2.6 рази в порівнянні зі штамом дикого типу CBS4732 *leu2-2* (табл. 1).

Висновки

В результаті проведеної роботи було сконструйовано рекомбінантні штами *H. polymorpha*, які надекспресують нативну та модифіковану форми КР і ксилітолдегідрогеназу. Було показано, що у штамів, які надекспресують модифіковану КР рівень формування ксиліту зменшився приблизно в 1,3-2 рази порівняно з вихідним штамом CBS4732 *leu2-2*; в рекомбінантних штамів, що надекспресують КР зі зміненою кофакторною специфічністю, а також власну КДГ рівень алкогольної ферментації ксилози підвищився в 2,4 рази в порівнянні з CBS4732 *leu2-2*.

Література

1. Gonchar MV, Maidan MM, Sibirny AA (2001) A new oxidase-peroxidase kit "Alcotest" for ethanol assays in alcoholic beverages. Food Technol Biotechnol 39: 37–42.
2. Sambrook J, Fritsh EF, Maniatis T (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
3. Voronovsky AY, Ryabova OB, Verba OB, Ischuk OP, Dmytruk KV, Sibirny AA. Expression of *xylA* genes encoding xylose isomerases from *Escherichia coli* and *Streptomyces coelicolor* in the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. FEMS Yeast Res 2005; 5:1055-62.

Резюме

Для підвищення рівня ферментації ксилози до етанолу в інституті біології клітини НАН України було сконструйовано рекомбінантні штами *H. polymorpha*, які надекспресують нативну та модифіковану форми КР у поєднанні з КДГ. Штами, які містили модифіковану КР характеризувалися зменшенням кількості ксиліту і підвищенням виходу етанолу при алкогольній ферментації ксилози.

Для улучшения уровня алкогольной ферментации ксилозы в институте биологии клетки НАН Украины были сконструированы рекомбинантные штаммы *H. polymorpha* с усиленной экспрессией нативной и модифицированной форм КР в сочетании с КДГ. Штаммы с модифицированной формой КР характеризовались уменьшением количества ксилита и повышением выхода этанола при алкогольной ферментации ксилозы.

To improve the level of xylose fermentation to ethanol the recombinant strains with overexpression of native and mutated versions of XR together with the native XDH were constructed in the Institute of cell biology the NAS of Ukraine. The strains which overexpressed of mutated XR possessed decreased amount of xylitol formation and increased level of ethanol during xylose fermentation.

ЕГОРОВА А.В.

Одесская национальная академия пищевых технологий

Украина, 65039, Одесса, ул. Канатная, 112, e-mail: bogdan@onaft.odessa.ua

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПРИЕМЫ ПОЛУЧЕНИЯ БЕЗЛАКТОЗНОГО ЗЕРНОВОГО ПРОДУКТА

Биотехнологические методы находят все большее применение при производстве пищевых продуктов, особенно продуктов специального назначения. Так, например, из-за возрастающего распространения непереносимости лактозы в последнее время возросло производство аналогов кисломолочных продуктов. К преимуществам таких продуктов в первую очередь относят отсутствие лактозы, молочных белков и жиров, доступность сырьевых ресурсов. В качестве основных компонентов используют растительное сырье, например, соевые белковые изоляты, модифицированный крахмал и др. Однако такие технологии отличаются сложностью и высокой стоимостью конечных продуктов.

Цель данной работы заключалась в разработке биотехнологических основ получения аналога кисломолочного продукта на основе зерна ячменя.

Материалы и методы

Исследования проводили с использованием свежеразмолотого шелушенного зерна ячменя. Вначале проводили ферментативный гидролиз в течение 3600 с при pH 5,9 – 6,0. Концентрация ферментного препарата амилосубтилина Г10х составляла 0,1 %, гидромодуль – 1 : 6, температура среды 65 – 70 °С. Эффективность подготовки субстратов оценивали по накоплению клеток молочнокислых бактерий *Lactobacillus acidophilus*, которые культивировали на протяжении 24 ч при температуре 40 °С.

Результаты и обсуждение

В ходе предварительных исследований пробных посевов *Lactobacillus acidophilus* и бифидобактерий в ферментализат ячменя было установлено, что зерновой гидролизат ячменя представляет собой достаточно питательную среду для культивирования этих бактерий. Однако количество клеток было меньшим, чем при использовании молочной питательной среды. Нами были проведены исследования по усовершенствованию условий культивирования микроорганизмов с целью получения максимально обогащенного ими пищевого продукта. Эффективность процесса культивирования микроорганизмов оценивали по количеству клеток или по накоплению биомассы (по изменению оптической плотности культуральной жидкости). Продолжительность культивирования составляла 72 ч. Кривая роста имела четко выраженную лаг-фазу (I), которая характеризуется практически полным отсутствием роста, логарифмическую или экспоненциальную фазу (II), в которой наблюдается

максимальная скорость роста числа клеток бактерий, фазу замедленного роста (III) и стационарную фазу (IV). Во II-й фазе роста количество клеток молочнокислых бактерий возрастает по экспоненциальной зависимости:

$$C = 0,10 * e^{0,23*t}$$

где C – количество клеток бактерий, выросших за время культивирования t .

Коэффициент 0,23 представляет собой не что иное, как удельную скорость роста m , зная которую можно определить другую характеристику роста культуры – время генерации, время за которое биомасса культуры возрастает в два раза:

$$g = \lg_2 / m = 0,69 / 0,23 = 3 \text{ ч.}$$

Т.е. время генерации клеток *Lactobacillus acidophilus* на питательной среде из ячменного гидролизата составляет 3 ч.

Нами было установлено, что наиболее перспективно на ячменном гидролизате использовать симбиотическую закваску, состоящую из клеток культур *Lactobacillus acidophilus* и *Bifidobacterium adolescentis*. Однако одновременный высев этих культур в питательную среду не позволяет получать продукт с высоким содержанием клеток ($1,1 - 1,4 * 10^8$ кл/мл). В связи с этим были проведены эксперименты по определению порядка внесения заквасок. Было установлено, что внесение закваски *Bifidobacterium adolescentis* после выращивания клеток *Lactobacillus acidophilus* не эффективно, так как приводило к угнетению роста молочнокислых бактерий.

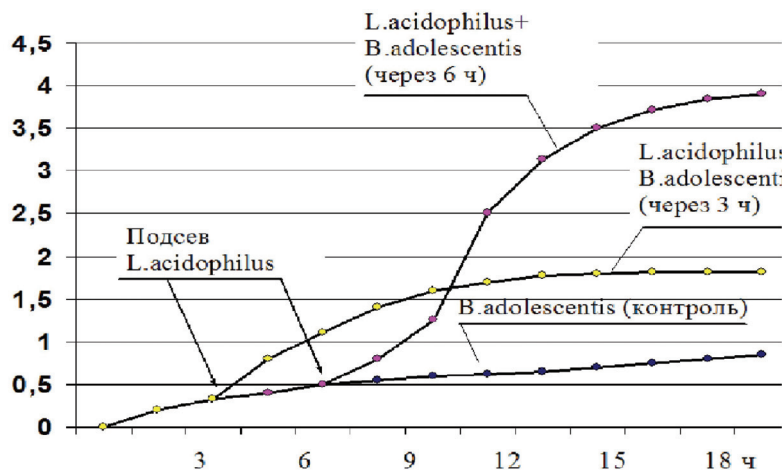


Рис. Динамика накопления биомассы бифидо- и лактобактерий при различной последовательности посева заквасок

Предварительное внесение закваски *Bifidobacterium adolescentis* стимулирует рост клеток *Lactobacillus acidophilus*. Было установлено, что оптимальным временем внесения закваски *Lactobacillus acidophilus* является 6 ч после начала культивирования на ячменном гидролизате закваски *Bifidobacterium adolescentis* (рис). Анализ углеводного состава ферментализата зерна ячменя и конечного продукта показал, что во время роста бактерии *L. acidophilus* и *B. adolescentis* использовали D-фруктозу, D-L-глюкозу и β -L-глюкозу.

В результате такого сочетания заквасок и ячменного гидролизата в качестве питательной среды был получен безлактозный кисломолочный продукт, сквашенный бифидо- и молочнокислыми бактериями. Изучение свойств этого продукта показало, что он обладает высокой пищевой ценностью и схож по своему составу с натуральными кисломолочными продуктами, полученными на молочной основе. Так, полученный продукт содержит 12,0 % сухих веществ, а в расчете на сухое вещество содержит 4,2 % сырого протеина, 1,7 % жира, 63,8 % углеводов, 2,9 % минеральных веществ. По содержанию витаминов новый продукт не уступает существующим аналогам. Так, содержание витамина B_1 составляет 16,0 мг/г, витамина B_2 – 18,0 мг/г, витамина PP – 280 мг/г.

Выводы

Получен аналог кисломолочного продукта на основе зерна ячменя путем приготовления на его основе ферментативного гидролизата, поочередного (с интервалом 6 ч) высева заквасок *Bifidum adolescentis* и *Lactobacillus acidophilus* и культивирования в течение 20 ч.

Литература

1. *Капрельяну Л.В., Киселев С.В.* Функциональная пища из зерновых// Пищевая промышленность, 1999. - №7. – С. 40-42.
2. *Капрельяну Л.В., Йоргачова К.Г.* Функціональні продукти. – Одеса.: Друк, 2003. – 312 с.
3. *Красникова Л.В. и др.* Бифидобактерии и использование их в молочной промышленности//Л.В.Красникова, И.В.Салахова, В.И.Шаробайко, Т.М.Эрвольдер //АгроНИИТЭИ мясомолпрома. – 1991. – 342 с.
4. *Егорова А.В.* разработка технологии производства безлактозного зернового продукта: Автореф. дис....канд.техн.наук. – Одесса, 1996. – 24 с.

Резюме

Разработаны биотехнологические основы производства безлактозного зернового продукта путем ферментативного гидролиза шелушенного зерна ячменя, высева и культивирования заквасок *Bifidum adolescentis* и *Lactobacillus acidophilus*.

Розроблено біотехнологічні основи виробництва безлактозного зернового продукту шляхом ферментативного гідролізу лущеного зерна ячменю, висіву і культивування заквасок *Bifidum adolescentis* и *Lactobacillus acidophilus*.

They had been elaborating the biotecnology basis of processing of a lactose's free grain product by fermentative hydrolysis of grain and cultivating of *Bifidum adolescentis* и *Lactobacillus acidophilus*.

СМЕЦЬ А.І., ПАХОМОВ О.В., РАДЧУК В.В., БЛЮМ Я.Б.

*Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України
вул. акад. Заболотного, 148, 03680, Київ, Україна, e-mail: alyemets@univ.kiev.ua*

БІОЛІСТИЧНА ТРАНСФОРМАЦІЯ СОЇ *Glycine max* (L.) ГЕНОМ СТІЙКОСТІ ДО ДІНІТРОАНІЛІНОВИХ ГЕРБІЦИДІВ

Соя є однією з найважливіших сільськогосподарських культур у світі завдяки високому вмісту висоякісного по амінокислотному складу рослинного білку, подібного до тваринного, який в середньому складає близько 40% від маси насіння, а у деяких сортів сягає 67,5%. Більш того, соя цінна тим, що її насіння містить приблизно 23% жирів і до 35% вуглеводів (Steinke, 1991). Завдяки цим поживним характеристикам соя входить до складу широкого кола продуктів харчування людини та до складу деяких кормів для тварин. У зв'язку із зростаючим інтересом до вирощування сої в Україні, стає надзвичайно актуальним використання сучасних генетичних підходів щодо покращення господарсько цінних ознак сої української селекції, зокрема стійкості до гербіцидів, що може призвести до значного збільшення врожаїв даної культури.

Хоча в 1995 р. компанія «Монсанто» ввела в обіг генетично модифіковану сою, яка містить повну копію гена енолпіруватшкіматфосфатсинтетази із ґрунтової бактерії *Agrobacterium*, що забезпечує стійкість до гліфосату (раундап), існує декілька інших класів гербіцидів, широко вживаних у сільському господарстві, до яких соя є чутливою. Зокрема, одним із таких класів, порушників мітозу, є динітроаніліни, до котрих належать такі відомі гербіциди, як трифлуралін (трефлан, нітран) та споріднені з ним пендаметалін (стомп, проул), нітралін та оризалін (Мельников, 1987; Брицун та інш., 2008). Зокрема, трифлуралін

використовується у великих масштабах для обробки посівів бавовника, сої, соняшника, капусти, томатів та інших культур.

Враховуючи вищезазначене, метою даної роботи було здійснення біолістичної трансформації високоембріогенного сорту сої Київська-91 з використанням векторної конструкції (Емец и др, 2008), що містить мутантний ген альфа-тубуліну *TuAm* природного біотипу гусячої трави (*Eleusine indica*), який забезпечує стійкість до динітроанілінових гербіцидів, для отримання гербіцид-стійких ліній сої та проведення молекулярно-генетичного аналізу задля підтвердження їх трансгенної природи.

Матеріали і методи

В експериментах використовували калус сої (*Glycine max*), котрий вирощували на середовищах, як описано раніше (Пахомов и др., 2004). Біолістичну трансформацію здійснювали згідно протоколу Abumhadi et al. (2001) з деякими модифікаціями. В якості векторних конструкцій використовували створені нами плазмиди pANTUB1 та pANTUAm (Емец и др, 2008). По 2 мкг кожної плазмідної ДНК (pANTUB1 та pANTUAm) додавали до суміші з 25 мкл 2,5 М CaCl₂ та 10 мкл 0,1 М спермі дину, преципітували на фольфрамкові мікрочастинки, які потім відмивали в етанолі і підсушували на фільтрі протягом 10 хв. Калусні експланти розміром 2-3 см розміщували по центру чашки Петрі, що містила осмотичне середовище (Abumhadi et al., 2001) на 4 год до та на 16 год після бомбардування. Біолістичну трансформацію калусу сої здійснювали з використанням наступних параметрів: тиск гелію – 0,7 МПа, рівень вакууму – 0,9 бар, дистанція польоту мікрочастинок - 7 см. Через тиждень після бомбардування експланти переносили на відповідне поживне середовище (Пахомов и др., 2004), що містило селективну концентрацію динітроанілінового гербіциду трифлюраліну, для селекції гербіцид-стійких ліній сої.

Оскільки трифлюралін (DowElanco, Greenfield, USA) є найбільш ефективним представником із гербіцидів класу динітроанілінів, також було проведено аналіз чутливості клітин калусу сої до його дії з метою встановлення селективної концентрації даної речовини. Селективну концентрацію трифлюраліну визначали за допомогою тесту *in vitro*, розробленого нами раніше (Yemets et al., 2000; 2003). Тестування проводили в діапазоні концентрацій трифлюраліну від 0,1 до 50 мкМ. З цією метою відповідні аліквоти стокового розчину трифлюраліну (10 мМ) в диметилсульфоксиді додавали в охолоджене стерильне поживне середовище для калусоутворення сої, а решту зберігали при -20 °С.

Для проведення молекулярно-біологічного аналізу, зокрема, для блотинг-гібридизації за Саузерном, тотальну ДНК виділяли з молодих пагонів регенерантів за допомогою DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Німеччина). П'ять мкг рослинної ДНК з контрольної та кожної з протрансформованих ліній обробляли ендонуклеазою *Hind* III (Roche Diagnostics, Germany) протягом ночі при 37°C. Рестракційні фрагменти ДНК розділяли в 1%-ному агарозному гелі та переносили на нейлоновий фільтр Hybond-NX („Amersham“, США) згідно стандартній процедурі (Sambrook et al., 1989). Наступні гібридизацію, відмивку та експозицію проводили як описано раніше (Radchuk et al., 2005). В якості зондів використовували повнорозмірний ген α -тубуліну, отриманий за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) при створенні відповідної конструкції для трансформації. ПЛР-ампліфікований фрагмент гену *TUAm* мітили ³²P-dCTP з використанням Rediprime II kit (Amersham, UK).

Результати та обговорення

Відомо, що успіх генетичної трансформації залежить від ряду факторів, до яких, зокрема, належать правильний підбір експлантів та добре розроблений метод регенерації з них рослин. Раніше нами було введено в культуру *in vitro* та проведено

оцінку ембріогенного потенціалу сортів сої, районуваних в зоні українських Лісостепу та Полісся (Пахомов и др., 2004). Зокрема, у таких сортів як Чернятка, Київська-27, Київська-91, Васильківська, Мар'яна, Чорнобура та Альтаїр було проаналізовано здатність до калусоутворення та регенерації рослин. Було встановлено, що найефективніша регенерація пагонів із ембріогенного калусу, отриманого з незрілого насіння сої, спостерігалася у сортів Київська-91, Мар'яна та Васильківська (Пахомов и др., 2004). Серед цих трьох генотипів для проведення подальших експериментів по генетичній трансформації був відібраний сорт Київська-91, оскільки показники його регенераційного потенціалу були найвищими.

Для даного сорту також було проведено аналіз на виживання клітин калусу в присутності трифлюраліну для встановлення його ефективної селективної концентрації. Необхідно зазначити, що динітроанілінові гербіциди мають дуже високу спорідненість до рослинних тубу лінів у порівнянні з тубулінами тварин, тобто діють в низьких мікромольних концентраціях, які є майже нетоксичними для ссавців (Емец и Блюм, 2007; Baird et al., 2000; Blume et al., 2003; Yemets and Blume, 1999). Було встановлено, що ефективною концентрацією трифлюраліну, яка призводила до загибелі більше, ніж 50% клітин калусу сої та майже повністю пригнічувала його регенераційну здатність була концентрація 10 мкМ. Тому, в подальшому саме таку концентрацію використовували для селекції трансгенних ліній сої після біолістичної трансформації експлантів.

Для успішної інтеграції в геном *G. max* мутантного гену альфа-тубуліну під час бомбардування та його експресії в реципієнтних клітинах було також додатково здійснено перенесення гену бета-тубуліну, ізольованого із ячменю (*Hordeum vulgare*), що знаходився в сконструйованій нами плазміді рАНТUB1 (Емец и др., 2008). Раніше було встановлено, що наявність саме обох субодиниць (альфа- та бета-) екзогенного тубуліну є передумовою його успішної коекспресії та подальшої кополімеризації в складі мікротрубочок клітин трансгенних ліній (Antony et al., 1998).

Після бомбардування експланти витримували на середовищі для калусогенезу без додавання селективного агенту. Через тиждень їх переносили на відповідне поживне середовище для регенерації пагонів (Пахомов и др., 2004), що містило селективну концентрацію трифлюраліну (10 мкМ), для селекції гербіцид-стійких ліній сої. Селективний тиск в культурі здійснювали протягом 3-4 місяців. Лінії, що були здатні виживати в присутності трифлюраліну, переносили для подальшого культивування та розмноження.

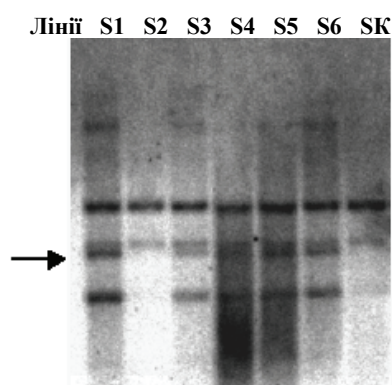


Рис. 1. Трансгенні лінії сої (S1-S6) мають одну додаткову полосу (за виключенням лінії S2), характерну для альфа-тубуліну (стрілка) в порівнянні з контролем (SK). Розмір полоси відповідає інтегрованому мутантному альфа-тубуліну (*TUAm1*) *E. indica*, що забезпечує стійкість до динітроанілінових гербіцидів.

Для з'ясування трансгенної природи відселектованих ліній та ідентифікації перенесеного гену альфа-тубуліну було проведено молекулярно-генетичний аналіз шести трансгенних регенерантів сої за допомогою гібридизації за Саузерном. Для цього ДНК трансгенних та контрольних (непротрансформованих) ліній обробляли

ендонуклеазою *Hind* III, потім, після електрофоретичного розділення і блотингу, ДНК гібридували із зондом до послідовності гену *TuAm1*. Було встановлено, що серед шести проаналізованих ліній сої (лінії S1-S6) лише лінія S2 не була трансгенною, всі інші – S1, S3, S4, S5 та S6 - демонстрували наявність в геномі перенесеного мутантного гену тубуліну, який забезпечує стійкість рослин до гербіцидів з класу динітроанілінів (Рис. 1).

Висновки

Вперше здійснено успішний перенос мутантного гену тубуліну, що забезпечує стійкість до динітроанілінових гербіцидів, у рослини сої за допомогою біолістичної трансформації. Продемонстровано можливість селекції трансформантів на гербіциді трифлураліні – одному з найефективніших динітроанілінів. Трансгенна природа відселектованих ліній підтверджена за допомогою блотинг-гібридизації за Саузерном.

Література

1. Брицун В.М., Ємець А.І., Лозинський М.О., Блюм Я.Б. 2,6-Динітроаніліни: синтез, пестицидні та антипротозойні властивості // Укр. Biorganica Acta. – 2008. - прийнята до друку.
2. Ємець А.И., Блюм Я.Б. Устойчивость растений к гербицидам с антимикротрубочковым механизмом действия: от природных мутантов до переноса генов // Физиол. растений. – 1999. – 46, № 6. – С. 899–907.
3. Ємець А.И., Блюм Я.Б. Мутантныя гены тубулинов растений как маркерные селективные гены для генетической инженерии // Цитология и генетика. – 2007. - Т. 41, № 3 - С. 29-43.
4. Ємець А.И., Радчук В.В., Пахомов А.В., Блюм Я.Б. Создание конструкций для биолістической трансформации и получение трансгенной сои с устойчивостью к динитроанилиновым гербицидам // Цитология и генетика.- 2008. – прийнята до друку.
5. Мельников Н.Н. Пестициды: химия, технология, применение. - М., Химия, 1987. - 711 с.
6. Пахомов А.В., Ємець А.И., Ху Ч.-Е., Блюм Я.Б. Оценка эмбрионного потенциала сортов сои, районированных в зоне украинских Лесостепи и Полесья, как необходимый этап для их дальнейшей трансформации // Цитология и генетика. – 2004. - Т. 38, №1. - С. 49-54.
7. Пахомов А.В., Ємець А.И., Блюм Я.Б. Сравнительный анализ эмбрионного потенциала сортов сои, районированных в различных эколого-географических зонах мира // Цитология и генетика. – 2005.- Т. 39, №5. – С. 20-27.
8. Abumhadi N., Trifonova A., Takumi S., Nakamura C., Todorovska E., Getov L., Christov N., Atanassov A. Development of the particle inflow gun and optimizing the particle bombardment method for efficient genetic transformation in mature embryos of cereals // Biotech. Equip. – 2001. - V.15, N 2. – P. 87-96.
9. Anthony R., Waldin T., Ray J., Bright S., Hussey P. Herbicide resistance caused by spontaneous mutation of the cytoskeletal protein tubulin // Nature. – 1998. – V. 393 – P. 260-263.
10. Baird V., Blume Ya.B., Wick S.M. Microtubular and cytoskeletal mutants. In: Plant microtubules - potential targets for biotechnological applications / P. Nick (ed). - Frankfurt-Berlin: Springer Verlag. - 2000. - P. 155-187.
11. Blume Ya.B., Yemets A.I., Nyporko A.Yu., Baird W.V. Structural modeling of plant α -tubulin interaction with dinitroanilines and phosphoroamidates // Cell Biol. Int. – 2003. V. 27. – P. 171-174.
12. Radchuk V.V., Van D.T., Klocke E. Multiple gene co-integration in *Arabidopsis thaliana* predominantly occurs in the same genetic locus after simultaneous *in planta*

- transformation with distinct *Agrobacterium tumefaciens* strains // Plant Sci. – 2005. – V. 168, N 6 – P. 1515-1523.
13. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual. - Cold Spring Harbour Press, Cold Spring Harbour, NY. - 1989.
14. Steinke F.H. Nutritional value of soybean protein foods / New protein foods in human health: nutrition, prevention and therapy. Eds.: Steinke F.H., Waggle D.H., Volgarev M.N. – 1991.- P. 59-67.
15. Yemets A.I., Klimkina L.A., Tarassenko L.V., Blume Ya.B. Efficient callus formation and plant regeneration from dinitroaniline-resistant and susceptible biotypes of *Eleusine indica* (L.) // Plant Cell Rep. – 2003. – V. 21. – P. 503-510.

Резюме

Осуществлена биолистическая трансформация сои конструкцией с мутантным геном α -тубулина, обеспечивающим устойчивость к динитроанилиновым гербицидам. В результате селекции отобраны трифлуралин-устойчивые растения сои, трансгенная природа которых подтверждена с помощью блоттинг-гибридизации по Саузерну с использованием специфического зонда к мутантному гену тубулина.

Здійснено біолистичну трансформацію сої конструкцією з мутантним геном α -тубуліну, що забезпечує стійкість до динітроанілінових гербицидів. В результаті селекції відібрано трифлуралін-стійкі рослини сої, трансгенна природа яких підтверджена за допомогою блотинг-гібридизації за Саузерном з використанням специфічного зонду до мутантного гена тубуліну.

Biolistic transformation of soybean by construct with mutant α -tubulin gene has been realized. During the selection a trifluralin-resistant soybean plantlets were picked up. Their transgenic nature was confirmed by Southern blotting hybridization using specific probe to mutant tubulin gene.

ЗАБЕЛИНА В.Ю., ДОРОШЕНКО К.А., КЛИМЕНКО В.В.

Харьковский национальный университет им. В.Н.Каразина

Украина, 61077, Харьков, пл. Свободы, 4, E-mail: belkina1983@mail.ru

РАЗВИТИЕ В ЧУЖЕРОДНОЙ СОМЕ ТРАНСПЛАНТИРОВАННЫХ ЯИЧНИКОВ И СПОСОБНОСТЬ К ТЕРМИЧЕСКОМУ ПАРТЕНОГЕНЕЗУ СФОРМИРОВАВШИХСЯ В НИХ ЯИЦ У ТУТОВОГО ШЕЛКОПРЯДА *WORMS MORI L.*

Полученные нами ранее результаты показывают, что при имплантации яичников породы Советская-5 в клон Р29 показатели полного термопартеногенеза повышаются с низкого до такого уровня, который достаточен для партеноклонирования этой известной породы. При трансплантации яичников клона Р29 в мужскую сому породы Советская-5 нами было обнаружено, что яйца, развившиеся в имплантате, несмотря на моновольтинность и донора и реципиента, не входят в диапаузу. Для проверки выявленных особенностей партеногенеза, в эксперимент были включены другие партеноклоны. Целью данной работы был сравнительный анализ приживаемости имплантата в чужеродной соме в зависимости от пола реципиента, способности к термоактивации и полному термическому партеногенезу яиц, развившихся в имплантате при использовании различного исходного материала.

Изучение изменений способности яйца к партеногенезу вследствие прохождения оогенеза в чужеродной соме позволит приблизиться к пониманию природы факторов,

ответственных за онтогенетическую детерминацию процессов партеногенетического развития. Выяснение механизмов термопартеногенеза на данной модели необходимо не только для решения проблемы клонирования любого женского генотипа у тутового шелкопряда, но и партеноклонирования у животных вообще.

Материалы и методы

Объектом исследования служил *тутовый шелкопряд Bombyx mori L.* В качестве материала использовали партеногенетический диплоидный клон P29, обладающий высокой способностью к партеногенезу: водный прогрев при 46°C в течение 18 мин. дает здесь около 100% активированных (пигментированных) яиц; при этом процент вылупления личинок (полный партеногенез) составляет 95%. По отношению к этому клону-рекордисту оценивали ход оогенеза в имплантатах и способность к термоактивации и полному термическому партеногенезу в нескольких других клонах: диплоидном клоне P178, уникальном по своей способности к спонтанному партеногенезу, тетраплоидном клоне P4n17 и диплоидном клоне Pos. Для раннего определения пола личинок в опытах использовали породу Советская-5(C-5), меченную по полу на стадии яйца. Порода C-5 обладает низкой способностью к полному термопартеногенезу, около 0,1%. Использованные клоны и порода моновольтинны, то есть отложенные бабочками яйца обязательно уходят в диапаузу. Экспериментальный материал выращивали в соответствии с общепринятыми зоотехническими требованиями.

Трансплантация гонад. Метод заключается в имплантации яичников донора в сому реципиента. Трансплантацию гонад проводили в III и IV личиночных возрастах по разработанной ранее методике. Дошедших до стадии имаго бабочек вскрывали и извлекали имплантат для изучения развившихся в нем яиц.

Термоактивация. Ооциты, развившиеся в имплантированных яичниках, извлекали и подвергали термоактивации по методу Астаурова (водный прогрев при 46°C в течение 18 минут). Способность гены к термоактивации оценивали по проценту пигментированных яиц в пробах; за способность к полному термопартеногенезу принимали процент вылупившихся личинок в выборках пигментированной гены.

Результаты и обсуждение

Результаты выживаемости оперированных гусениц и приживаемости в них имплантированных гонад приведены в таблице 1. Они свидетельствуют о том, что при используемых условиях выкормки до стадии имаго доходит в среднем 70% реципиентов, в которых приживается около 60 % имплантированных гонад. Существенных различий по изучаемым показателям между самцами- и самками-реципиентами не обнаружено.

Таблица 1

Выживаемость оперированных гусениц и приживаемость имплантированных гонад

№ опыта	Трансплантации	Кол-во реципиентов	Кол-во реципиентов в V возрасте	Кол-во имаго	Имаго с имплантатом
1	♀C-5 → P29	28	22 (79%)	21 (75%)	18 (64%)
2	♀C-5→P178	28	21 (75%)	20 (71%)	15 (54%)
3	♀C-5→Pos	30	23 (77 %)	19 (63%)	16 (57%)
4	♀C-5→P4n17	28	24 (86%)	22 (79%)	16 (57%)
5	P29→♂C-5	30	25 (83%)	23 (77%)	21 (70%)
6	P178→♂C-5	28	21 (75%)	18 (64%)	15 (54%)
7	P4n17→♂C-5	27	20 (74%)	17 (63%)	16 (59%)
8	Pos→♂C-5	26	22 (85%)	15 (58%)	13 (50%)

Таблица 2 показывает, что яйца породы C-5, развившиеся в клонах-реципиентах, активируются в достаточно высокой степени по сравнению с интактным контролем C-

5, более того их способность к полному термопартеногенезу возрастает с 0,1 – 0,5% (таблица 4) до 30 – 42%.

Таблица 2

Способность к партеногенезу яиц породы С-5, развившихся в яичниках, имплантированных в личинок различных партеноклонов и яиц, развившихся в собственных гонадах реципиентов

Вариант трансплантации	Кол-во бабочек	Общ. кол-во яиц	Активация яиц		Выход личинок		
			шт.	%	шт.	% от активации	% от общ. кол-ва яиц
С-5 → Р29	18	2351	2139	91	917	43	39
С-5→Р178	15	2020	1615	80	763	47	38
С-5→Pos	16	2143	1492	75	689	46	32
С-5→Р4n17	16	2101	1302	62	429	33	20
Контроль							
Р29	18	5201	5096	98	4229	83	81
Р178	15	4952	4556	92	3463	76	70
Pos	16	4790	3879	81	2017	52	42
Р4n17	16	4983	4634	93	2734	59	55

При пересадке яичников исследуемых клонов в мужскую сомую яйца, формирующиеся в имплантатах, сохраняют способность к полному термопартеногенезу, хотя уровень его ниже в сравнении с контрольными значениями (таблицы 3, 4). Во всех вариантах трансплантации яичников клонов в личинок мужского пола вызванное термоактивацией развитие яиц, сформированных в имплантате, протекает без диапаузы, несмотря на то, что весь использованный материал моновольтинный. В случае имплантации яичников клона Р29 в самцов породы С-5 в 6 кладках мы наблюдали одновременный выход типичных черных и отличавшихся от них по фенотипу рыжих личинок. На данном этапе природа этого явления нами не изучена. Возможно, это связано с проявлением рецессивного аллеля гетерозигот +/ch (Р29), которое свидетельствует о различии процессов экспрессивности генов в указанном локусе для разных яиц имплантата.

Таблица 3

Способность к партеногенезу яиц различных партеноклонов, развившихся в яичниках, имплантированных в личинок мужского пола породы С-5

Вариант трансплантации	Кол-во бабочек	Общ. кол-во яиц	Активация яиц		Выход личинок		
			шт.	%	шт.	% от активации	% от общ. кол-ва яиц
Р29→С-5	21	2417	2248	93	1236	55	51
Р178→С-5	15	1378	1172	85	586	50	43
Р4n17→С-5	16	874	568	65	199	35	23
Pos→С-5	13	793	317	40	95	30	12

Таблица 4

Способность к партеногенезу яиц различных партеноклонов и яиц породы С-5, развившихся в собственных яичниках гусениц (интактный контроль)

Название	Кол-во бабочек	Общ. кол-во	Активация яиц		Выход личинок		
			шт.	%	шт.	% от	% от

		яиц				активации	общ. кол-ва яиц
P29	21	6192	6068	98	5522	91	89
P178	15	5020	4668	93	3734	80	74
P4n17	16	5124	4765	93	3097	65	60
Pos	13	3817	3244	85	1816	56	48
C-5	20	5305	1856	35	9	0,5	0,2

Выводы

Выживаемость оперированных личинок и приживаемость в них имплантата достаточно высоки и практически не зависят от пола реципиента.

Для повышения способности к термопартеногенезу линейного и породного материала возможно использование не только клона-рекордиста P29, но и других партеноклонов.

Метод трансплантации яичников - в сочетании с методом термоактивации по Астаурову и, в перспективе, с методами молекулярной биологии - представляется целесообразным и достаточно эффективным в экспериментальном анализе процессов, приводящих к формированию в оогенезе механизмов, которые определяют способность зрелого яйца к активации и дальнейшему развитию.

Литература

1. Астауров Б.Л. Искусственный партеногенез у тутового шелкопряда. – М. – Л.: Изд-во АН СССР, 1940. - 240с.

2. Астауров Б.Л. Отбор по способности к искусственному термическому партеногенезу и получение улучшенных по этому признаку партеноклонов у шелковичного червя // Генетика. – 1973. – Т.9, №9. – С. 93–106.

3. Дорошенко К.А., Клименко В.В. Повышение способности к термическому партеногенезу яиц тутового шелкопряда, развившихся в яичниках, имплантированных в личиночном возрасте в сому рекордного по данному признаку партеноклона // Вестник ХНУ им. В.Н.Каразина. Серия биология. – 2006. – В.3, №729. – С. 72–75.

4. Забелина В.Ю., Клименко В.В. Способность к термопартеногенезу яиц тутового шелкопряда *Bombyx mori* L., развившихся в яичниках, имплантированных в личиночном возрасте в сому противоположного пола // Вестник ХНУ им. В.Н.Каразина. Серия биология. – 2006. – В.3, №729. – С. 76–80.

5. Клименко В.В., Дорошенко К.А., Забелина В.Ю. Термический партеногенез у тутового шелкопряда: возможности клонирования и бездиапаузного развития методом трансплантации яичников // Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології – 2007 – Т.1. – С. 236–240.

6. Клименко В. В., Спиридонова Т. Л. Трансплоидная комбинативная изменчивость при искусственном партеногенезе у тутового шелкопряда // Доклады Академии наук СССР – 1977 – Т 236, №3 – С. 740–743.

7. Михайлов Е. Н. Шелководство. – М.: Сельхозгиз, 1950 – С. 496.

8. Спиридонова Т.Л., Щегельская Е.А., Клименко В.В. Трансплантация гонад у гусениц чешуекрылых // Известия АН Молдавской ССР. Серия биологических и химических наук. – 1987. – № 2. – С. 69–71.

9. Струнников В.А., Гуламова Л.М. Искусственная регуляция пола у тутового шелкопряда. Сообщение I. Выведение меченных по полу пород тутового шелкопряда. // Генетика. – 1969. – Т.5., № 6. – С.52–71.

10. Klymenko V.V. Parthenogenesis and cloning in the silkworm *Bombyx mori* L.: Problems and prospects // Insect biotechnology and sericulture. – 2001. – vol.70. – P.156–164.

11. Klymenko V.V., Spiridonova T.L., Frolova N.M. Ooplasmic determinants of silkworm egg capability for complete thermal parthenogenesis. // Biologicheskii vestnik. –

2006. – vol.10. – P.103-108.

12. Yamashita O., Irie K. Larval hatching from vitellogenin-deficient eggs developed in male hosts of the silkworm // Nature. – 1980. – vol. 203. – P.385–386.

Резюме

Используя партеноклоны и линии тутового шелкопряда, изучали развитие яичников, имплантированных в полость тела самок и самцов. Оценивали их развитие в чужеродной соме и способность к термопартеногенезу формировавшихся таким путем яиц.

Використовуючи партеноклони та лінії шовковичного шовкопряда, вивчали розвиток яєчників, імплантованих у порожнину тіла самиць та самців. Оцінювали їх розвиток в чужорідній сомі та здатність до термопартеногенезу яєць, що формувалися у такий спосіб.

The development of silkworm ovaries, implanted into female and male hosts using silkworm parthenoclones and stocks has been studied in the work. Oogenesis process in foreign environment and capability for activation and thermal parthenogenesis of the eggs have been estimated.

ЗАГОРСКАЯ А.А., СИДОРЧУК Ю.В., ДЕЙНЕКО Е.В.

Институт цитологии и генетики СО РАН,

Россия, 630090, г. Новосибирск, пр. Лаврентьева 10, e-mail:zagorska@bionet.nsc.ru

МОРФОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ У ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ ТАБАКА ПРИ СПОНТАННОЙ ПОЛИПЛОИДИЗАЦИИ В КУЛЬТУРЕ IN VITRO

В созданной нами ранее коллекции трансгенных растений табака (*Nicotiana tabacum* L.) были выделены растения с аномальной морфологией цветков и сниженной мужской фертильностью [1]. Изменения морфологии проявились в нарушении пропорций цветка, в частности, соотношения диаметра венчика к его длине. Кроме того, для этих трансформантов была характерна особая форма цветка с закрученными к основанию лепестками, а рыльце пестика было увеличено в диаметре. Такой фенотип получил название «волнистый венчик». Проведенный цитологический анализ показал, что растения с фенотипом «волнистый венчик» характеризовались удвоенным набором хромосом $2n=96$. Представляло интерес исследовать морфофизиологические изменения, возникающие в растениях в процессе введения его в культуру и после генетической трансформации. Цель данной работы – анализ содержания и соотношения фитогормонов в цветках полиплоидных трансгенных растений табака с измененным фенотипом, находящихся на разных стадиях развития.

Материалы и методы

Материалом для исследования служили растения табака (*Nicotiana tabacum*, L.) с фенотипом «волнистый венчик», обозначенные Res79; Res60; Res61; 121.89; 16.70, выделенные нами ранее из серии независимо полученных трансформантов. Для анализа фитогормонального состава были выбраны растения с наиболее ярко выраженным измененным фенотипом. Для выявления таких растений был проведен морфометрический анализ элементов цветка, включающий измерение следующих параметров: длины пестика, тычиночных нитей и венчика, а также диаметра венчика и рыльца пестика полностью раскрывшихся цветков, находящихся на XII стадии развития [2]. Для измерения брали по 20 - 50 цветков с каждого растения. Достоверность различий оценивали по критерию Стьюдента. В таблице представлены средние значения и их стандартные ошибки.

Содержание ИУК и суммарных цитокининов (зеатина и зеатинрибозид) определяли в цветках, находящихся на разных стадиях развития, после фиксации жидким азотом и последующей лиофилизации по общепринятым методикам [3, 4]. Измерения проводили в 3-5 биологических повторностях. В качестве контроля использовали цветки исходной нетрансгенной линии табака SR1.

Результаты и обсуждение

Результаты морфометрического анализа растений с фенотипом «волнистый венчик», представленные в таблице 1, показали, что признаками, определяющими фенотип, были диаметр венчика и диаметр рыльца. Диаметр венчика контрольных растений составлял в среднем 8 мм. У исследуемых же растений этот показатель изменялся от 9,6 мм у растения Res60 до 10,5 мм у 121.89. Диаметры рыльца пестика у трансгенных тетраплоидных растений также были больше, чем у растений линии SR1, и изменялись от 2,5 мм (минимальное значение у растения Res60) до 3,1 мм (максимальное значение - у 121.86). Растение же 16.70 характеризовалось не только изменением строения венчика, но и превышением длины пестика над длиной тычиночных нитей, то есть было лонгостильным.

Таблица 1. Морфометрический анализ трансгенных растений T₀ с фенотипом «волнистый венчик» (мм)

	SR1	Res79	Res60	Res61	121.89	16.70
Длина пестика	42,17±0,29	43,40±0,22*	41,37±0,24	41,77±0,24	41,73±0,05	45,20±0,49*
Длина тыч.нити	42,67±0,25	42,30±0,23	40,33±0,26*	40,73±0,20*	41,07±0,21*	41,67±0,41
Длина венчика	41,90±0,29	42,23±0,20	40,53±0,29*	39,47±0,26*	40,97±0,26	42,27±0,36
Диаметр венчика	8,02±0,07	10,08±0,06*	9,65±0,16*	9,94±0,11*	10,54±3,01*	10,16±0,06*
Диаметр рыльца	2,23±0,02	3,08±0,02*	2,54±0,04*	2,98±0,02*	3,04±0,02*	3,23±0,04*

- - имеется достоверное различие по сравнению с контролем SR1 ($t_{\phi} > t_{0,95}$)

Иммуноферментный анализ ИУК и суммарных цитокининов на различных стадиях развития цветка (от стадии тетрад до стадии зрелого цветка) выявил значительные отличия в содержании и динамике фитогормонов между полиплоидными трансгенными растениями и контрольным растением SR1.

Установлено, что у контрольного растения SR1 содержание ИУК в тканях цветков достигало максимальных значений на стадии I развития цветка (стадия тетрад) и составляло 1785 нг/г. На последующих стадиях концентрация ИУК постепенно снижалась до значений 133,5 нг/г на стадии XII (стадия зрелой пыльцы) (рис 1).

В цветках трансгенного растения табака Res79 с фенотипом «волнистый венчик» концентрация ИУК также равномерно снижалась со значения 1956,8 нг/г на стадии I до 523,1 нг/г на стадии VI (стадия первого митоза в пыльце). На этой стадии содержание ИУК в опытном и контрольном образцах было практически одинаковым (519,0 нг/г у нетрансгенного контроля SR1). Однако, на стадии VIII (объединение пыльцевых сумок в пыльнике) в цветках растения Res79 наблюдалось резкое повышение содержания ИУК до значений, более чем втрое превышающих концентрации ИУК у контроля (1505,6 нг/г и 480,4 нг/г, соответственно). На последующих стадиях развития цветка содержание ИУК у растения Res79 постепенно снижалось, однако на XII стадии продолжало оставаться высоким и превышало в 3-5 раз уровень данного гормона у контрольного растения (669,7 нг/г и 133,5 нг/г у Res79 и SR1, соответственно).

Динамика ИУК

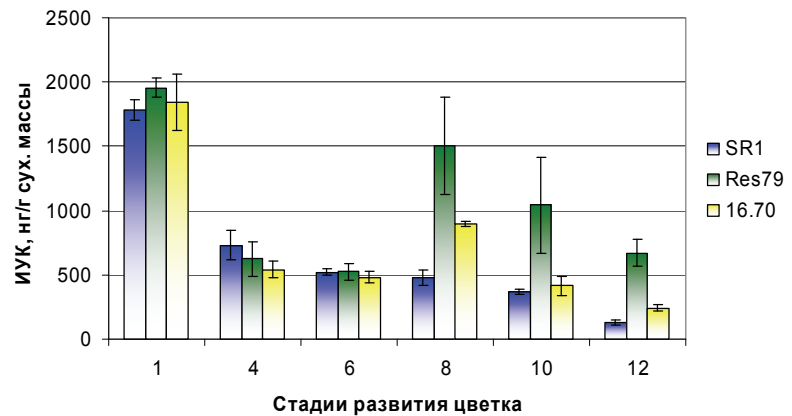


Рис. 1. Содержание ИУК в тканях цветков табака на разных стадиях развития у трансгенных полиплоидных растений и у контроля SR1

В цветках трансгенного растения 16.70 с сочетанием лонгостилии и фенотипа «волнистый венчик» наблюдалась аналогичная динамика содержания ИУК. На VIII стадии развития также наблюдалось повышение концентрации ИУК по сравнению с контролем, однако у этого растения оно было только двукратным и составило 898,3 нг/г. На стадиях X и XII уровень ИУК постепенно снижался, оставаясь вдвое более высоким, чем у контрольного образца (417,2 нг/г и 242,2 нг/г, соответственно).

Анализ содержания цитокининов показал, что суммарное количество зеатина (Z) и зеатинрибозида (ZR) в цветках растений контрольной линии SR1 незначительно (с 103,6 нг/г до 166,3 нг/г) повышалось со стадии I до VI (рис. 2). На стадии VIII наблюдали скачкообразное повышение концентрации цитокининов до 323,4 нг/г. На X стадии уровень гормона снижался (217,4 нг/г) и уже практически не менялся к моменту раскрытия цветка.

В цветках трансгенного растения Res79 суммарное содержание цитокининов на всех стадиях развития, кроме стадии I, было несколько ниже, чем в цветках контрольных растений (133,0 нг/г, 101,2 нг/г; 124,5 нг/г на I-VI стадиях, соответственно). Динамика данной группы гормонов в ходе развития цветка соответствовала динамике цитокининов у контроля. Как и у контрольного растения, у Res79 наблюдали резкое (двукратное) повышение уровня цитокининов на VIII стадии, а на последующих стадиях проявлялась тенденция к снижению их содержания до стадии раскрытого цветка.

Сумма цитокининов

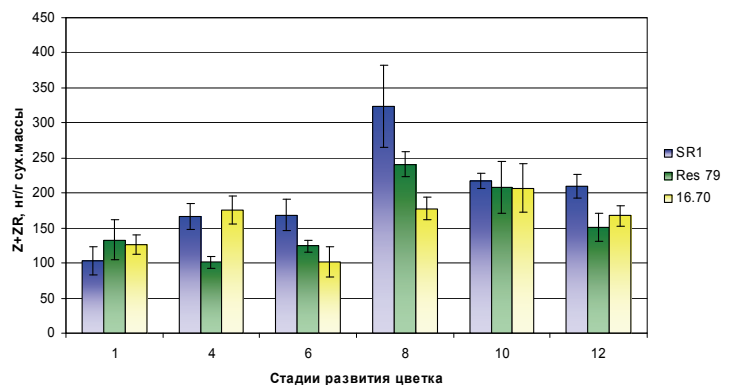


Рис. 2. Содержание суммарных цитокининов в тканях цветков табака на разных стадиях развития у трансгенных полиплоидных растений и у контроля SR1

Определение уровня цитокининов у растения 16.70 показало, что на начальных стадиях развития цветка содержание цитокининов практически не отличается от значений контрольного растения. Однако к стадии VI их концентрация у трансгенного растения в 1,6 раза ниже, чем у контрольного (101,9 нг/г у растения 16.70, у растения SR1 - 166,3 нг/г). На стадиях VIII и X содержание цитокининов у данного образца

несколько повышается (177,8 нг/г и 207,0 нг/г, соответственно), но также остается более низким, чем у контрольного растения. На завершающей XII стадии оно снижается до значения 167,8 нг/г, в отличие от контроля, у которого содержание цитокининов остается неизменным на X-XII стадиях.

Формирование измененного фенотипа цветка, проявляющегося в виде волнистого венчика, также может быть вызвано колебаниями фитогормонального фона в процессе его развития. Известно, что морфогенез органов и тканей у растений определяется ориентацией цитоскелетных структур в ходе деления и роста клетки, включающих веретено деления, расположение которого определяет направление роста клеточных клонов, и интерфазные кортикальные спирали микротрубочек, направляющие рост клетки растяжением. Как показано ранее, реориентация цитоскелетных структур происходит под влиянием ряда факторов: при созревании клетки, освещении, поранении и др. [5]. Однако одним из самых действенных факторов являются фитогормоны. В частности, в ряде работ исследовалось влияние ауксинов на деление и рост клеток [6,7]. Установлено, что попеременная обработка клеток эпидермиса гипокотилей фасоли растворами, содержащими и не содержащими ауксины, приводила к обратимому изменению ориентации расположения микротрубочек и микрофиламентов [5]. Аналогичные результаты были получены и на изолированных клетках мезофилла табака [8]. Следовательно, можно предположить, что колебание содержания ауксинов в процессе морфогенеза цветка могут явиться причиной изменения морфологии венчика, а описанный нами фенотип «волнистый венчик» формируется в связи со скачкообразным увеличением содержания ИУК в цветках растения Res 79 на VIII стадии развития цветка.

Вариации уровня пloidности, полученные в результате экспериментов по трансформации и регенерации растений, были описаны ранее [9]. Важно понять роль эндорепликации в процессах регенерации и трансформации для того, чтобы контролировать уровень соматоклональной вариации и полиплоидизации в культуре ткани. Ряд исследований посвящены изучению возможности появления полиплоидных клеток в результате процессов эндоредупликации в различных типах тканей у различных растений. Показано, что ткань листа часто является миксоплоидной, с высокой долей тетраплоидных клеток. Соответственно, существует корреляция между долей полиплоидных клеток в ткани экспланта и количеством полиплоидных регенерантов, полученных в результате данных опытов.

Еще одним фактором, влияющим на образование полиплоидных форм в процессе получения трансгенных растений, как известно, является воздействие на растительные ткани регуляторов роста. Многолетние исследования показывают, что длительное приводит к изменению уровня пloidности у регенерантов. Показано, что частота появления тетраплоидных трансформантов томатов [9], полученных в результате агробактериальной трансформации, зависит от длительности процедуры регенерации.

Таким образом, проведенные исследования выявили значительные морфофизиологические изменения у трансгенных растений табака, связанные со спонтанной полиплоидизацией в культуре *in vitro* и изменениями в содержании и динамике фитогормонов между полиплоидными трансгенными и контрольными нетрансгенными растениями.

Работа выполнялась при поддержке гранта НШ-1814.2008.4.

Литература

1. Дейнеко Е.В., Загорская А.А., Сидорчук Ю.В., Новоселя Т.В., Филипенко Е.А., Комарова М.Л., Шумный В.К. Особенности морфологических признаков и фертильности пыльцы у трансгенных растений табака// Физиология растений. 2000. Т.47.№ 1. С.73-78.

2. Koltunow A.M., Truettner K. H. Cox K.H., Wallroth M., Goldberg R.B. Different temporal and spatial gene expression patterns occur during anther development// *The Plant Cell*. 1990. V.2. P. 1201 -1 224.
3. Vysotskaya L. B., Timergalina L. N., Simonyan M. V. , Veselov S. Yu., Kudoyarova G.R. Growth rate, IAA and cytokinin content of wheat seedling after root pruning // *Plant Growth Regulation*. 2001. V. 33. P 51–57.
4. Veselov S.Yu., Kudoyarova G.R., Egutkin N.L., Gyuli-Zade V.Z., Mustafina A.R., Kof E.M. Modified solvent partitioning scheme providing increased specificity and rapidity of immunoassay for indole 3-acetic acid // *Physiol Plant*. 1992. V. 86. P. 93–96.
5. Клячко Н.Л. Фитогормоны и цитоскелет// *Физиология растений*. 2003. Т.50. №3. С.475-480.
6. Campanoni P., Nick P. Auxin-dependent cell division and cell elongation. 1-Naphthaleneacetic acid and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid activate different pathways// *Plant Physiology*. 2005. V. 137. P. 939–948.
7. Chilley P., Casson S, Tarkowski P., Hawkins N., Wang K., Hussey P., Beale M., Ecker J., Sandberg G., Lindsey K. The POLARIS peptide of *Arabidopsis* regulates auxin transport and root growth via effects on ethylene signaling// *Plant Cell*. 2006. V. 18. № 11. P. 3058–3072.
8. Vissenberg K., Quelo A.H., Van Gestel K., Olyslaegers G., Verbelen J.P. From hormone signal, via the cytoskeleton, to cell growth in single cells of tobacco// *Cell Biol Int*. 2000. V.24. №6. P. 343-349.
9. Ellul P, Garcia-Sogo B, Pineda B, Ríos G, Roig LA, Moreno V. The ploidy level of transgenic plants in *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato cotyledons (*Lycopersicon esculentum* Mill.) is genotype and procedure dependent // *Theor Appl Genet*. 2003 Jun;107(1):190. 2003

Резюме.

Были изучены морфофизиологические изменения у трансгенных растений табака при спонтанной полиплоидизации в культуре *in vitro*. Выявлены значительные отличия в уровне ИУК и суммарных цитокининов между трансгенными полиплоидными растениями с измененным фенотипом цветка и нетрансгенным контролем.

The morphophysiological changes in transgenic tobacco plants during spontaneous polyploidization coming from *in vitro* cultures were analyzed. Considerable distinctions in IAA and total cytokinin levels between polyploidy plants with altered flower phenotype and nontransgenic control plants were discovered.

ИШМУРАТОВА Н.М.¹, ИСМАГИЛОВА А.Ф.², ЯКОВЛЕВА М.П.¹, ТОЛСТИКОВ Г.А.¹

¹*Институт органической химии Уфимского научного центра РАН, Россия, 450054, г. Уфа, проспект Октября, 71, e-mail: insect@anrb.ru*

²*Башкирский государственный аграрный университет, Россия, 450001, г. Уфа, ул. 50-летия Октября, 34.*

НЕИЗВЕСТНОЕ О «МАТОЧНОМ ВЕЩЕСТВЕ» МЕДОНОСНЫХ ПЧЕЛ

Внимание ученых и практиков все больше привлекают препараты, созданные на основе доступных из природных источников биологически активных веществ и применяемые для стимулирования жизнедеятельности, повышения иммунитета, устойчивости к стрессовым факторам и лечения заболеваний пчел. Известно, что защитные силы организма состоят из неспецифического и специфического звеньев. Естественная резистентность – это первичная неспецифическая защита организма от

проникновения чужеродных агентов, способных нарушить гомеостаз. Специфический иммунитет определяет устойчивость организма против определенного заболевания. Для повышения естественной резистентности используют различные методические приемы: выведение устойчивых линий животных, оптимизацию технологического цикла, условий кормления и содержания, фармакологическую коррекцию. Для фармакологической коррекции естественной резистентности и иммунитета используют иммуностимулирующие препараты. Среди большого набора таких препаратов с разной химической структурой особый интерес вызывают соединения, являющиеся естественными метаболитами. Повышение естественной резистентности и иммунитета с использованием естественных метаболитов в условиях благополучия сопровождается усилением обменных процессов, физиологических функций, активизацией анаболизма, что приводит к увеличению роста, продуктивности и жизнеспособности животных.

Особое место среди метаболитов медоносных пчел занимают 10-гидрокси-(10-ГДК) и 9-оксо- (9-ОДК) -2Е-деценовые кислоты, входящие в состав «маточного молочка» и «маточного вещества» соответственно. Если для 10-ГДК описаны antimicrobные, фунгицидные, противоопухолевые, антибиотические и антилейкимические свойства [1], то для 9-ОДК фармакологические исследования до наших работ не проводились, что, вероятно, объяснялось малой доступностью этого соединения из природного источника – пчелиной матки, содержание в которой обычно не превышает 300 мкг, и отсутствием технологических схем его синтеза.

С середины 90-х годов на базе лаборатории биорегуляторов насекомых Института органической химии Уфимского научного центра РАН были начаты исследования по разработке технологичных методов синтеза 9-ОДК и 10-ГДК и созданию специальных препаративных форм различного функционального назначения. Дальнейшие совместные работы с сотрудниками Башкирского государственного аграрного университета и ВНИИ Ветеринарной энтомологии и арахнологии (г. Тюмень) по выявлению биологической активности различных композиций на основе 9-ОДК, 10-ГДК и синтетических компонентов пахучей железы Насонова привели к созданию целой группы запатентованных в Российской Федерации препаратов («Апимил», «Меллан», «Кандисил», «Аписил», ТОС-3, «Уфамил», «Опылил» и «Биосил») для регулирования поведения и жизнедеятельности медоносных пчел [2].

При создании этих препаратов предполагалась их экологическая безопасность и нетоксичность для пчел и человека, поскольку они составлены из полных синтетических аналогов природных соединений, используемых пчелами в своей жизнедеятельности.

С целью доказательства этого предположения на кафедре внутренних незаразных болезней, клинической диагностики и фармакологии Башгосагроуниверситета были исследованы острая токсичность и фармакологическая активность основного компонента вышеназванных феромонных препаратов – 9-ОДК.

Материалы и методы

Острую токсичность 9-ОДК определяли общепринятыми методами на 36 белых беспородных калиброванных мышах массой 18-20 г. Перед опытом животные выдерживались в одинаковых условиях кормления и содержания в течение 10 дней. На каждую испытываемую дозу препарата брали не менее 6 животных, подобранных по принципу аналогов. Исследуемое соединение использовали в виде водного раствора и применяли перорально при помощи специальной поилки. После приема за опытными животными вели наблюдение в течение 7-10 дней с регистрацией времени наступления токсикоза и гибели. На основании данных гибели животных от разных доз исследуемого соединения, методом интегрирования по Беренсу устанавливали абсолютно смертельную дозу (LD_{100}) и максимально переносимую дозу (LD_0). Значения LD_{16} и LD_{84} , найденные по построенной на основании интегрированных данных характеристической кривой, использованы для определения коэффициента вариабельности смертельных доз. Дозу,

вызывающую гибель половины животных LD_{50} , рассчитывали по формуле Кербера. Среднюю ошибку LD_{50} определяли по формуле Гаддэма.

Для воспроизведения острых воспалительных отеков у мышей массой 18-20 г в качестве флогенных агентов использовали 2%-ный раствор лидокаина гидрохлорида, 10%-ный раствор яичного белка и 3%-ный раствор формалина в дозах 0.05 мл субплантарно в лапку. Водный раствор 9-ОДК вводили внутривенно (0.1-0.3 мг/кг) при помощи зонда по следующей схеме: за 1 ч до введения флогена, непосредственно после его введения, а также через 1 и 2 ч после. Через 3 ч проводили измерение угнетения отека лапок мышей. Животным контрольной группы внутрь вводили 1 мл дистиллированной воды. Препаратом сравнения служил ортофен (8 мг/кг).

Противовоспалительную активность рассчитывали по формуле:

$$\% \text{ угнетения воспаления} = \frac{V_0 + V_k}{V_k} ,$$

где V_0 — среднее увеличение объема лапки в опытной группе, V_k — среднее увеличение объема лапки в контрольной группе.

Иммунотропные свойства водного раствора 9-ОДК (0.1-0.4 мг/кг перорально) и препарата сравнения оксиметилурацила (50 мг/кг) определяли по влиянию на количество антителообразующих клеток (АОК) в селезенке иммунизированных самцов белых неинбредных мышей массой 18-20 г с помощью метода локального гемолиза в жидкой фазе. Для иммунизации животных в качестве антигена использовали эритроциты барана, трижды отмытые физиологическим раствором. Антиген вводили внутривенно в оптимальной дозе 2×10^8 клеток на 20 г массы животного. Определение числа АОК производили на 5 сутки после введения эритроцитов барана. Забой животных проводили под эфирным наркозом путем цервикальной дислокации. Из навески селезенки, используя гомогенизатор и среду 199, получали взвесь спленоцитов, которую смешивали в равных объемах (по 0,1 мл) с 10% взвесью эритроцитов барана и комплементом. Сухой комплемент предварительно разводили в 5 мл среды 199. В работе использовали те же эритроциты, которыми проводилась иммунизация животных. Специальные камеры, предварительно изготовленные из предметных и покровных стекол, заполняли смесью спленоцитов, эритроцитов барана и комплемента. Камеры герметизировали парафином, укладывали в чашки Петри, на дне которых находилась влажная фильтровальная бумага, и помещали в термостат при температуре 37.0°C на 1 ч. Во время инкубации секретируемые антитела фиксировались на эритроцитах барана, вызывая в присутствии комплемента иммунный гемолиз. Вокруг клеток, образующих антитела, возникали прозрачные зоны гемолиза, подсчет которых проводили с помощью лупы, дающей 5-кратное увеличение. Для оценки иммунного ответа проводили подсчет количества АОК в селезенке на 10^6 клеток и на весь орган, используя следующие формулы:

1. Количество АОК на 10^6 спленоцитов = число АОК во всей селезенке / число спленоцитов, в млн.

2. Количество спленоцитов во всей селезенке = число спленоцитов в 1 мм^3 (1 мкл) \times 5000.

Антибактериальные свойства 9-ОДК изучали на моделях инфекций, вызываемых золотистым стафилококком, протеем, кишечной и синегнойной палочками у белых неинбредных мышей. Водные растворы изучаемого соединения выпаивали в дозах 0.1-0.4 мг/кг ежедневно в течение 7 дней до заражения и последующие 3 дня. На 7-й день лабораторных животных заражали суточной культурой патогенных микроорганизмов введением ее суспензии внутривенно в объеме 0.5 мл физиологического раствора. Золотистый стафилококк вводили в дозе 2.5 млрд. микробных тел на 20 г массы, кишечную палочку – 1,5 млрд., протей – 2,0 млрд., синегнойную палочку – 2,5 млн. Лабораторные животные находились под наблюдением 10 дней. Эффективность антибактериального действия водных растворов 9-ОДК оценивали по выживаемости и продолжительности жизни лабораторных животных. В качестве препарата сравнения

применяли мастаэрозоль.

Ранозаживляющее действие 9-ОДК в форме 0.3-, 0.4-, 0.5%-ных мазей на основе смеси вазелина и ланолина, содержащей 5% диметилсульфоксида, изучали на моделях лоскутной раны и термического ожога на белых беспородных крысах массой 180-200 г. Для сравнения применяли 5%-ную мазь метилурацила.

Для воспроизведения лоскутной раны на боковой поверхности тела крысы удаляли шерстный покров и участок кожи площадью 10 x 10 мм² до фасции. Для воспроизведения ожогов пользовались кипящей водой, время экспозиции – 10 сек. На следующий день на кальку срисовывали раны (ожоги) и определяли исходные средние площади. Спустя 5, 10, 15 и 20 дней рассчитывали индексы заживления ран или ожогов (ИЗР) по формуле :

$$\text{ИЗР} = 3.14 \times \frac{\sum \text{диаметров}}{4} ;$$

При изучении антитоксических (антидотных) свойств 9-ОДК и 10-ГДК соответственно в качестве ксенобиотиков были выбраны широко используемые в сельском хозяйстве пестициды – фунгицид Дивидент и гербицид Банвел [3], вводимые перорально в виде водных растворов в дозах 648-3885 и 885-3540 мг/кг массы тела соответственно. Исследовали 216 белых беспородных калиброванных мышей массой 18-20 г. Перед опытом животные прошли карантин: в течение 10 дней условия их кормления и содержания были одинаковыми. Предварительно на 60 мышах были установлены параметры общей токсичности Банвела и Дивидента, что позволило выбрать дозы пестицидов для последующих экспериментов. В следующей серии опытов изучались антитоксические свойства 9-ОДК и 10-ГДК при остром отравлении животных вышеназванными пестицидами. С этой целью мышам за сутки до эксперимента, а также в течение недели после дачи ядохимиката вместо питьевой воды выпаивали водный раствор 9-ОДК и 10-ГДК в дозе 0,3 мг/кг. В контрольной группе мыши получали только воду. Наблюдения за животными осуществляли в течение двух недель, обращая внимание на наступление клинических признаков отравления, их характер, сроки гибели, число павших животных в группах.

Результаты и обсуждение

Так, при изучении антибактериальной активности 9-ОДК на экспериментальную инфекцию, вызванную золотистым стафилококком, в группе животных, получавших 9-ОДК в дозе 0,3 мг/кг, выжило на 3-й и 10-й дни по 18 из 20 животных. При применении препарата сравнения *мастаэрозоля*, соответственно 13 и 7 животных. В контрольной группе на 3-й день выжили две мыши, а на 10-день погибли все животные. Аналогичные, подтверждающие антимикробную активность 9-ОДК данные, получили также на животных, зараженных протеом, кишечной и синегнойной палочками.

Испытания 9-ОДК в качестве иммуномодулятора, проведенные традиционным методом оценки изменения В-звена иммунитета – определением числа антителобразующих клеток (АОК) в селезенке, показали, что исследуемое соединение стимулирует образование АОК, проявляя в дозе 0,3 мг/кг максимальную активность, превышающую в 4,2 раза таковую для широко используемого в медицине *оксиметилурацила* (в дозе 50 мг/кг).

Изучение скоростей заживления лоскутных ран и термических ожогов также выявило высокую биологическую активность 9-ОДК как ускорителя клеточного размножения в процессах восстановительной регенерации. Например, полное заживление ран в группе животных, ежедневно обрабатываемых 0,3%-й мазью 9-ОДК, наступило на 16-й ($\pm 0,2$) день; 5%-я мазь *метилурацила* (препарат для сравнения) обладала меньшими репаративными свойствами – полное заживление произошло на 20-й ($\pm 0,4$) день; у контрольных животных заживление ран наступило лишь на 27-й ($\pm 0,2$) день. Аналогичные исследования по заживлению термических ожогов также подтвердили высокую эффективность 0,3%-й мази 9-ОДК.

Кроме того установлена высокая противовоспалительная активность 9-ОДК на моделях формалинового, белкового и лидокаинового воспалений, по сравнению с контролем, а также более высокая антифлогистическая активность на двух последних моделях по сравнению с *ортофеном* – официальным препаратом, широко применяемым в ветеринарии и медицине.

Водные растворы 9-ОДК- и 10-ГДК в дозе 0,3 мг/кг, заменяющие питьевую воду во время отравления пестицидами, увеличивают среднесмертельные дозы Банвела (в 2,8 и 2,04 раза соответственно) и Дивидента (в 2,3 и 1,6 раза соответственно) и обладают значительным антидотным действием.

В заключение можно высказать вполне достоверное предположение, что подкормка пчел феромонными композициями «Аписил» и «Кандисил» (на основе 9-ОДК) и «Биосил» (10-ГДК) будет способствовать оздоровлению пчелиных семей и повышению их устойчивости к отравлениям, что определяется значительной фармакологической и антидотной активностью их составляющих.

Выводы

Совместными исследованиями ученых – химиков и ветеринаров выявлен целый комплекс ранее неизвестных замечательных фармакологических свойств полного синтетического аналога «маточного вещества» - многофункционального феромона медоносных пчел.

Литература

1. Кузьмина К. А. Лечение пчелиным медом и ядом // Изд-во Саратовского университета. – 1973. – 90 с.
2. Иимуратов Г. Ю., Иимуратова Н. М., Толстиков Г. А.. Наступит ли феромонный бум в России? // Вестник РАСХН. – 2002. – № 6. – С. 81-82.
3. Лужников Е.А. Клиническая токсикология.- М.: Медицина, 1982.- 327 с.

Резюме

Joint research of chemists and veterinary scientists revealed a set of formerly unknown remarkable pharmacological properties which are synthetic fully analogous to “queen-cell matter” – multifunctional pheromone of honey bee.

КОЛОДЯЖНАЯ Я.С.¹, КОЧЕТОВ А.В.¹, КИРСАНОВА С.Н.²

¹Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, 630090, факс (383)333 12 78, e-mail: jana_k@bionet.nsc.ru

²ГНУ Всероссийский институт картофельного хозяйства РАСХН, Московская область, Россия

ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫЕ РАСТЕНИЯ ТАБАКА (*Nicotiana tabacum* L.) И КАРТОФЕЛЯ (*Solanum tuberosum* L.), ХАРАКТЕРИЗУЮЩИЕСЯ ПОВЫШЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ К ЗАСОЛЕНИЮ

Различные абиотические стрессы, такие как холод, засуха, засоление, затопление, воздействие критических температур, токсические концентрации тяжелых металлов, высокая кислотность или щелочность почв, повышенное содержание озона, дефицит элементов минерального питания, изменение уровня освещенности и т.д. снижают продуктивность сельскохозяйственных растений в два раза и более, а при высокой выраженности и достаточно долгой продолжительности стресса приводят их к гибели.

В стрессовых условиях у растений происходит индукция генов, контролирующих синтез соединений, вызывающих ответную реакцию растений на абиотические стрессы (осмопротекторов и нейтрализаторов свободных радикалов (Bohnert, Sheveleva, 1998); белков поздних стадий эмбриогенеза (Ingram, Bartels, 1996;

Tomashoff, 1999; Bray et al, 2000), усиливается синтез антиоксидантных ферментов, белков теплового шока и шаперонов; соединений, участвующих в поглощении и транспорте воды и ионов, таких как аквапорины и транспортеры ионов (Serrano et al, 1999; Tyerman et al, 1999; Blumbald, 2000; Chapman, 1998; Frank et al, 2000), ферментов синтеза и деградации совместимых осмолитов – низкомолекулярных органических соединений, которые в высоких концентрациях не тормозят протекание клеточного метаболизма. К таким осмолитам относятся аминокислоты (пролин, аланин), четвертичные ионы (бетаин, глицин-бетаин), сахара и сахароспирты (маннитол, сорбитол, трегалоза, инозитол), углеводы. Они понижают водный потенциал клеток, защищают ферменты от инактивации, обеспечивают целостность структурных белков и пр. (Delauney and Verma, 1993; Кузнецов, Старостенко, 1994; Кузнецов, Шевякова, 1999; Willenbrink and Husemann, 1995; Eimer, 2004; Кузнецов, Дмитриева, 2006; Groppe, Benavides, 2008). Известно, что при абиотических стрессах: засолении, засухе, пониженной и повышенной температуре происходит увеличение уровня пролина. Содержание пролина в стрессовых условиях может достигать 10% от сухой массы листьев, однако в большинстве случаев оно составляет 20-30 мг/г сухой массы. Данные по корреляции содержания пролина и устойчивости к абиотическим стрессам довольно противоречивы, что в определенной мере связано с значительными колебаниями содержания этой аминокислоты в разные периоды роста растений и даже в течение суток.

Материалы и методы

В качестве экспериментального материала были взяты полученные нами ранее генетически модифицированные (ГМ) растения табака и картофеля (сорта Никулинский), экспрессирующие ген пролиндегидрогеназы арабидопсиса, расположенный в антисмысловой ориентации (Кочетов и др., 2004; Колодяжная и др., 2006; Колодяжная и др., 2007). Данные ГМ растения характеризовались повышенным уровнем пролина. В качестве контроля были взяты нетрансгенные растения табака и картофеля.

Оценка солеустойчивости. Согласно данным других экспериментаторов, наличие 200 мМ хлорида натрия является токсичной концентрацией для взрослых растений табака, для картофеля эта величина составляет 100 мМ (Delauney and Verma, 1993). Был проведен ряд экспериментов по определению солеустойчивости растений:

1. Растения табака на стадии двух пар настоящих листьев, выращенные на среде MS, пересаживали на среду, содержащую хлорид натрия в концентрации 300, 400 и 500 мМ NaCl.
2. Оценка уровня обводненности растений. В эксперимент брали растения табака, находящиеся на стадии двух пар настоящих листьев. Их пересаживали на среду MS (контроль) и на MS с добавлением 300 мМ NaCl. Через 4-5 недель культивирования проводили взвешивание надземной части растений. Затем для определения сухой массы проводили высушивание при 70⁰С в течение суток. Содержание воды определяли как:

$$\frac{\text{вес растения (г)} - \text{сухой вес растения (г)}}{\text{вес растения (г)}} \cdot 100 \%$$

3. Полученные пробирочные трансгенные растения картофеля были высажены на среды с добавлением 150 мМ NaCl.
4. Пробирочные растения картофеля высаживали в летнюю теплицу на стеллажи с питательным грунтом на основе торфа с примесью органического удобрения (биогумуса) и влагоудерживающего гидрогеля в пластмассовые горшки диаметром 18 см. Контрольным растениям полив проводили 2 раза в неделю. А для исследования солеустойчивости опытных растений через 45 дней после посадки прекращали полив водой и поливали раствором NaCl в концентрации 30 г/л. Расход раствора NaCl

составлял 200 мл на 1 растение. Каждый вариант был представлен 10 ГМ и 10 контрольными растениями.

Для статистической оценки экспериментальных наблюдений использовали *t* – критерий Стьюдента для сравнения средних арифметических значений малых выборок.

Результаты и обсуждение

При росте на среде MS с добавлением 300, 400 и 500 мМ NaCl наблюдалось замедление роста как контрольных, так и ГМ растений табака. Однако, у ГМ растений замедление роста не так сильно выражено, о чем можно было судить по весу зеленой массы растений. У растений контрольной линии SR1 на среде с 300 мМ NaCl через 3 отмечено появление хлоротичных проростков, наблюдается замедление темпов роста. Концентрация 400 мМ является для них летальной (рис.1). При этом ГМ растения способны пережить стрессовую концентрацию, равную 500 мМ, в течение 3 недель.

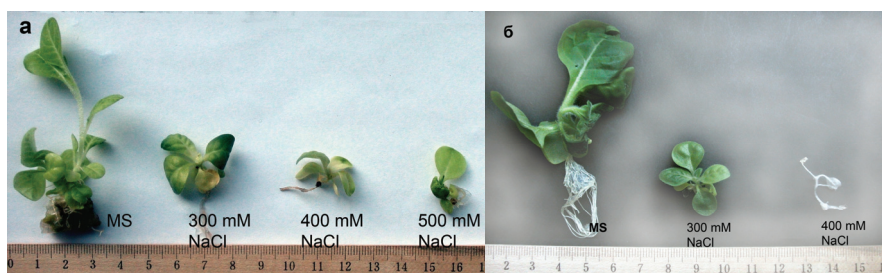


Рис.1. Рост ГМ (а) растений и растений табака сорта SR1 (б) на среде с добавлением соли

Также был оценен уровень обводненности тканей. Обнаружено, что на среде MS и на среде с добавлением 200 мМ NaCl уровень обводненности у всех растений одинаков: 91-93%. Но при культивировании на среде с содержанием соли 300 мМ этот показатель у контрольных растений составляет уже 75-80%, в то время как у трансгенных растений в присутствии 300 мМ соли это значение остается неизменным (92-93%) (рис. 2). Результаты этих экспериментов свидетельствуют о том, что у ГМ растений табака при засолении не происходит нарушения водного статуса. По-видимому, большая водоудерживающая способность тканей ГМ растений в условиях интенсивного засоления по сравнению с растениями сорта SR1 обусловлена более интенсивным стресс зависимым накоплением пролина, который выступает в качестве осморегулятора (Flowers et al., 1977; Кузнецов, Шевякова, 1999).

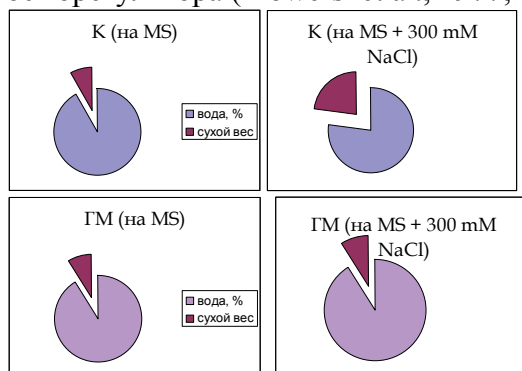


Рис. 2. Уровень обводненности листьев ГМ и контрольных (К) растений табака при выращивании в нормальных условиях и при добавлении хлорида натрия.

При выращивании пробирочных растений картофеля на среде с добавлением 150 мМ хлорида натрия было выявлено явное преимущество части генетически модифицированных растений. Как видно на рисунке 3, для контрольных растений эта концентрация является летальной. В то время как трансгенные растения картофеля способны выживать при таком уровне засоления.



Рис.3 . Рост растений картофеля на среде MS (1, 6) и на среде MS с добавлением 150 мМ хлорида натрия (2, 5 – ГМ растение; 3, 4 – контроль)

Эти трансгенные растения были расклонированы и высажены в грунт. В первый месяц после высадки ГМ линии обгоняли исходный сорт по приросту биомассы. В дальнейшем трансгенные растения по фенотипу практически не отличались от контроля.

В условиях стресса (засоления почвы) трансгенные линии сорта Никулинский превосходили контроль по урожайности в 2-3 раза. При этом клубни были более выровненные. Возможно, опережающий старт развития дает возможность трансгенным растениям завязать большее количество клубней, которые затем успевают сформироваться за счет оттока питательных веществ из ботвы даже в стрессовых условиях.

Таким образом, полученные нами ГМ растения обладают повышенной устойчивостью к засолению. Вероятно, трансгенные растения, синтезируя и накапливая в цитозоле пролин, могут гораздо быстрее понижать осмотический потенциал, удерживая воду, что обеспечивает стрессоустойчивость. Эти растения не отличаются фенотипически от растений исходного сорта, по-видимому, этот подход можно применять для модификации растений с целью получения форм, способных расти в условиях абиотического стресса, а также использовать данный подход для изучения роли пролина в обеспечении устойчивости к другим видам стресса.

Литература

1. Кочетов А.В., Титов С.Е., Колодяжная Я.С. и др. Повышение содержания пролина и осмотического давления клеточного сока у трансформантов табака, несущих антисмысловой супрессор гена пролиндегидрогеназы // Генетика. 2004. Т.40. № 2. С.282-285
2. Колодяжная Я.С., Титов С.Е., Кочетов А.В., Комарова М.Л., Романова А.В., Коваль В.С., Шумный В.К. Оценка солеустойчивости растений табака *Nicotiana tabacum*, несущих антисмысловой супрессор гена пролиндегидрогеназы // Генетика. 2006. V.42. № 2. pp.278-281
3. Колодяжная Я.С., Титов С.Е., Кочетов А.В. Перспективы получения ГМ растений картофеля, несущих антисмысловой супрессор гена пролиндегидрогеназы и обладающих повышенной устойчивостью к абиотическим стрессам // Минск. 2007. В сб.: Картофелеводство. Т.12. С. 37-42
4. Кузнецов Вл. В., Старостенко Н. В. Синтез белков теплового шока и их вклад в выживание интактных растений огурца при гипертермии // Физиол. Растений.-1994.- Т.41. №3.- С.374-380.
5. Кузнецов В.В., Шевякова Н.И. Пролин при стрессе: биологическая роль, метаболизм, регуляция // Физиол. растений.-1999.-46.-С.321-336.
6. Кузнецов В.В., Дмитриева Г.А. Физиология растений. М.. 2006. 742с.
7. Delauney A.J., Verma D.P.S. Proline biosynthesis and osmoregulation in plants // Plant J.-1993.- 4.-P. 215-223.

8. *Groppa M.D., Benavides M.P.* Polyamines and abiotic stress: recent advances // *Amino Acids*.-2008.-34.- P. 35-45

Резюме

Проведен анализ стрессоустойчивости генетически модифицированных растений табака и картофеля, несущих антисмысловой супрессор гена пролиндегидрогеназы и характеризующихся повышенным содержанием пролина. Показано, что полученные растения характеризуются повышенной устойчивостью к засолению.

We studied the stress resistance of genetically modified (GM) tobacco and potato plants bearing an antisense suppressor of the gene for proline dehydrogenase. Such plants are characterized by elevated proline content. The transgenic plants were shown to have elevated salt tolerance.

КОПИЛОВ К.В., КОПИЛОВА К.В., КОВТУН С.І.

Институт розведення і генетики тварин УААН

*Україна, 08321, Київська обл., Бориспільський р-н., с. Чубинське, вул. Погребняка, 1,
e-mail: kovtun_si@gala.net*

ВИКОРИСТАННЯ МЕТОДІВ ДНК-АНАЛІЗУ ПРИ ВИЗНАЧЕННІ СТАТІ ТА ГЕНОТИПУВАННІ ДОІМПЛАНТАЦІЙНИХ ЕМБРІОНІВ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ

Одним із основних завдань розвитку тваринництва України є впровадження у практику племінної справи сучасних методів ДНК-технологій з метою вдосконалення і підвищення ефективності селекційної роботи. Останні наукові розробки при дослідженні геному різних видів сільськогосподарських тварин на рівні ДНК, порівняно із класичними методами досліджень, дозволяють за більш короткий термін і на рівні носія спадкової інформації одержувати дані щодо особливостей генетичної структури, а також виявляти генетичні аномалії без застосування складного і дорогого методу генетичної експертизи за нащадками. Основу сучасних методів ДНК-аналізу складає використання маркерних систем поліморфних нуклеотидних послідовностей ДНК, що дозволяють тестувати генетичний поліморфізм безпосередньо на рівні генів.

Впровадження у практику сучасних методів ДНК-аналізу в Європейських країнах та США дає можливість отримати прибутки за рахунок скорочення часу генераційного інтервалу, раннього введення маточного поголів'я в процес відтворення та застосування різних молекулярно-генетичних маркерів, що дозволяють вести селекцію за допомогою маркерів (Marker Assisted Selection – MAS), тобто проводити підбір та добір батьківських пар певних генотипів та отримувати нащадків з відповідним генетичним потенціалом щодо основних показників продуктивності. У США, Німеччині селекція за В-алелем гена капа-казеїну включена до програм з відтворення великої рогатої худоби [1]. Крім цього, для підвищення ефективності ведення спеціалізованого скотарства вимагає впровадження економічно доцільних, сучасних методів ведення селекційної роботи одним з яких є визначення статі та генотипу доімплантаційних ембріонів [2, 3]. Цей метод дозволяє одержувати та відбирати ембріони, які мають племінну цінність та бажану стать і забезпечує можливість трансплантації декількох ембріонів одному реципієнту.

З метою розробки та впровадження швидкого методу визначення статі ембріонів великої рогатої худоби нами проведена робота з оптимізації умов ідентифікації статі доімплантаційних ембріонів із одночасним застосуванням Y-специфічних та X-специфічних праймерів методом полімеразної ланцюгової реакції

(ПЛР) без наступного рестриктного аналізу фрагментів. Також виконані дослідження з генотипування ембріонів за генами продуктивності методом ПЛР-ПДРФ (поліморфізм довжин рестрикційних фрагментів) за геном капа – казеїну. З допомогою цього ДНК-аналізу скорочується процедура і спрощується інтерпретація одержаних результатів.

Матеріали і методи

Для відпрацювання методу визначення статі доімплантаційних ембріонів великої рогатої худоби та проведення ДНК-аналізу за геном продуктивності капа-казеїном було використано 12 штук 8-16-клітинних ембріонів, одержаних *in vitro*. Для цього дозрілі поза організмом яйцеклітини корів осіменяли *in vitro* вилученими із придатків сім'яників сперматозоїдами бугая і співкультивували гамети протягом 18 год. Потім сформовані поза організмом зиготи культивували *in vitro* в середовищі 199 на розчині Ерла (Sigma) з 10% фетальної сироватки крові корів 2 доби.

З метою перевірки відповідності отриманих результатів контролем були зразки ДНК тварин з відомою статтю (20 голів бугаїв та 20 голів корів).

ДНК ембріонів отримували шляхом перенесення їх в 0,5мл ПЛР-пробірки типу «Ependorf» з 3-5мкл деіонізованої води (Sigma). Зразки заморожували-розморожували 2-3 рази при -20°C для звільнення ДНК з бластомерів.

ДНК з периферійної крові великої рогатої худоби виділяли за допомогою системи «Сорб - Б» та за наступною методикою. Кров для досліджень брали з яремної вени тварин у пробірки з цитратом натрію. До 200 мкл цільної крові додавали 1 мл деіонізованої води і піддавали зразок заморожуванню-розморожуванню. Центрифугували протягом 5 хв. при 7 тис. об/хв. для осадження лейкоцитів. Повторювали процедуру до появи безбарвного осаду з додаванням 500 мкл розчину, що містить 25мМ ЕДТА, рН 8,0 і 75 мМ NaCl. Зразок інкубували 120 хв. при $+56^{\circ}\text{C}$. Для очищення ДНК від наявних у ній протеїнів і жирів суміш екстрагували в 500 мкл хлороформу і знову інкубували 30 хв. при кімнатній температурі. Після центрифугування (5 хв. при 14 тис. об/хв.) протеїни і жири осаджувалися в нижній фракції з хлороформом, а ДНК залишалася у верхній водяній фазі. В ДНК-розчин додавали такий же об'єм ізопропілового спирту. Зразок витримували від 30 до 180 хв. при -20°C , і центрифугували 15 хв. при 14 тис. об/хв. Після видалення рідкої фази ДНК-осад промивали 70 % розчином етанолу і очищену фракцію ДНК висушували при кімнатній температурі, а потім розчиняли в 50 мкл деіонізованої води. Концентрацію ДНК перевіряли за допомогою методу електрофорезу в 2% агарозному гелі.

Для тестування продуктів ампліфікації використовували 2% агарозні гелі з наступним їх фарбуванням в розчині бромістого етидію. Візуалізацію здійснювали на транслюмінаторі в ультрофіолетовому світлі з наступним фотографуванням електрофореграм цифровою камерою. Диференціацію ампліконів за розмірами проводили за допомогою маркера молекулярної ваги DNA-Ladder 50bp («Fermentas»).

Результати і обговорення

В результаті проведених досліджень щодо відпрацювання та оптимізації кращого перебігу ампліфікації нами були підібрані оптимальні температурні та часові режими проведення ПЛР, а також склад реакційної суміші. Встановлено, що оптимальним є наступний склад реакційної суміші: 10-х ПЛР-буфер (100 мМ Tris HCL, рН- 8,8; 500 мМ KCl, 0,8% Nonidet P40); 25мМ MgCl_2 – 1,5мМ; 2мМ dNTP – 0,5 мМ кожного; Taq – полімераза (1,25U/50мкл). ДНК 50 – 100 нг/25 мкл. Суміш доводили до загального об'єму 25 мкл деіонізованою водою.

Підтверджено нами, що для ампліфікації найбільш ефективним є використання двох пар праймерів: одна – специфічна для Y-хромосоми великої рогатої худоби, яка була підібрана відповідно до Patent Cooperation Treaty No/WO 89/07154 [4], друга – видоспецифічна для великої рогатої худоби [5]. Умови ампліфікації пов'язані з температурою відпалу виявилася в результаті досліджень універсальними для перелічених праймерів і складала $+65^{\circ}\text{C}$.

Встановлено, що синтез фрагментів ДНК проходить за 35 циклів ампліфікації на термоциклері «Терцик» («ДНК – технологія», Москва): початкової денатурації – при +94°C, 5 хв.; відпал праймерів – +65°C, 45 сек.; синтез – +72°C, 45 сек.; денатурація – +94°C, 30 сек. Реакцію завершували етапом елонгації – +72°C, 5 хв.

Підібрані нами умови були перевірені на ДНК тварин відомої статі. Встановлено, що довжина специфічного для Y-хромосоми продукту ампліфікації у великої рогатої худоби складає 173 пар нуклеотидів (п.н.), а довжина X-специфічного фрагмента – 216 п.н. У корів спостерігався один амплікон розміром у 216 п.н., а у бугаїв два фрагмента розміром 173 п.н. та 216 п.н. (рис.1).

В результаті проведення ДНК-аналізу щодо відпрацювання методу визначення статі доїмплантаційних ембріонів великої рогатої худоби нами були одержані такі результати: з 12 досліджених ембріонів вісім мали по одному фрагменту розміром 216 п.н., що вказує на їх жіночу стать і чотири ембріона мали по 2-фрагмента розміром в 216 п.н. і 173 п.н., тобто чоловічої статі.

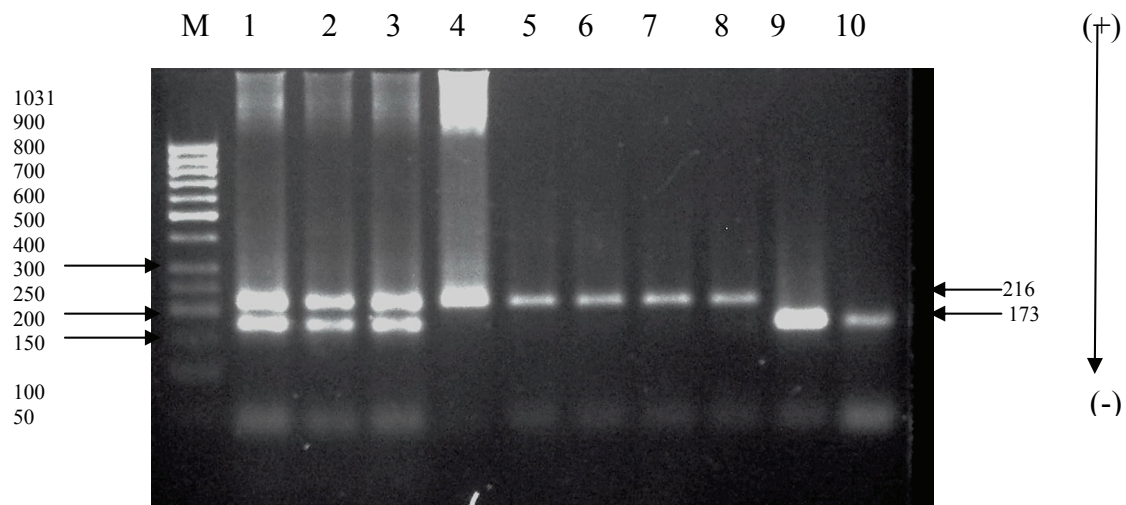


Рис.1. Електрофореграма продуктів ампліфікації з X та Y специфічними праймерами Доріжки: Маркер молекулярної ваги DNA-Ladder 50bp;
1. Ембріон (бугай); 2.Ембріон (бугай); 3. Ембріон (бугай); 4.Ембріон (корова);
5. Ембріон (корова); 6. Ембріон (корова); 7. Ембріон (корова); 8. Ембріон (корова); 9.
Бугай (Y); 10. Бугай (Y).

гену капа-казеїну методом ПЛР-ПДРФ. Ген капа-казеїну є маркером якості молока. Відомо, що А- і В-алелі гена капа-казеїна (CSN3), одного з основних білків молока, мають нерівнозначну господарську цінність. Наявність у молоці великої рогатої худоби В-алеля CSN3 дозволяє одержувати з такого молока високоякісні сири і як наслідок підвищувати рентабельність їх виробництва. В результаті проведення ДНК-аналізу нами були підібрані оптимальні умови перебігу ПЛР.

Для гену CSN3 були підібрані і штучно синтезовані наступні праймери і підібрана рестриктаза Hind III. Праймери: 5'GAAATCCCTACCATCAATACC-3'; 5'CCATCTACGCTAGTTTAGATG-3'. Умови ампліфікації: початкова денатурація +95°C – 2 хв., денатурація +95°C – 30 сек.; відпал праймерів +61°C – 30 сек; синтез +72°C – 1 хв.; кінцевий синтез +72°C – 5 хв.; 35 циклів ампліфікації.

Продукт ампліфікації гена CNS3 з вказаними в розділі матеріали та методи праймерами включав ділянку 4-го екзона і 4-го інтрона гена. Після рестрикції цього фрагмента рестриктазою Hind III виявляли два алельних варіанта А і В. У носіїв генотипу АА сайт рестрикції для цієї рестриктази відсутній і присутній нерестриційний продукт ампліфікації розміром 273 п.н. У тварин з генотипом ВВ після рестрикції виявляли два фрагменти довжиною 182 і 91 п.н (рис. 2). Варіант В гена CNS3 характеризується наявністю двох точкових мутацій, в положеннях 136 і

148, які призводять до амінокислотних замінів Туг на Пе і Ala на Asp. Генотип AA спостерігався у сімох досліджених ембріонів, а п'ять ембріонів мали генотип АВ.

Висновки

Застосований нами метод щодо визначення статі доімплантаційних ембріонів великої рогатої худоби дає можливість одночасно проводити ампліфікацію як X, так і Y – послідовностей хромосом, що скорочує час формування результатів, який складає в середньому 4 години. Впровадження сучасних генетико-біотехнологічних методів в тваринництві дає можливість одночасно проводити трансплантацію ембріонів з вже відомою статтю та визначеними генотипами, що може мати в перспективі суттєвий економічний ефект.

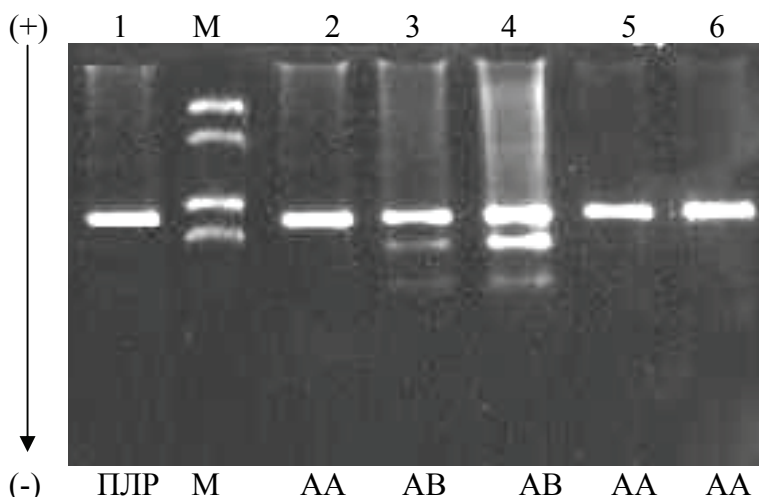


Рис.2. Спектри рестрикційних фрагментів гена капа-казеїна у ембріонів великої рогатої худоби, оброблених рестриктазою Hind III. Доріжки: 1 – продукт ПЛР без рестрикції (273 п.н.); М – маркер молекулярної ваги Ladder, Lov Range; 2, 5, 6 – гомозиготні тварини з генотипом AA; 3, 4 - гетерозиготні тварини з генотипом АВ.

Література

1. *Schaar J., Hansson B., Pettersson H.* Effects of genetic variants of κ -casein and beta-lactoglobulin on cheese-making // *J. Dairy Res.* - 1985. - V.52. - P. 429-437..
2. *Machaty Z., Paldi A., Csaki T., et al.* Biopsy and sex determination by PCR of IVF bovine embryos // *Reproduction and Fertility.*- 1993.- №. 98 . – P.467-470.
3. *Зиновьева Н., Брем Г.* Определение пола предимплантационных эмбрионов крупного рогатого скота путем аллель-специфической амплификации генов ZFX и ZFY // *Биотехнология.*- 1995.- №1-2.- С.50-53.
4. *Reed K.C., Mattheaei K.I., Mann D.A., Mattheews M.A.* Determination of genetic sex in ruminants using Y-chromosome specific polynucleotides.-1989.-Patent Cooperation Treaty No/WO 89/07154.
5. *Plucienniczak A, Skowronski J, Jaworski J.* Nucleotide sequence of bovine 1.715 satellite DNA and its relation to other bovine satellite sequences // *Mol.Biol.*-1982.-№158.-P.293-304.

Резюме

Представлены результаты по подбору условий и одновременной амплификации как X- так и Y-последовательностей хромосом методом полимеразной цепной реакции без последующего рестриктного анализа для определения пола доимплантационных эмбрионов крупного рогатого скота и их генотипирования по гену каппа-казеина.

The results of selection conditions and the simultaneous amplification X and Y sequences of chromosomes are presented by using polymerase chain reaction, without following restriction analyze for sex determination bovine embryos and their kappa-casein locus genotyping.

**КРУГЛОВА Н.Н., СЕЛЬДИМИРОВА О.А., КАТАСОНОВА А.А.,
ЗАЙЦЕВ Д.Ю., КРУГЛОВА А.Е.**

*Институт биологии Уфимского НЦ РАН,
Россия, 450054, Уфа, пр. Октября, 69, e-mail: Kruglova@anrb.ru*

БИОТЕХНОЛОГИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ АНДРОКЛИННОЙ ГАПЛОИДИИ ЯРОВОЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ *IN VITRO* НА ОСНОВЕ КОМПЛЕКСА ЦИТОЭМБРИОЛОГИЧЕСКИХ И ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ДАННЫХ

Пыльник представляет собой фертильную часть тычинки, в гнездах которого клетки спорогенной ткани формируют микроспороциты, которые претерпевают мейотические деления и дают начало гаплоидным микроспорам. Микроспоры прорастают в пыльцевые зерна – мужские гаметофиты [Банникова, Хведынич, 1982]. Однако в строго определенных контролируемых условиях культуры *in vitro*, как правило, под действием стрессовых факторов можно изменить программу развития гаплоидной микроспоры на путь формирования гаплоидного растения-спорофита. Это процесс получил название «андроклиния» (от греч. *ανδρoς* – мужской, *κλίνοc* – имеющий склонность) [Хохлов, 1976; Круглова, 2001; Круглова с соавт., 2005; Батыгина с соавт., 2008]. В западной литературе широко распространен термин «андрогенез *in vitro*» [Androgenesis and haploid plants, 1998; и др.]. Таким образом, суть феномена андроклинии состоит в переключении программы развития морфогенетически компетентной гаплоидной клетки-микроспоры с обычного гаметофитного пути (образование пыльцевого зерна) на иной путь – спорофитный (образование гаплоидного растения) в условиях культуры *in vitro*. Полученные гаплоидные растения представляют собой клоны, сохраняющие генотип исходных хозяйственно ценных донорных растений. Основное преимущество их использования состоит в возможности быстрого получения гомозиготных линий, что облегчает селекцию фенотипов по качественным и количественным признакам. Все это имеет, безусловно, большое значение в биотехнологических исследованиях яровой мягкой пшеницы – основного хлебного злака.

Материалы и методы

Материалом для исследования послужили 7 сортов (Саратовская 55, Башкирская 24, Скала, Жница, Московская 35, Симбирка, Казахстанская 10) и гибридная линия Фотос яровой мягкой пшеницы. Данные сорта отобраны из 178 сортов яровой мягкой пшеницы, активно используемых в селекционных программах Башкирского НИИ СХ РАХН (г. Уфа). Критерием отбора послужила относительно высокая отзывчивость пыльников на условия культуры *in vitro* (более 10 % инокулированных пыльников формируют андроклинные структуры – эмбриониды и каллусы).

В работе использованы: метод культуры *in vitro* пыльников яровой мягкой пшеницы с учетом эмбриологических данных [Круглова, Батыгина, 2002], методы световой микроскопии [Круглова с соавт., 2008], метод иммунофлюоресцентного анализа растительных образцов [Кудоярова с соавт., 1986, 1989], метод иммунолокализации фитогормонов [Веселов с соавт., 1999]. Постоянные препараты окрашивали по методике тройного окрашивания [Камелина с соавт., 1992] и просматривали и документировали с применением цифрового микроскопа проходящего света серии Микровизор μ Vizo-100. Статистическую обработку полученных результатов вели с применением программы Excel, учитывая основные статистические параметры.

Результаты и обсуждение

Экспериментально выявлено, что инициальными клетками андроклинии у яровой мягкой пшеницы являются микроспоры в сильновакуолизированной фазе (по периодизации [Круглова, 1999]). Фенотипические признаки донорных растений яровой

мягкой пшеницы, содержащих пыльники с сильновакуолизированными микроспорами, таковы: кончик колоса, находящегося в листовой обертке, располагается строго на $1/4$ расстояния от основания флагового листа до основания предпоследнего снизу листа (VII этап органогенеза, по [Куперман, 1977]). Такие фенотипические признаки служат морфологическими маркерами для экспресс-диагностики донорных растений и тем самым оптимизации биотехнологии получения гаплоидов. В результате экспериментальных исследований установлено, что индукции андроклинии способствует стрессовое воздействие холодом в эмпирически выявленном режиме ($+4^{\circ}\text{C}$, 7 сут) на пыльники перед их размещением на индукционную питательную среду *in vitro*.

После холодной предобработки пыльники инокулировали в условия *in vitro* на индукционную питательную среду Potato II [Chuang, Ouyang, 1978], а затем на среду для регенерации [Blaydes, 1966], обе – в собственной модификации [Круглова, Батыгина, 2002]. Установлено, что в условиях культуры *in vitro* морфогенез сильновакуолизированных микроспор проходит различными путями (геммогенез, ризогенез, гемморизогенез, эмбриоидогенез). Сопоставление данных цитоэмбриологического анализа и иммуноферментного анализа позволило установить, что индукция конкретного пути морфогенеза *in vitro* сильновакуолизированных микроспор определяется балансом между концентрацией экзогенного ауксина 2,4-Д в модифицированной индукционной питательной среде Potato II и содержанием эндогенного ауксина ИУК в пыльнике в момент инокуляции. Для каждого сорта пшеницы баланс будет своим. Подбор такого баланса позволяет управлять процессом морфогенеза сильновакуолизированных микроспор в культуре *in vitro*, способствуя ускорению получения андроклиных растений яровой мягкой пшеницы при биотехнологических исследованиях.

Выявлено, что биотехнологически оптимальными путями морфогенеза, приводящими к образованию полноценных гаплоидных регенерантов (без процедуры многократных пересадок на питательные среды различного состава), в условиях выполненных экспериментов являются эмбриоидогенез и гемморизогенез.

Эмбриоидогенез состоит в формировании из сильновакуолизированной микроспоры эмбриоида (греч. εμβριον – зародыш, εἶδος – образ) – зародышеподобной структуры (синоним: соматический зародыш). Преимущество эмбриоидогенеза заключается в том, что по данным цитоэмбриологического анализа, единицей репродукции в данном случае является зачаток целого организма - зародышеподобная структура со всеми характерными для зародыша пшеницы органами. В случаях, когда цель конкретной технологии – получить растения-регенеранты, минимизировав соматическую изменчивость, одноклеточное происхождение эмбриоида из микроспоры (и тем самым сохранение генетической однородности) является основой для биотехнологически оптимального способа клонирования полноценных плоносящих гибридов яровой мягкой пшеницы с закрепленным гетерозисным эффектом. Для массового тиражирования растений-регенерантов, а также для повышения соматической изменчивости, например, в целях клеточной селекции, целесообразна регенерация через каллусную культуру. В этом случае оптимален гемморизогенез – сопряженное формирование на морфогенном (способным к регенерации растений-регенерантов) каллусе множественных почек и корней.

Установлены этапы развития инициальной сильновакуолизированной микроспоры до сформированного эмбриоида на индукционной питательной среде Potato II. Показано, что развитие микроспорального эмбриоида *in vitro* принципиально сходно с развитием зиготического зародыша донорного растения пшеницы в естественных условиях.

Выявлены основные этапы развития морфогенного каллуса на индукционной питательной среде Potato II до достижения критической массы. При этом установлен

новый тип каллуса – потенциально морфогенный, способный при определенных условиях развиваться по тем же путям морфогенеза *in vitro*, что и морфогенный каллус. Показано, что способность морфогенного и потенциально морфогенного каллусов к развитию *in vitro* различными путями морфогенеза определяется наличием в их составе так называемых меристематических очагов, состоящих из клеток, обладающих морфогенетическими потенциями. Это подтверждается данными по иммулолокализации эндогенных фитогормонов в каллусах: показано, что ауксины и цитокинины локализуются преимущественно в клетках меристематических очагов. Присутствие этих гормонов характерно для зон роста с активно делящимися меристематическими клетками. Таким образом, локализация гормонов в клетках меристематических очагов подтверждает статус этих клеток как обладающих морфогенетическим потенциалом для дальнейшего развития и являющихся инициальными при индукции различных путей морфогенеза *in vitro* в морфогенных/потенциально морфогенных каллусах.

Сформированные эмбриониды и морфогенные/потенциально морфогенные каллусы, достигшие критической массы, переносили на среду для регенерации. Полученные андроклинные растения выращивали в пробирках до фазы кушения. Далее растения извлекали из пробирок и с помощью цитогенетического контроля отбирали только гаплоидные особи. Их обрабатывали смесью для дигаплоидизации (состав know how). После цитогенетического контроля дигаплоидизированные андроклинные растения переносили в почву, где они развивались до фазы полной спелости зерна. Лабораторная и полевая оценка показали высокую всхожесть полученных семян андроклинных растений. Качество семян подтверждено данными эмбриологического анализа.

Выводы

Биологический феномен андроклинии лежит в основе метода культуры *in vitro* изолированных пыльников – биотехнологического приема, перспективного в современных генетико-селекционных исследованиях растений.

Конкурентные преимущества разработанной на основе использования комплексных цитоэмбриологических и физиологических исследований биотехнологии андроклинной гаплоидии у яровой мягкой пшеницы состоят в получении за сравнительно короткое время гомозиготных константных гаплоидных гибридов 1-го поколения, сохраняющих в генотипе хозяйственно-ценные признаки родительских форм. Использование гаплоидных гибридов облегчает и отбор ценных генотипов, возникающих в результате рекомбинации генетических данных родительских форм. Такой отбор дает возможность ускорить оценку перспективности полученных гибридов. Перевод гаплоидов в дигаплоидное состояние позволяет получать полноценные семена таких растений.

Исследования поддержаны РФФИ (гранты 99-04-48496, 05-04-97911, 05-04-08114, 08-04-97045) и программой «Ведущие научные школы Российской Федерации» (гранты НШ 2148.2003.4, НШ 4834.2006.4).

Литература

1. Банникова В.П., Хведынич О.А. Основы эмбриологии растений. – Киев. – 1982. – 164с.
2. Хохлов С.С. Общие вопросы гаплоидии // Гаплоидия и селекция. – М. – 1976. – С.5-14.
3. Круглова Н.Н. Андроклиния с позиции экспериментальной эмбриологии растений: унификация терминологии // Вестник БГУ. – 2001. – Т. I, № 2. – С.135-137.
4. Круглова Н.Н., Батыгина Т.Б., Горбунова В.Ю., Титова Г.Е., Сельдимирова О.А. Эмбриологические основы андроклинии пшеницы. – М. – 2005. – 99с.
5. Батыгина Т.Б., Круглова Н.Н., Горбунова В.Ю., Егорова О.В., Титова Г.Е., Сельдимирова О.А. От микроспоры к сорту. – М. – 2008. – 134с.

6. *Androgenesis and haploid plants*. – Berlin, Heidelberg, New York. – 1998. – 297p.
7. Круглова Н.Н., Батыгина Т.Б. Методические рекомендации по использованию морфогенетического потенциала пыльника в биотехнологических исследованиях яровой мягкой пшеницы. – Уфа – 2002. – 22с.
8. Круглова Н.Н., Егорова О.В., Сельдимирова О.А. Световой микроскоп как инструмент в биотехнологии растений – Уфа. – 2008. – 122с.
9. Кудоярова Г.Р., Веселов С.Ю., Еркеев М.И. Иммуноферментное определение содержания индолилуксусной кислоты в семенах кукурузы с использованием меченых антител // Физиол. раст. – 1986. – Т. 33, № 6. – С.1221-1227.
10. Кудоярова Г.Р., Веселов С.Ю., Каравайко Н.Н. Иммуноферментная тест-система для определения цитокининов // Физиол. Раст. – 1989. – Т. 37, № 1. – С. 80-89.
11. Веселов С.Ю., Вальке Р.С., Ван Онкелен Х., Кудоярова Г.Р. Содержание и локализация цитокининов в листьях исходных и трансгенных растений табака // Физиол. Раст. – 1999. – Т. 46, № 1. – С.34-40.
12. Камелина О.П., Проскурина О.Б., Жинкина Н.А. К методике окраски эмбриологических препаратов // Ботан. журн. – 1992. – Т. 77, № 4. – С.93-96.
13. Круглова Н.Н. Периодизация развития пыльника злаков как методологический аспект изучения андрогенеза *in vitro* // Известия РАН. Серия биол. – 1999. – № 3. – С.275-281.
14. Куперман Ф.М. Морфофизиология растений. – М. – 1977. – 256 с.
15. Chuang Ch.-Ch., Ouyang T.-W. A set of potato media for wheat anther culture // Proc. Sympos. Plant Tissue Culture. – Peking – 1978. – P.51-56.
16. Blaydes D.F. Interaction of kinetin and variors inhibitors in the growth of soybean // Physiol. Plant. – 1966. – V. 19, № 13. – P.748-753.

Резюме

Приводятся и анализируются основные этапы биотехнологии андроклиной гаплоидии у яровой мягкой пшеницы. Биотехнология оптимизирована на основе использования комплексных цитоэмбриологических и физиологических исследований.

The main stages of biotechnology of androclinic haploidy of spring soft wheat are resulted and analyzed. The biotechnology is optimized on the basis of employment of complex cytoembryological and physiological investigations.

КУЦЯБА В.І., ПИНЯГА Ю.В., БОРЕЦЬКИЙ Ю.Р., ГОНЧАР М.В., ФЕДОРОВИЧ Д.В., СИБІРНИЙ А.А.

Інститут біології клітини НАН України

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

РОЗРОБКА СИСТЕМИ ГЕНЕТИЧНОЇ ТРАНСФОРМАЦІЇ ДЛЯ ІДЕНТИФІКАЦІЇ РЕГУЛЯТОРНИХ ГЕНІВ БІОСИНТЕЗУ РИБОФЛАВІНУ У ДРІЖДЖІВ *PICHA GUILLIERMONDII*

Клонування регуляторних генів біосинтезу рибофлавіну (РФ) флавіногенних дріжджів *Pichia guilliermondii* є важливим етапом при дослідженні молекулярних механізмів регуляції цього процесу, а також є основою для робіт у галузі метаболічної інженерії – конструюванні надсинтетиків РФ нового покоління. Відома нуклеотидна послідовність геному цих дріжджів не завжди дозволяє клонувати регуляторні гени біосинтезу РФ за допомогою методу інсерційного мутагенезу, тому залишається актуальною розробка ефективних систем для клонування таких генів методом функціональної комплементациї.

У 1991 році у дріжджів *P. guilliermondii* було описано мутацію *rib1-86* (C207Y) [1], яка майже повністю інактивує перший фермент флавіногенезу – ГТФ-циклогідролазу II, викликаючи у дріжджів ауксотрофність за РФ у середовищі з оптимальним для росту вмістом заліза, але не у залізодефіцитному середовищі, коли відбувається дерепресія синтезу цього фермента. Вірогідно, виділений мутант *rib1-86* є брадітрофним (leaky) мутантом по гену *RIB1*. Мутація *rib81-131* у регуляторному гені біосинтезу РФ негативного типу дії, подібно до залізодефіцитних умов вирощування дріжджів, викликає дерепресію синтезу ГТФ-циклогідролази II внаслідок посиленої експресії гена *RIB1*, що було показано за допомогою Нозерн блот-гібридизації [2], тому подвійні мутанти *rib1-86 rib81* є прототрофами за РФ.

Мутація *rib83-6*, яка пошкоджує неідентифікований регуляторний ген позитивного типу дії, епістатує над мутацією *rib81-131* [3], тому сконструйований потрійний мутант генотипу *rib1-86 rib81 rib83* виявився ауксотрофом за РФ [4]. Таким чином, мутація *rib83-6* повністю виключає дію мутації *rib81-131*, тому введення гена *RIB83* у складі плазмід у клітини такого потрійного мутанта буде приводити до відновлення дії мутації *rib81-131* і, як наслідок, до появи прототрофних за РФ клонів. Таким чином, потрійний мутант як реципієнт міг би стати основою системи для клонування регуляторного гена *RIB83* з бібліотеки генів *P. guilliermondii* шляхом позитивної селекції прототрофних за РФ трансформантів.

Матеріали і методи

У роботі було використано такі штами дріжджів *P. guilliermondii*: ATCC 9058 – дикий тип, мутанти з пошкодженою регуляцією біосинтезу РФ 18-Д78/2 *hisX rib81* MAT⁻, 3-Д93/8 *argX rib81* MAT⁺, 32-Д93/8 *argX rib81* MAT⁻, 2-Д82/1 *lysX rib83* MAT⁺; LV160 *rib1-86* MAT⁺ - РФ-залежний мутант. Бактерійний штам *E. coli* DH5α *lacZΔM15, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17(r_k⁻, m_k⁺), supE44, relA1, deoR, Δ(lacZYA-argF)U169*) використовувався для селекції та ампліфікації плазмід.

Склад середовищ і умови вирощування дріжджів, методи генетичного аналізу описані у [5,6]. Біомасу дріжджів визначали на фотоелектроколориметрі ФЕК-56М. Концентрацію флавінів – флуорометрично на приладі ЕФ-3М. Усі генно-інженерні маніпуляції проводили відповідно до [7].

Результати та обговорення

Першим етапом цієї роботи було конструювання стабільного штама-реципієнта генотипу *rib1-86 rib81 rib83*, який міг би зберігати фенотип *Rib⁻* протягом 10 - 12 днів. Такий час є достатнім для відбору трансформантів на селективному середовищі і виділення з них реплікативних плазмід. Для того, щоб сумістити мутації *rib1-86* і *rib81-131* в одному гаплоїдному геномі, схрестили мутант 18-Д78/2 *hisX rib81* MAT⁻ з штамом LV160 *rib1-86* MAT⁺. У отриманого диплоїда Д93/13 індукували мейоз, виділили мейотичні сегреганти і у прототрофних за РФ і нездатних до його надсинтезу представників перевіряли наявність мутації *rib81-131*. Для цього їх схрестили з мутантами 3-Д93/8 *argX rib81-131* MAT⁺ і 32-Д93/8 *argX rib81-131* MAT⁻ і у отриманих диплоїдів досліджували флавіногенез. Надсинтез РФ у диплоїдів свідчив про наявність у сегрегантів мутації *rib81-131*, а також генотипу *rib1-86 rib81*. Було виділено колекцію таких сегрегантів. Сегрегант 29-Д93/13, який нагромаджував велику біомасу і не втратив здатності до схрещування, був використаний для конструювання потрійного мутанта. Після схрещування його з штамом 2-Д82/1 *lysX rib83-6* MAT⁺ з отриманого диплоїда Д93/73 виділили ауксотрофні за РФ мейотичні сегреганти і схрестили їх з мутантами *rib81* і *rib83*. Висока флавіногенна активність першого диплоїда у середовищі з оптимальним для росту вмістом заліза і відсутність надсинтезу РФ у залізодефіцитному середовищі другого диплоїда свідчила про наявність у досліджуваного сегреганта генотипу *rib1-86 rib81 rib83*.

Сегреганти генотипу *rib1-86 rib81 rib83* були нестабільними і легко ревертували до фенотипу *Rib⁺*. На поверхні штрихів сегрегантів на агаризованому YPD через 10 –

14 днів зберігання виростала велика кількість „бородавок” - прототрофних за РФ клонів, але деякі з сегрегантів були значно стабільнішими. На поверхні їх штрихів виростало лише 2 – 3 „бородавки”. Один з таких сегрегантів (12-Д93/73), який також ріс на середовищі YPD з РФ краще, ніж інші сегреганти, було відібрано як реципієнт для клонування гена *RIB83*. Висівання на чашки з YPD $2 \cdot 10^7$ клітин (як при стандартній методиці клонування) не приводило до появи підросту і спонтанних ревертантів через 10 днів інкубації при 30 °С.

Ефективність трансформації реципієнта досліджували за допомогою плазмиди p19R1, яка містить ген *RIB1 P. guilliermondii*. Трансформацію реципієнта проводили методом електропорації. Ефективність цього методу була вищою, ніж у випадку використання хлористого літію. Підібрано такі оптимальні параметри електротрансформації: кювета 1 мм, 40 мкл суспензії клітин реципієнта 100 од. опт. густ. з 0,5 – 2 мкг плазмідної ДНК, опір – 200 Ом, ємність – 25 мкФ, напруга – 1,8 кВ. Після трансформації клітини висівали на агаризоване середовище YPD без РФ, яке містило 0,3 М сахарозу. При дотриманні цих параметрів частота трансформації реципієнта становила до 10^4 трансф./мкг плазмідної ДНК. Ефективність трансформації зростала майже у 2 рази після обробки клітин Li-ацетатом на початкових етапах приготування компетентних клітин. Після трансформації реципієнта ревертанти на контрольних чашках з’являлися лише через 10 днів.

Наступним етапом роботи стало створення геномної бібліотеки штама *P. guilliermondii* ATCC 9058 на основі бірепліконного (*P. guilliermondii*/*E. coli*) вектора pUC-ARS, який є похідним від pUC19. Бактерійна частина вектора pUC-ARS містить ген резистентності до ампіциліну, що кодує фермент β -лактамазу, реплікатор *E. coli* (*ori*), а дріжджова частина представлена ARS-елементом *P. guilliermondii* у складі *HincII* фрагмента розміром 0,82 т.п.н., який забезпечує реплікацію вектора у дріжджах. Хромосомну ДНК *P. guilliermondii* ATCC 9058 гідролізували за допомогою рестриктази *EcoRI*. Отримані фрагменти ДНК лігували в *EcoRI* сайт вектора.

В результаті електротрансформації штама *E. coli* DH5 α таким лігатом було отримано понад 10^4 колоній ампіцилін-резистентних трансформантів. Ці колонії були змиті стерильним середовищем LB, що містило ампіцилін. Отриману суспензію підрошували і виділяли плазмідну ДНК. Таким чином було отримано геномну бібліотеку штама *P. guilliermondii* ATCC 9058.

За допомогою методу електропорації даною бібліотекою генів трансформували реципієнтний штам *P. guilliermondii* генотипу *rib1-86 rib81 rib83*. Було отримано 28 колоній прототрофних за РФ дріжджових трансформантів. З однієї з них виділили плазмиду (pN1), яка з невисокою ефективністю (10 трансф./мкг ДНК) трансформувала реципієнт до прототрофності за РФ. Плазміда містила фрагмент ДНК *P. guilliermondii*, про що свідчила менша електрофоретична рухливість її порівняно з вихідним вектором pUC-ARS (рис.1А). Було проведено рестрикційний аналіз плазмід pUC-ARS і pN1 за допомогою ендонуклеаз рестрикції *EcoRI* і *HincII* (рис.1А). Рестрикційний аналіз плазмиди pN1 за допомогою рестриктази *EcoRI* показав, що вона розщеплюється на два фрагменти: вихідний вектор pUC-ARS (3,5 т.п.н.) і фрагмент хромосомної ДНК *P. guilliermondii*, що несе, вірогідно, ген *RIB83* або його супресор (1,7 т.п.н.). Рестрикційний аналіз плазмиди pN1 за допомогою рестриктази *HincII* підтвердив, що вона, як і вихідний вектор, містить ARS елемент *P. guilliermondii* (фрагмент ДНК 0,82 т.п.н.) і два додаткові *HincII* сайти, що знаходяться в клонованому фрагменті ДНК. На основі цих результатів запропоновано схему плазмиди pN1 (рис. 1Б).

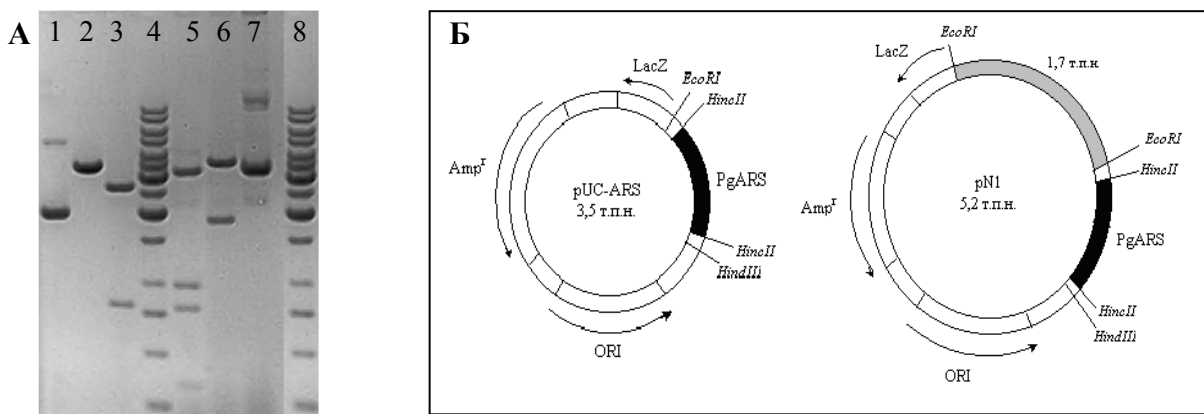


Рис. 1. А - Электрофореграма плазмід рUC-ARS (3,5 т.п.н.) і рN1 (5,2 т.п.н.) та їх рестрикційних фрагментів.

1 – нативна форма плазміди рUC-ARS; 2 – плазміда рUC-ARS, лінеаризована ендонуклеазою рестрикції *EcoRI*; 3 – плазміда рUC-ARS, лінеаризована ендонуклеазою рестрикції *HincII*; 4 і 8 – маркери молекулярної маси (GeneRuler™ 1 kb Ladder); 5 – плазміда рN1, лінеаризована ендонуклеазою рестрикції *HincII*; 6 – плазміда рN1, лінеаризована ендонуклеазою рестрикції *EcoRI*; 7 - нативна форма плазміди рN1.)

Б - схема плазмід рUC-ARS і рN1 (фрагмент ДНК *P. guilliermondii*, що несе *PgARS*, позначено товстою чорною лінією; послідовність рUC19 – товстою білою лінією; клонований фрагмент ДНК *P. guilliermondii* – товстою сірою лінією.)

Аналіз нуклеотидної послідовності клонованого фрагмента ДНК показав, що він містить дві неповні відкриті рамки трансляції генів *HEM12* і амінопептидази X з невідомою функцією. Повні гени *HEM12* та амінопептидази X були клоновані у складі реплікативних векторів за допомогою полімеразної ланцюгової реакції, використовуючи відповідні праймери. Була проведена трансформація реципієнта даними плазмідами. Трансформанти були отримані лише у випадку плазмід із геном *HEM12* з такою ж частотою, як у випадку трансформації реципієнта плазмідною рN1. Вірогідно, клонований фрагмент гена *HEM12* і повний ген *HEM12* викликають зростання частоти інтеграції рекомбінантних плазмід у певні локуси геному реципієнта, що призводить до появи прототрофних за РФ інсерційних мутантів внаслідок супресії дії мутації *rib83-6*.

Висновки

1. Сконструйовано стабільний штам-реципієнт генотипу *rib83 rib1-86 rib81*, придатний для клонування регуляторного гена біосинтезу РФ *RIB83*.

2. Підібрано оптимальні умови для трансформації реципієнта банком генів дріжджів *P. guilliermondii* методом електропорації.

3. З банку генів дріжджів *P. guilliermondii* виділено плазмиду, яка з частотою 10 трансф./мкг ДНК трансформує штам-реципієнт до прототрофності за РФ.

4. Аналіз нуклеотидної послідовності клонованого фрагмента виявив неповну рамку трансляції гена *HEM12*. Трансформація реципієнта плазмідною із клонованим нативним геном *HEM12* не привела до зростання частоти появи прототрофних трансформантів.

Література

1. Шавловский Г.М., Стенчук Н.Н., Кшановская Б.В. Влияние регуляторной мутации в локусе *RIB1* на биосинтез рибофлавина у *Pichia guilliermondii*. // Биополимеры и клетка. – 1991. – 7. – С. 96-99.

2. Boretsky Y.R., Kapustyak K.E., Fayura L.R., Stasyk O.V., Stenchuk M.M., Bobak Y.P., Drobot L.B., Sybirny A.A. Positive selection of mutants defective in transcriptional repression of riboflavin synthesis by iron in the flavinogenic yeast *Pichia guilliermondii*. // FEMS Yeast Research. -2005. – 5. – P. 829-837.
3. Шавловский Г.М., Колтун Л.В., Кушановская Б.В., Логвиненко Е.М., Стенчук Н.Н. Регуляция биосинтеза рибофлавина элементами позитивного контроля у дрожжей *Pichia guilliermondii* // Генетика. - 1989. - Т.25, №2. - С. 250-258.
4. Стенчук М.М., Кушановська Б.В., Куцяба В.І., Шавловський Г.М. Особливості біосинтезу рибофлавіну у мутантів *Pichia guilliermondii* з пошкодженими генами позитивного і негативного типу регуляції флавіногенезу. // Тези доп. VI Українського біохімічного з'їзду. - Київ. - 1992. - Ч.1. - С. 52.
5. Шавловский Г.М., Жарова В.П., Щелокова И.Ф., Трач В.М., Сибирный А.А., Кушановская Г.П. Флавиногенная активность природных штаммов дрожжей *Pichia guilliermondii*. // Прикл. биохимия и микробиология. -1978. – т. 14., вып.2. – с. 184-189.
6. Сибирный А.А., Шавловский Г.М., Кушановская Б.В., Наумов Г.И. Гибридизация и мейотическое расщепление у парафинусваивающих дрожжей *Pichia guilliermondii* Wickerham // Генетика. – 1977. - Т.13, №2. – С. 314-321.
7. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. - М., Мир. – 1984. - 480 с.

Резюме

Розроблено систему генетичної трансформації для ідентифікації регуляторних генів біосинтезу рибофлавіну у *P. guilliermondii*. Вірогідно, клонований фрагмент гена *HEM12* викликає зростання частоти інтеграції рекомбінантних плазмід у певні локуси геному реципієнта, що призводить до появи прототрофних за рибофлавіном інсерційних мутантів внаслідок супресії дії мутації *rib83-6*.

Разработана система генетической трансформации для идентификации регуляторных генов биосинтеза рибофлавина у *P. guilliermondii*. Вероятно, клонированный фрагмент гена *HEM12* повышает частоту интеграции рекомбинантных плазмид в определённые локусы генома реципиента, что вызывает возникновение прототрофных по рибофлавинову инсерционных мутантов вследствие супрессии действия мутации *rib83-6*.

Transformation system for cloning of regulatory genes of riboflavin biosynthesis was designed. Probably, the cloned DNA fragment which contains the part of *P.guilliermondii* gene *HEM12* integrates into some loci of the recipient strain genome. It leads to riboflavin prototrophy of the insertional mutants as a result of suppression of the *rib 83-6* mutation.

ЛУК'ЯНЧУК В.В.

Інститут мікробіології і вірусології НАН України,

Україна, Д03680, Київ, вул. акад. Заболотного, 154, e-mail: vitaly@serv.imv.kiev.ua

КЛОНУВАННЯ ПЛР-АМПЛІКОНА ХРОМОСОМИ *Streptomyces coelicolor* A3(2)

Метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) - це один з найсучасніших методів прямого аналізу нуклеотидної послідовності ДНК. Цей метод дозволяє накопичувати в значній кількості копії виключно бажаних фрагментів досліджуваної ДНК. Метод ПЛР дозволяє визначати первинну будову ДНК незалежно від її джерела, розміру молекули чи галузі призначення досліджень. Метод також є абсолютно специфічним: має місце ампліфікації тільки чітко визначеної послідовності ДНК

Метод ПЛР суттєво доповнює існуючі морфологічні, біохімічні та генетичні методи, а не заміняє чи витісняє їх з наукових досліджень. Крім простого збільшення числа копій фрагмента ДНК, ПЛР дозволяє проводити безліч інших маніпуляцій з генетичним матеріалом і широко використовується в науковій діяльності, наприклад для клонування генів, введення мутацій, сіквенування, виділення генів та інше [1, 2].

Матеріали і методи

В роботі використовувалися культури *Streptomyces coelicolor A3(2)* [2, 3] та *Escherichia coli XL tet^R* [5]. Вектором слугувала плазміда рWHM4 (6,6 тпн) [6]. В роботі використовували середовища: соєве, S-середовище (рідкий варіанти), МПА та МПБ [3, 7]. Для селекції трансформантів та нарощуванні їх біомаси в середовища додавали антибіотики ампіцилін (100 мкг/мл) та тетрациклін (25 мкг/мл).

Плазмідну ДНК виділяли за методом Кайзера [8]. Хромосому *Streptomyces coelicolor A3(2)* виділяли, використовуючи рекомендації керівництва Маніатіса і співавторів [9]. Гідроліз та лігування фрагментів ДНК проводили згідно з рекомендаціями керівництва Маніатіса [9]. В експериментах по гідролізу та лігуванню ДНК використовували ферменти та буфери фірми МВІ “Fermentas” (Литва) [5].

Компетентні клітини *Escherichia coli XL tet^R* отримували і трансформували відповідно рекомендаціям Маніатіса [9].

Полімеразну ланцюгову реакцію проводили на ампліфікаторі Mastercycler personal (“Eppendorf”, Німеччина). Застосований режим ПЛР: початкова денатурація - 95°C - 120’’; 35 циклів: 96°C - 20’’; 50°C - 20’’; 70°C - 240’’; заключна елонгація: 60°C - 240’’. Реакційна суміш містила: 10mM TrisHCl (рН 8,0), 50mM KCl, 1,5mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 1 ед Taq-полімерази, 30 pM праймера, 10мкл ДНК. Суміш нуклеотидів і Taq-полімерази використовували фірми МВІ “Fermentas” (Литва) [5]. Послідовності праймерів наведені в таблиці 1.

Таблиця 1

Послідовності праймерів, що були використані в роботі:

Нуклеотидна будова праймерів	Напрямок	Ендонуклеаза
5'- <u>CGCAAGCTT</u> ATGGCGACTTTGTGCAGAC -3'	прямий	HindIII
5'- <u>CCGAATTC</u> ATGCCTGCCTCACCTCCGC -3'	зворотній	EcoRI

Примітка: підкреслено послідовності сайтів рестрикції

Електрофоретичне розподілення ПЛР продуктів проводили в 1,5 % агарозному гелі. Для визначення молекулярної маси отриманих продуктів ампліфікації використовували маркер молекулярної ваги 100 bp DNA Ladder фірми “Promega” (США).

Результати та обговорення

Мікроорганізми відомі своєю здатністю синтезувати багато полікетидних сполук, які застосовуються в медицині і ветеринарії як антибіотичні, імуносупресорні та антигельмінтні препарати. Вони синтезуються полікетидсинтазами і завершальними ферментами (циклази, оксидази, кеторедуктази, глікозил-трансферази тощо)[10, 11]. Полікетидсинтази (PKS) відносяться до 3-х класів. Гени полікетидсинтаз і завершальних ферментів зібрані на хромосомі у великі кластери. У геномі *S. coelicolor A3(2)* виявлено послідовності для трьох типів PKS, одна із яких SCO 1206 кодує RppA-подібну ТНН-синтазу (PKS третього типу) [4, 10, 11].

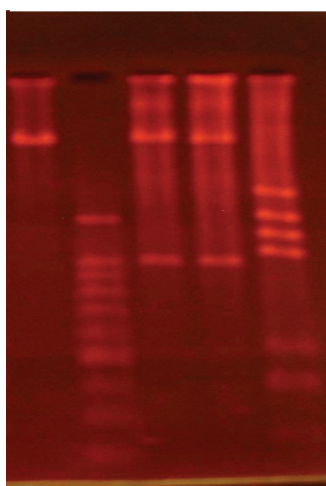
На базі інформації про нуклеотидну будову PKS III *S. coelicolor A3(2)* було підбрано нуклеотидну будову пари праймерів (прямий та зворотній) для ПЛР [4]. Кожен олігонуклеотид містив по 19 чи 20 пн відповідної послідовності гена синтезу PKS III *S. coelicolor A3(2)* та нуклеотидну послідовність сайту пізнавання для відповідної ендонуклеази рестрикції. Клонування отриманих ПЛР-продуктів в складі човникового вектора рWHM4 було вирішено провести по унікальним сайтам рестрикції для EcoRI та HindIII, що знаходяться в полілінкерному фрагменті вектора рWHM4. В

склад прямого (F) праймера входить послідовність для HindIII, а до складу зворотнього праймера (R) - сайт для EcoRI (таблиця 1).

ПЛР-продукти, отримані за допомогою ПЛР на цільовому фрагменті досліджували електрофоретичним розподіленням в агарозному гелі. Було отримано ПЛР-амплікони молекулярним розміром 1,145 тпн. Довжина була вирахована по даним електрофоретичного розподілу ПЛР-продуктів та інформації про первинну будову відповідного фрагменту хромосоми *S. coelicolor A3(2)* [4].

ПЛР-продукти і ДНК вектора pWHM4 обробляли ендонуклеазами II типу EcoRI і HindIII та проводили спільне лігування отриманих рестриктів. Лігваною сумішшю трансформували компетентні клітини кишкової палички. Відбирали трансформанти стійкі до ампіциліну та тетрацикліну. Стійкість до тетрацикліну детермінується хромосоמו реципієнта. Стійкість до 100 мкг/мл ампіциліна забезпечується генім вектора pWHM4.

Виділені з ряду Ap^R Tet^R трансформантів позахромосомні ДНК мали однаковий молекулярний розмір. Електрофоретичне розділення продуктів гідролізу ендонуклеазами EcoRI та HindIII плазмідних ДНК декількох Ap^R Tet^R трансформантів продемонструвало наявність 2 фрагментів: 6,6 тпн та 1,1 тпн (рис).



1 2 3 4 5

Рис. Електрофоретичне розподілення фрагментів плазмідних ДНК трансформантів №6 та №8: 1.-pWHM4 + EcoRI + HindIII, 2.-100 bp DNA Ladder, 3.-pN6 + EcoRI + HindIII, 4.-pN8 + EcoRI + HindIII, 5.- pN6 + BglI.

Таким чином, плазмідні ДНК Ap^R Tet^R трансформантів містять однакові вставки, які є бажаними нуклеотидними послідовностями хромосоми *S. coelicolor A3(2)*.

Висновки

1. На базі інформації про нуклеотидну будову гену синтезу PKS III *S. coelicolor A3(2)* було підбрано оптимальні нуклеотидні послідовності для пари праймерів (прямий та зворотній) для проведення ПЛР. Було отримано ПЛР-амплікони молекулярним розміром 1,145 тпн

2. Було успішно підбрано систему для клонування ампліфікованої ДНК (що складалася з вектора pWHM4 та реципієнтного штама *Escherichia coli XL tet^R*). Гібридні плазмідні Ap^R Tet^R трансформантів містили клонований фрагмент стрептосміцетної хромосоми молекулярним розміром 1,129 тпн.

Література

1. Методы молекулярной генетики и генной инженерии. (Ред. Салганник Р.И.) – Новосибирск: Наука.- 1990.-256 с.

2. Экспериментальные методы исследования белков и нуклеиновых кислот (ред. Прокофьев М.А.) // Москва, Издательство МГУ.-1985.-279 с.
3. Валагурова В.Е., Козырицкая В.Е., Иутинская Г.А. Актиномицеты рода *Streptomyces*. Описание видов и компьютерная программа их идентификации // Киев: Наукова думка.-2003.-645 с.
4. Bentley S.D., Chater K.F., Cerdeno-Tarraga A.M. et al. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2) // Nature.-2002.- vol. 417, №6885.- P. 141-147.
5. Каталог фірми MBI. Fermentas.- 2006-2007.
6. Vara j., Lewandowska-Skarbek M., Wang Y.-G. Cloning of genes governing the deoxysugar portion of the erythromycin biosynthesis pathway in *Saccharopolyspora erythraea* (*Streptomyces erythreus*) // J. Bacteriology.- 1989.- vol. 171, №3.-P.5872-5881.
7. Okanishi M., Suzuki K., Umezawa H. Formation and reversion of *Streptomyces* protoplasts: condition and morphological study // J. General Microbiol. –1989.-vol.80, №1.-P.389-400.
8. Kieser T. Factors affecting the isolation of CCC DNA from *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli* // Plasmid.-1984.-vol.12, №1.- P.19-36.
9. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбук Дж. Молекулярное клонирование. Методы генетической инженерии – Москва: Мир.- 1984.-450 с.
10. Cortes J., Velasco J., Foster G., Blackaby A.P., Rudd B.A.M., Wilkinson B. Identification and cloning of a type III polyketide synthase required for diffusible pigment biosynthesis in *Saccharopolyspora erythraea* // Mol. Microbiol. - 2002. – vol. 44, №5. - P. 1213-1224.
11. Funo N., Ohnishi Y., Ebizuka Y., Horinouchi S. Alteration of reaction and substrate specificity of a bacterial type III polyketide synthase by site-directed mutagenesis // Biochem. J. - 2002. – vol, 367, №3. - P. 781-789.0

Резюме

За допомогою ПЛР ампліфіковано фрагмент хромосоми *Streptomyces coelicolor* A3(2), що містить ген синтезу PKS III. Проведено клонування ампліфікованої ДНК в човниковому векторі pWHM4 по сайтам HindIII та EcoRI. Базуючись на даних рестрикційного аналізу плазмідних ДНК трансформантів встановлено, що молекулярний розмір проклоненого фрагмента ДНК становить 1129 пн.

С помощью ПЦР амплифицировано фрагмент хромосоми хромосоми *Streptomyces coelicolor* A3(2), который содержал ген синтеза PKS III. Проведено клонирование амплифицированной ДНК в челночном векторе pWHM4 в сайтах HindIII та EcoRI. Основываясь на данных рестриционного анализа плазмидных ДНК трансформантов, установлено, что молекулярный размер клонированного фрагмента составляет 1129 пн.

Copies of chromosome *Streptomyces coelicolor* A3(2) fragment (gene of PKSIII synthase) were obtained to use PLR. Amplificated DNA was cloned in shuttle vector pWHM4 on sites for HindIII and EcoRI. Restriction analysis of plasmid DNAs of transformantes demonstrated that molecular sizes of cloning DNA insertions were 1129 b.

МИТРОФАНОВА О.В.¹, ЛЕСНИКОВА-СЕДОШЕНКО Н.П.¹, ЧИРКОВ С.Н.², СМЫКОВ А.В.¹

¹Никитский ботанический сад – Национальный научный центр УААН, Украина, 98648, АР Крым, г. Ялта, e-mail: in_vitro@ukr.net

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ СИСТЕМЫ ОЗДОРОВЛЕНИЯ КОСТОЧКОВЫХ ПЛОДОВЫХ КУЛЬТУР И ПОЛУЧЕНИЯ БЕЗВИРУСНОГО ПОСАДОЧНОГО МАТЕРИАЛА

В современном плодоводстве все большее значение приобретают создание и внедрение в производство сортов косточковых плодовых культур, сочетающих комплекс хозяйственно ценных признаков с устойчивостью к наиболее распространенным и вредоносным болезням. Проблемы безвирусного садоводства, пути их решения находятся в центре внимания практически всех промышленно развитых стран. В последние годы резко возросли требования к качеству посадочного материала, и сегодня обмен и реализация на международном рынке осуществляется только безвирусным растительным материалом. Сравнительное изучение вредоносности и особенностей распространения вирусных болезней в различных регионах показывает широкие ареалы поражения косточковых плодовых культур вирусными болезнями и их приуроченность к экологическим районам [3, 5, 7-9, 11]. Так, в южных регионах Украины, особенно в Крыму, многие возбудители вирусных инфекций занимают ареалы, совпадающие с ареалами выращивания поражаемых ими культур и дикорастущих видов растений, а также благоприятными условиями для массового размножения переносчиков. В настоящее время основной тенденцией развития плодоводства в Украине является создание безвирусных питомников и закладка интенсивных садов здоровым посадочным материалом высокоурожайных сортов. В связи с этим для ускорения селекционного процесса, оздоровления растений и быстрого размножения ценных безвирусных генотипов косточковых плодовых культур необходимым является разработка биотехнологических систем.

Материалы и методы

Исследования проводились с 1999 по 2007 гг. в отделе биотехнологии и биохимии растений Никитского ботанического сада – Национального научного центра. В качестве объектов использовали сорта и гибридные формы персика (*Prunus persica* (L.) Batch), абрикоса (*Prunus armeniaca* L.), сливы (*Prunus domestica* L.), алычи (*Prunus cerasifera* Ehrh.) и черешни (*Prunus avium* L.). В работе применяли как общепринятые, так и разработанные нами методы [1, 2, 4, 6, 12]. Тестирование на вирусы исходного и ретестирование оздоровленного посадочного материала выполняли с использованием растений-индикаторов, серологическими методами: двойной диффузии в агар-геле, иммуноферментного анализа (DAS ELISA-test). Для идентификации вируса шарки применяли систему «Пиротест» [10]. При выявлении вирусов в сортообразцах пораженных деревьев исследуемых культур использовали травянистые: *Chenopodium quinoa* Willd., *Ch. foetidum* Schrad., *Cucumis sativus* L. ‘Delikatess’, *Gomphrena globosa* L., *Nicotiana clevelandii* Gray, *N. glutinosa* L. и древесные растения-индикаторы *Prunus serrulata* Lindl. ‘Shirofugen’. Материалом для инокулюма служили лепестки цветков, вегетативные почки и листья. Для повышения эффективности механической передачи вирусной инфекции инокулюм готовили в 0,1 М фосфатном буфере Серенсена pH 7,0; в 0,01 М буфере Трис-HCl pH 8,5 и в 0,1 М боратном буфере pH 8,0. При тестировании на древесных индикаторах (*Prunus serrulata* ‘Shirofugen’ и др.) применяли массивную инокуляцию (почками с испытуемого образца). Оздоровление растительного материала от вирусной инфекции проводилось с использованием культуры органов и тканей в сочетании с термотерапией или хемотерапией *in vitro*. При изучении особенностей морфогенеза органов и тканей исследуемых культур и получении безвирусных регенерантов в качестве первичных эксплантов были вегетативные почки, меристематические ткани, верхушки активно растущих побегов,

которые культивировали на модифицированных питательных средах МС [14], В5 [13], QL [15]. Стерилизацию эксплантов проводили по разработанной нами методике [6].

Результаты и обсуждение

Разработка биотехнологических систем оздоровления растений и получения безвирусного посадочного материала косточковых плодовых культур обусловлена, прежде всего, массовым распространением вирусных инфекций. Обследовано более 1500 сортов и селекционных форм персика, абрикоса, черешни, сливы, алычи в промышленных, коллекционных и селекционных насаждениях на поражаемость вирусными болезнями. Сравнительный анализ внешних признаков проявления вирусных инфекций позволил на разных культурах выявить сходные симптомы. Такие признаки, как бороздчатость древесины, задержка в развитии генеративных органов и вегетативных почек, мелкоплодность и розеточность листьев, усыхание скелетных ветвей отмечено на деревьях сортов персика Ветеран, Сочный, Янги, Пушистый Ранний, Турист, Redgold; черешни – Рубиновая Ранняя, Дилемма, Приусадебная. На плодах отдельных деревьев персика, абрикоса, сливы, алычи и черешни были отмечены ярко-малиновые, красные и оранжево-желтые пятна и кольца, на листьях – хлоротические пятна, кольца и дуги. У сорта абрикоса Маркулешти и сорта персика Золотая Москва симптомы проявлялись на косточках в виде колец и язв. Достоверность выявленного состава вирусов на исследуемых культурах подтверждена тестированием на растениях-индикаторах и серологическими методами. Наиболее надежным методом тестирования образцов на вирус шарки сливы оказалась система «Пиротест». В результате проведенных исследований определено 16 возбудителей вирусных болезней: ACLSV (абрикос, черешня), ArMV (персик, абрикос, черешня), ASPV, CLRV, RpRSV, TNV (персик, черешня), CMV (черешня, слива), CRLV, SLRSV, TBRV (черешня), PBV, TBSV, PRMV (персик), PDV, PNRSV, PPV (персик, абрикос, черешня, слива, алыча). Среди обнаруженных вирусов наиболее вредоносными являются PNRSV, PDV и PPV, у которых передача инфекции возможна пыльцой, семенами, насекомыми-переносчиками, окулировкой и прививкой.

В процессе разработки систем оздоровления растений использовали различные биотехнологические приемы: культуру органов и тканей, термо- и хемотерапию *in vitro*, микроразмножение *in vitro* с последующим ретестированием на вирусы полученных регенерантов. В опытах участвовали сорта: персика – Ветеран, Золотая Москва, Молодежный, Санхейвен, Эрли Ред; абрикоса – Детский, Дионис, Крымский Амур, Маркулешти, Салют; сливы – Ренклад Альтана, Стенлей, Verity, алычи – Вилора, Оленька, Сестричка, Субхи Ранняя, черешни – Бигарро Бурлат, Валерий Чкалов, Крупноплодная, Мелитопольская Черная. Определены оптимальные сроки отбора и введения в культуру *in vitro* первичных эксплантов с учетом особенностей развития генотипа. Лучшим сроком отбора вегетативных почек и меристематических тканей был февраль-март, активно растущих верхушек побегов – май-июнь. В опытах по освобождению растений от вирусов применяли хемотерапию. Первичные экспланты косточковых плодовых культур вводили на питательные среды, содержащие различные концентрации ингибиторов вирусов: 85-150 мг/л НЕО-ДНТ и 1, 5, 10, 20 мг/л виразола (рибавирина). Повышение концентрации вироцидов вызывало фитотоксическое действие, проявляющееся в угнетении роста и развития микропобегов, а также в отмирании апикальной части микропобегов.

На этапе индукции развития безвирусных микропобегов были определены оптимальные питательные среды и концентрации регуляторов роста для каждого исследуемого генотипа. Установлено, что активное развитие микропобегов изучаемых сортов персика Золотая Москва, Бархатистый, сливы сортов Стенлей, Verity и алычи сорта Оленька происходило на модифицированной питательной среде В5, дополненной БАП в концентрации 2,22-4,40 мкМ, ИМК – 0,49-2,46 мкМ, ГК₃– 0,29-2,89 мкМ; сортов абрикоса Детский, Маркулешти – на модифицированной среде QL, дополненной 2,22-

6,60 мкМ БАП, 0,54-2,69 мкМ НУК, 0,29 мкМ ГК₃. Первичные экспланты сортов черешни, участвующие в эксперименте, на этапе введения в условия *in vitro* проявляли низкие способности к морфогенезу. Поэтому нами испытано более 10 составов питательных сред и их модификаций. Лучшей питательной средой оказалась среда МС, содержащая 4,40 мкМ БАП, 0,49-1,23 мкМ ИМК, 1,44 мкМ ГК₃, 0,5-1,5 мкМ тиамин. При изучении морфогенетических потенций органов и тканей сортов персика, абрикоса, сливы, алычи и черешни на этапе собственно микроразмножения количество образовавшихся адвентивных почек и микропобегов увеличивалось после 5-6 пассажа. Коэффициент размножения микропобегов в среднем составил у сортов сливы 1:17, персика и черешни – 1:5, абрикоса – 1:8, алычи – 1:20. Микропобеги персика, абрикоса, сливы и алычи, достигшие длины 2-3 см, успешно укоренялись на питательной среде МС, содержащей ½ макро- и микросолей по прописи МС и ИМК в концентрации 0,98-9,80 мкМ. Как показали опыты, индуцировать ризогенез микропобегов черешни значительно сложнее, чем у других косточковых плодовых культур. Корнеобразование микропобегов черешни происходило на среде МС с 2,46-14,7 мкМ ИМК. Продолжительность этапа ризогенеза длилась от 20 до 50 сут и зависела от генотипа. В процессе исследований установлено, что для оздоровления от вирусных инфекций сортов персика, абрикоса, сливы, алычи и черешни целесообразно использовать регенеранты, так как микропобеги не выдерживают необходимого режима термотерапии (37±1° С) и могут погибнуть. В результате проведенной терапии *in vitro* (хемо- и термотерапия) были получены безвирусные растения 20 сортов косточковых плодовых культур. Терапия в условиях *in vitro* по сравнению с традиционной терапией более надежна и эффективна и позволяет в 5-6 раз сократить сроки получения безвирусных растений. Полученные регенеранты адаптировали к условиям *in vivo* и спустя 2-3 месяца ретестировали на вирусы с последующей сертификацией.

Таким образом, проведенные исследования показали необходимость в комплексном подходе при разработке биотехнологических систем оздоровления косточковых плодовых культур. Предлагаемые нами биотехнологические системы освобождают растения от вирусов и позволяют массово размножить безвирусный посадочный материал персика, абрикоса, сливы, алычи и черешни. Системы включают в себя 6 блоков-методов: тестирование исходных растений на вирусы (определение состава вирусов и их локализации); термо- или хемотерапию в условиях *in vitro*; культивирование органов и тканей и получение регенерантов; адаптацию пробирочных растений *in vivo*; ретестирование; сертификацию посадочного материала.

Литература

1. Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. – М.: Наука, 1964. – 272 с.
2. Гнутова Р.В. Иммунологические исследования в фитовирусологии. – М.: Наука, 1985. – 184 с.
3. Вердеревская Т.Д., Маринеску В.Г. Вирусные и микоплазменные заболевания плодовых культур и винограда. – Кишинев: Штиинца, 1985. – 311 с.
4. Калинин Ф.Л., Кушнир Г.П., Сарнацкая В.В. Технология микрклонального размножения растений. – Киев: Наукова думка, 1992. – 232 с.
5. Лукичева Л.А., Митрофанова О.В., Лесникова-Седошенко Н.П. Оздоровление вишни (*Prunus cerasus* L.) и сливы (*Prunus domestica* L.) от вирусов с использованием биотехнологических приемов // Биохимические и биотехнологические исследования многолетних декоративных, косточковых плодовых и эфиромасличных культур. Сб. науч. трудов / Никит. ботан. сад. – 2007. – Т. 127. – С. 27-34.
6. Митрофанова О.В., Митрофанова И.В., Смыков А.В., Лесникова Н.П. Методы биотехнологии в селекции и размножении субтропических и косточковых плодовых культур // Интенсификация селекции плодовых культур. Сб. науч. трудов / Никит. ботан. сад. – 1999. – Т. 118. – С. 189-199.

7. Митрофанова О.В., Митрофанова И.В., Ежов В.Н., Лесникова-Седошенко Н.П., Лукичева Л.А., Смыков А.В., Сенин В.В., Литвинова Т.В. Изучение вирусов и вирусных болезней косточковых плодовых культур на юге Украины и особенности оздоровления растений *in vitro* // Бюл. Никит. ботан. сада. – 2005. – Вып. 91. – С. 111-120.
8. Митрофанова О.В., Михайлов А.П., Чехов А.В. Биотехнологические аспекты освобождения от вирусов и клонального микроразмножения некоторых экономически важных многолетних культур // Биотехнологические исследования садовых и других ценных многолетних культур. Сб. науч. трудов / Никит. ботан. сад. – 1997. – Т. 119. – С. 7-34.
9. Митрофанова О.В., Славгородская-Курпиева Л.Е., Митрофанова И.В., Лукичева Л.А. Диагностика вирусных болезней и биотехнологические приемы получения безвирусного посадочного материала косточковых плодовых культур. – Ялта: Крымпресс, 2000. – 46 с.
10. Чирков С.Н., Приходько Ю.Н. Пиротест – новый метод диагностики вируса шарки сливы // Промышленное производство оздоровленного посадочного материала плодовых, ягодных и цветочно-декоративных культур: Материалы междунар. научно-практической конф. – Москва, 2001. – С. 71-72.
11. Шевченко Т.П., Полищук В.П., Бойко А.Л. Віруси рослин: штамове різноманіття. – Київ: Фітосоціоцентр, 2002. – 78 с.
12. Clark M.F., Adams A.N. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of plant viruses // J. Gen. Virol. – 1977. – V. 34, N 3. – P. 475-483.
13. Gamborg O.L., Eveleigh D.E. Culture methods and deletion of glucanases in cultures of wheat and barley // Can. J. Biochem. – 1968. – Vol. 46, N 5. – P. 417-421.
14. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. – 1962. – Vol. 15, N 3. – P. 473-497.
15. Quoirin M., Lepoivre P. Etude de milieux adaptes aux cultures *in vitro* de Prunus // Acta Hort. – 1977. – Vol. 78. – P. 437-442.

Резюме

Представлены биотехнологические системы оздоровления косточковых плодовых культур и получения безвирусных растений персика, абрикоса, сливы, алычи и черешни как комплексный подход, состоящий из 6 блоков-методов.

Подано біотехнологічні системи оздоровлення кісточкових плодкових культур і одержання безвірусних рослин персика, абрикоса, сливи, аличі та черешні як комплексний підхід, що складається з 6 блоків-методів.

Biotechnological systems of stone fruits cleaning up and virus free peach, apricot, plum, cherry plum and sweet cherry obtaining as a complex approach completed on 6 blocks-methods have been presented.

НАМ И.Я., ЗАЯКИН В.В.

Брянский государственный университет им. акад. И.Г. Петровского,
Россия, 241036, Брянск, ул. Бежицкая, 14
e-mail: iya_nam@online.debryansk.ru

СОЗДАНИЕ НОВЫХ ФОРМ РЕМОНТАНТНОЙ МАЛИНЫ МЕТОДАМИ БИОТЕХНОЛОГИИ

Создание и оценка новых сортов культурных растений, характеризующихся высокой продуктивностью и устойчивостью к болезням, вредителям и стрессорным

факторам абиотической природы, наряду с традиционными методами генетики включает применение биотехнологических подходов (Шевелуха В.С., 2000). Современная селекция широко использует культивирование клеток, органов и тканей *in vitro*, генетическую инженерию, а также методы молекулярной генетики при анализе генетического родства и для паспортизации видов, сортов и полученных гибридных форм, при скрининге селекционного материала на наличие вирусов и других патогенов и для идентификации возбудителей заболевания.

Ремонтантная малина очень медленно размножается в полевых условиях: из-за раннего плодоношения - на побегах первого года, вегетативные почки на отрастающих побегах рано дифференцируются по цветочному типу (Козаков И.В., 1994). При этом ассимиляты в растениях ремонтантной малины преимущественно потребляются растущими побегами и плодозементами, что вызывает существенное уменьшение образования корневых отпрысков, замедление вегетативного размножения. Важнейшей проблемой для селекции и для создания производственных питомников этой культуры является массовое поражение растений вирусом кустистой карликовости малины (ВККМ), достигающее в некоторых случаях 100%.

Методы клонального микроразмножения и регенерации растений *in vitro* были ранее разработаны для ряда плодово-ягодных культур, в частности, для малины, ежевика, и др. (Высоцкий В.А., 2001;). Для размножения *in vitro* большинства культур на этапах индукции из эксплантов первичного побега и размножения растений различными авторами применялись цитокинины 6-БАП, кинетин и зеатин, и для ризогенеза - ауксины ИУК, ИМК или НУК (Fiola J.A. et al., 1990; Graham J. et al., 1997).

Настоящая работа проведена на ремонтантной малине и посвящена оптимизации методов клонального микроразмножения, регенерации и трансформации растений, разработке молекулярно-генетического анализа разных видов, сортов и генотипов малины с помощью ISSR-PCR, анализа ВККМ методом RT-PCR и созданию трансгенных растений малины, устойчивых к ВККМ.

Материалы и методы

Культивирование *in vitro* малины проводили на среде Мурасиге-Скуга с увеличенной в три раза концентрацией хелата железа. Приготовление питательных сред, стерилизация материала, выделение эксплантов осуществлялось с помощью стандартных приемов (Бутенко Р.Г., 1964). Экспланты для клонального микроразмножения (апексы и зачатки цветков размером 0.2 – 0.7 мм) выделяли из почек побегов замещения. Стерилизацию проводили с помощью 0.1% раствора сулемы.

На разных этапах клонального микроразмножения ремонтантной малины применяли среды, содержащие цитокинины 6-БАП (1-4 мг/л), TDZ (0.025-0.2 мг/л), 4-PU (0.1 – 0.4 мг/л) и ауксины ИУК или ИМК (0.5-1.5 мг/л). При кратковременной обработке побегов для ризогенеза использовали ИМК, 1 г/л. При регенерации растений в качестве источника эксплантов использовали листья и черешки, изолированные от укорененных *in vitro* растений малины. Отсутствие генетических изменений в полученных регенерантах также доказывали с помощью ISSR-PCR.

Молекулярно-генетический анализ разных видов, сортов и образцов малины проводили методом ISSR-PCR по модифицированной методике Prevost & Wilkinson (1999), праймеры были синтезированы ЗАО «Синтол» (Москва).

Для генетической трансформации растений использовали штаммы *A. tumefaciens*, любезно предоставленные лабораторией генетической инженерии растений Института общей генетики: E35S-L-licB, E35S-licB, E-nptII (Мусийчук К.А., 2001). Наличие лихеназной активности в растениях - регенерантах определяли с помощью чашечного теста (Голденкова И.В., 2002). В опытах использовали также штамм *A. tumefaciens* GANE 7, содержащий ген b6, любезно предоставленный Институтом клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины. Ген b6

участвует в тонкой регуляции действия цитокининов в растениях и способен вызвать повышение регенерационной способности у табака (Кучук Н.В., 1997).

Результаты и обсуждение.

Для ускоренного размножения элитных селекционных образцов ремонтантной малины нами был оптимизирован метод клонального микроразмножения. Меристемы из вегетативных почек плохо развиваются в культуре на средах с 6-БАП, более половины их погибает. Экспланты из цветочных почек погибают на средах с 6-БАП полностью. Для образцов малины, погибавших *in vitro*, необходимо было найти регуляторы роста, более эффективные на этапе их введения в культуру. Нами были применены цитокинины ряда дифенилмочевины - N-(4-пиридил)-N-фенилмочевина (4-PU) и тидиазурон (TDZ), которые ранее использовались на плодовых культурах для регенерации растений из листовых дисков. На средах, содержащих 4-PU и TDZ, была достигнута высокая приживаемость меристем из вегетативных почек генотипов, ранее полностью погибавших на средах с 6-БАП (табл. 1).

Таблица 1

Влияние различных цитокининов на развитие меристем *in vitro*

Концентрация цитокинина (мг/л)	Количество меристем			
	6-БАП		4-PU	
	исходных	выживших (%)	исходных	выживших (%)
Генотип малины 22-15-1				
0.2	16	0	17	65
0.5	16	0	12	83
1.0	15	0	17	86
Генотип малины 6-х-ж				
0.2	15	0	16	69
0.5	17	0	16	94
1.0	16	0	17	100

Применение TDZ и 4-PU позволило индуцировать стеблевой морфогенез из цветочных почек и с эффективностью, близкой к 100%, вводить новые формы ремонтантной малины в культуру *in vitro* в течение всего года, независимо от регенерационного потенциала изучаемого генотипа и типа дифференциации почек. В настоящее время разработанный метод успешно применен для введения в культуру *in vitro* более 150 генотипов ремонтантной малины. Для поддержания коллекции разработаны условия длительного беспересадочного культивирования, при комнатной температуре растения оставались зелеными и жизнеспособными в течение 9 месяцев.

В целом, оптимизация метода клонального микроразмножения позволяет в сентябре ввести перспективные генотипы малины в культуру *in vitro* и через 9-10 месяцев, в мае-июне передать размноженный материал для селекционной оценки в полевых условиях. Это обеспечило сокращение на 4 – 5 лет сроков селекции от получения элитной формы до передачи сорта в систему сортоиспытания.

Для создания трансгенных форм ремонтантной малины, устойчивых к болезням, разработаны методы регенерации растений из листовых дисков с применением 4-PU и TDZ. Для большинства образцов оптимальной является концентрация TDZ 0.1 мг/л, для Геракла это – 0.2 мг/л. Стеблевой морфогенез наблюдается у всех исследованных форм - на уровне 3.3 - 96.0% в зависимости от генотипа, более трети изученных форм показали регенерацию на уровне 50% и более. Молодые листья имеют более высокий потенциал регенерации, на старых листьях морфогенез практически отсутствует. При использовании черешков верхних листьев регенеранты наблюдались у 62% эксплантов, у черешков нижних листьев регенерация отсутствовала.

Нами была разработана система генетической трансформации ремонтантной малины методом кокультивирования листовых дисков с *A. tumefaciens*. Эффективность

метода доказана с помощью PCR и тест-системы на наличие лихеназной активности. Для трансформации малины наиболее эффективны методы кокультивирования листовых дисков с агробактерией *A. tumefaciens* под каплей или на газоне ночной бактериальной культуры, при этом частота регенерации достаточна для успешной работы по трансгенезу. Селекция трансформантов проводится по двухэтапной схеме: на этапе регенерации используется минимальная концентрация канамицина, далее концентрация увеличивается в 3-5 раз, что увеличивает эффективность получения трансформантов в несколько раз. Методом ISSR-PCR показана генетическая однородность полученных регенерантов ремонтантной малины и их идентичность исходному образцу.

Таким образом, разработанные методы регенерации и генетической трансформации растений малины позволяют перейти на качественно новый уровень в селекции ремонтантной малины и создавать трансгенные формы с новыми, заранее заданными свойствами.

Для селекции важна оценка генетического родства используемых видов, сортов и генотипов, для чего был разработан молекулярно-генетический метод анализа малины на основе ISSR-PCR. Это позволило провести генетическую паспортизацию и построить дендрограммы генетического родства, отражающие взаимосвязь сортов с обычным типом плодоношения, а также 5 видов малины: *Rubus idaeus* L., *Rubus crataegifolius* Bunge, *Rubus odoratus* L., *Rubus occidentalis* L. и *Rubus arcticus sfellarcticus* G. Larsson ("Sofia" из коллекции ВИРа), и ремонтантных сортов, полученных методом межвидовой гибридизации. Показано, что ремонтантные сорта и генотипы малины характеризуются наличием полосы с молекулярной массой 270 п.н.

Из более 30 различных вирусов, поражающих малину, наиболее трудноконтролируемым и вредоносным является вирус кустистой карликовости малины (ВККМ). Для селекции на устойчивость и толерантность малины к ВККМ, и для контроля распространения вируса нами разработан чувствительный метод обнаружения ВККМ в растениях малины на основе RT-PCR. Показано, что максимальные концентрации вируса в полевом материале наблюдаются в сентябре-октябре. Скрининг лабораторного материала и посадок малины на наличие ВККМ позволяет проводить отбор и выбраковку инфицированных клонов. Проводится клонирование амплифицированных вирусспецифических фрагментов в бактериальные плазмиды для последующего секвенирования и агробактериальной трансформации малины.

Выводы

Оптимизирован метод клонального микроразмножения *in vitro* ремонтантной малины с применением цитокининов TDZ и 4-PU, что обеспечило ускоренное размножение образцов практически независимо от генотипа и резкое ускорение селекции. Разработанная система регенерации ремонтантной малины из листовых дисков и ее трансформации методом кокультивирования с *A. tum.* позволила перейти к работам по созданию трансгенных форм малины. Разработанный метод анализа ВККМ с помощью RT-PCR позволяет проводить массовый скрининг полевых и лабораторных растений на наличие вирусов. Проводится работа по созданию трансгенных форм малины, устойчивых к ВККМ.

Литература

1. *Высоцкий В.А., Алексеенко Л.В.* Чувствительность изолированных органов плодовых растений к *Agrobacterium rhizogenes* в культуре *in vitro* // Плодоводство и ягодоводство России. – 2001. - Т.8, С. 154 – 157.
2. *Казаков И.В.* Малина и ежевика. - М. - 1994. – 114 с.
3. *Кучук Н.В.* Генетическая инженерия высших растений. - Киев.: Наукова думка. – 1997. - 152 с.

4. *Мусийчук К.А.* Бифункциональные репортерные системы для про- и эукариот на основе делеционного варианта термостабильной лихеназы *Clostridium thermocellum*. - Автореф. на соиск. ... канд б.н. – 2001. - 20 с.
5. *Нам И.Я., Заякин В.В., Вовк В.В., Казаков И.В.* Применение методов биотехнологии для ускорения селекции ремонтантной малины // Сельскохоз. биотехнология. Избранные работы под ред. Шевелухи В.С. - Том 1. - Москва. – 2000. - С.79 – 88.
6. *Приходько Ю.Н.* О видовом составе и распространенности вирусов малины в Европейской части России // Плодоводство и ягодоводство России.– Москва, 1997. - Т. 4.– С. 97-101.
7. *Шевелуха В.С.* Проблемы, приоритеты и масштабы сельскохозяйственной биотехнологии в XXI веке / Сельскохозяйственная биотехнология. - Под ред. Шевелухи В.С. – М.: Евразия+. - 2000. – С. 3 – 16.
8. *Fiola J.A., Swartz H.J., Hassan M.A., Bors R.H., Mc Nicol R.J.* Effect of thidiazuron, light fluence rates and kanamycin on shoot organogenesis from excised *Rubus* cotyledons and leaves // Plant cell tissue organ cult. – 1990. - V. 20. - P. 223 – 228.
9. *Graham J.A., Iasi L., Millam S.* Genotype-specific regeneration from a number of *Rubus* cultivars // Plant cell org. Cult.. – 1997. - V.48. - P. 167-173.

Резюме

Для создания новых сортов ремонтантной малины оптимизирован метод клонального микроразмножения *in vitro* с применением цитокининов TDZ и 4-PU. Разработана система регенерации и трансформации, что позволило перейти к созданию устойчивых к ВККМ форм малины. Метод анализа ВККМ с помощью RT-PCR позволяет проводить скрининг полевых и лабораторных растений на наличие вирусов.

For the breeding of everbearer raspberry we have optimize method of clonal micropropagation *in vitro* using cytokinins of diphenylurea – TDZ and 4-PU. Worked out regeneration and transformation system allows to obtain transgenic raspberry forms. To control RBDV content and for breeding resistant cultivars, RT-PCR method of RBDV analyses was developed.

ПАРХОМЕНКО Ю.М., ДОНЧЕНКО Г.В., ПИЛИПЧУК С.Ю., ЧЕХОВСКАЯ Л.И., СТЕПАНЕНКО С.П.

*Институт биохимии им. А.В.Палладина НАН Украины,
01601 Киев, ул. Леонтовича 9, uipark@biochem.kiev.ua*

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПРЕПАРАТА МЕТОВИТАН ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ УСТОЙЧИВОСТИ ОРГАНИЗМА К ВОЗДЕЙСТВИЮ НЕБЛАГОПРИЯТНЫХ ФАКТОРОВ

Хроническое воздействие неблагоприятных факторов (как экзогенного, так и эндогенного происхождения) на организм человека и животных часто является причиной развития стабильного дисбаланса в клеточном метаболизме, что приводит к более серьезным последствиям для здоровья, в частности, к снижению именно статуса, обусловленному нарушениями на уровне биосинтеза белков. В связи с катастрофическим загрязнением окружающей среды на нашем континенте, такая ситуация становится довольно распространенной, и поиск способов коррекции клеточного метаболизма, направленных на повышение выживания организма в неблагоприятных условиях, не теряет актуальности. Один из таких подходов – использование поливитаминных препаратов, так как считается, что воздействие на организм неблагоприятных факторов часто сопровождается и нарушением его витаминного статуса. Однако результаты наших исследований свидетельствуют, что

для стабильного функционирования организма существенную роль играет не только уровень обеспеченности его витаминами, но и не в меньшей степени - способность тканей усваивать витамины, трансформировать их в биологически активные формы, а также присутствие других биологически активных соединений, способствующих активации обмена витаминов. При одновременном введении в организм всего набора витаминов, которые входят в состав широко рекламируемых поливитаминных препаратов, может иметь место конкуренция между отдельными витаминами на уровне их транспорта, метаболизма и даже функционирования [1]. Более рациональным мы считаем разработку витаминсодержащих препаратов, в состав которых входит ограниченное количество компонентов, синергично действующих на отдельные звенья клеточного обмена. Все вышесказанное принималось нами во внимание при создании композиции биологически активных веществ (витамины В₁, В₃, Е, метионин, соль цинка), предназначенной для повышения устойчивости организма человека к неблагоприятным факторам окружающей среды, которая составила основу комплексного препарата, получившего название «Метовитан» [2]. Направленная активация препаратом процессов транссульфирования и трансметилирования способствует повышению синтеза глутатиона – природного пептида, который является важным компонентом биохимической системы антиоксидантной защиты организма и принимает участие в реакциях детоксикации чужеродных соединений [3]. Созданные условия способствуют, в частности, более эффективному использованию в клетках витаминов, входящих в состав препарата (активируется синтез их биологически активных форм – коферментов), благодаря чему их дозы в препарате близки к физиологическим. Под влиянием препарата более эффективно усваиваются из пищи и метаболизируются в организме и витамины, не входящие в состав препарата.

В данной статье приводятся примеры использования препарата для повышения выживания животных в условиях гипоксии, отравлении алкоголем и при эпидемии паратифа (телята).

Материалы и методы

Модель гипоксии вызывали с помощью барокамеры. Для биохимических исследований животных (крысы) - 347 -в барокамере поднимали на условную высоту 9 тыс.м (давление - 230 мм рт.ст.) на 20 мин, после чего давление снижали и крыс брали в эксперимент. Препарат вводили животным на протяжении 7 дней до подъема их на условную высоту в дозе 25 мг на 1 кг массы, в качестве препарата сравнения использовали комплексный витаминный препарат «Декамевит». При получении модели хронического алкоголизма (ХА) в эксперимент брали крыс, которые при предоставлении выбора вода-этанол предпочитали этанол, далее их содержали на 15% растворе этанола на протяжении 5 месяцев, контрольные животные получали воду. За неделю до конца опыта животных с моделью ХА переводили с этанола на воду (модель абстиненции) и делили на 2 группы: крысам одной из этих подгрупп на протяжении 3-х или 5-ти дней до конца опыта ежедневно вводили перорально суспензию препарата «Метовитан» в физиологическом растворе (доза препарата – 25 мг на 1 кг массы), другой подгруппе животных, которая служила контролем на модель абстиненции, аналогичным образом вводили физраствор

Анализ отдельных биохимических показателей, приведенных в данной работе, а именно, концентрация восстановленного глутатиона, скорость образования малонового диальдегида, содержание убихинона (Q), фолиевой кислоты, отношение РНК/ДНК, активность супероксиддисмутазы (СОД), каталазы (КАТ), глутатионредуктазы (ГлР) проводили согласно методам, описанным ранее [4].

Результаты и обсуждение

Гипоксия. При воздействии неблагоприятных факторов на организм первый удар принимает на себя система антиоксидантной защиты. Влияние Метовитана на ферментную систему антиоксидантной защиты мы изучали на модели гипоксической

гипоксии. Данные, приведенные в Табл.1, свидетельствуют, что введение препарата животным до условного подъема их на высоту 9 тис. м в значительной мере предупреждало в ткани мозга снижение активности ферментов антиоксидантной защиты, которое отмечалось у животных, подвергшихся действию гипоксии без введения препарата. Активность СОД и КАТ в ткани мозга животных, которым до опыта ввели Метовитан, по окончании опыта оставалось практически на уровне нормы, в то время как введение в тех же условиях поливитаминового препарата Декамевит не предупреждало снижения активности этих ферментов под действием гипоксии.

Табл. 1

Активность СОД (ед. за мин. на 1 мг Нв), КАТ (мкмоль за мин. на 1 мг Нв), глутатионредуктазы (ГлР., мкмоль за мин. на 1 мг белка), содержание малонового диальдегида (МДА, мкмоль на 1 мг белка) в цитоплазматической фракции клеток мозга при различных условиях.

Показатель	Группа животных			
	Контроль	Гипоксия	Гипоксия + Метовитан	Гипоксия + Декамевит
СОД	79,6±2,1	15,2±1,1*	75,2±3,5**	14,1±1,2*
КАТ	85,5±4,2	58,6±3,0*	83,2±2,1**	69,7±3,1*
ГлР	15,9±0,4	4,7±0,3*	6,8±0,2**	7,1±0,3*
МДА	0,6±0,1	2,7±0,1*	0,9±0,1**	1,8±0,1*
Срок выживания животных при гипоксии		23,0±1.5	36,0±2.1* p < 0.05	29,2±1.9* p < 0.05

**/здесь и далее эта пометка указывает на данные, которые достоверно отличаются от таких же данных в контрольной группе животных при p<0,05; **/- указывает на данные, которые достоверно отличаются от данных в группе животных, подвергшихся действию неблагоприятного фактора при p<0,05;*

Аналогичные результаты получены при анализе сыворотки крови тех же животных. Для того, чтобы оценить, как вышеуказанное действие препарата на метаболические процессы сказывается на жизнеспособности организма животных, был проведен эксперимент по оценке срока выживания крыс в условиях гипоксии без введения препарата и после его введения. Как видно из Табл.1, предварительное введение животным препарата в вышеуказанной дозе продлевало срок жизни животных в условиях гипоксической гипоксии более чем в полтора раза.

Алкоголизм. Хроническое употребление алкоголя является причиной серьезных нарушений метаболических процессов в клетках, которые тяжело восстанавливаются после отмены алкоголя и могут стать причиной необратимых изменений в тканях [4, 5]. Учитывая целенаправленное действие препарата Метовитан на активацию процессов трансметилирования и транссульфирования в тканях, мы проверили его влияние на нормализацию некоторых показателей, связанных с эффективностью функционирования этих процессов, а именно: содержание глутатиона в тканях мозга и печени, содержание убихинона в сердечной мышце (отображает синтез кофермента Q, который существенно зависит от процессов трансметилирования), содержание фолиевой кислоты, обмен которой, в частности, всасывание, также страдает при хроническом алкоголизме и которая необходима для переноса одноуглеродных радикалов, и отношение РНК/ДНК (отображает интенсивность синтеза белков). Биологически активная форма фолиевой кислоты принимает непосредственное участие в реакциях трансметилирования, поэтому существенное снижение ее концентрации в тканях негативно сказывается на многих процессах. Глутатион играет ключевую роль в биологической системе антиоксидантной защиты организма, поэтому, можно считать, что его уровень в тканях является показателем функционирования этой системы при разных физиологических условиях. Хроническое употребление алкоголя приводит к достоверному снижению уровня глутатиона (в

среднем на 20%) в тканях мозга и печени. При этом если в печени через 3 и 7 дней после отмены алкоголя этот показатель почти не отличается от такового в контроле, то в ткани мозга его нормализация происходит только при введении препарата.

Как свидетельствуют данные табл. 2, содержание коэнзима Q, убихинона, отношение РНК/ДНК также критически снижаются при продолжительном действии алкоголя на организм и почти не восстанавливаются через 7 дней после его отмены без введения препарата. Введение препарата Метовитан значительно ускоряет нормализацию этих показателей.

Табл. 2

Содержание кофермента Q (убихинона) в сердечной мышце (мкг на 1 г ткани), фолиевой кислоты (мкг на 1 г ткани) в крови, отношение РНК/ДНК в ткани печени разных групп подопытных животных, $M \pm m$, n=5-6

Группа животных	Показатель		
	Содержание убихинона	Содержание фолиевой кислоты	Отношение РНК/ДНК (печень)
Контрольная	36,00 ± 8,86	0,790±0,105	18,1 ± 1,40
+ 15% раствор алкоголя	7,15 ± 3,52*	0,250±0,016*	11,8 ± 2,3*
Отмена алкоголя 3 дня	8,93 ± 3,42*	0,283±0,033*	13,5 ± 2,2
Отмена алкоголя 3 дня + препарат	18,80 ± 4,46	0,336±0,028*	17,7 ± 2,00**
Отмена алкоголя 7 дней	10,56 ± 4,50*	0,307±0,050*	-
Отмена алкоголя 7 дней + препарат	26,85 ± 5,15**	0,550±0,074**	-

Проверка действия препарата на телятах. Исследование проводилось в животноводческом хозяйстве на двух группах телят по 8 особей в каждой в период эпидемии парагриппа. Препарат давали телятам опытной группы в дозе 0,1 г на 1 кг массы тела ежедневно на протяжении 1 недели. Телята контрольной группы не получали препарата Метовитан, в остальных условиях содержания были одинаковы. Наблюдение продолжалось в течение 30 дней. Согласно заключению специалистов, телята контрольной группы переносили заболевание тяжело, на 2-3-й день развивался сильный понос, двое особей из 8 погибло (25%). Телята опытной группы переносили заболевание в легкой форме, поноса не наблюдалось, все особи остались живы.

Выводы

Приведенные материалы свидетельствуют, что препараты, включающие комплексы отдельных витаминов с другими биологически активными соединениями, созданные с учетом целенаправленного и синергического действия компонентов на определенные участки клеточного метаболизма, более эффективны в поддержании жизнедеятельности организма, чем поливитаминные препараты, содержащие полный набор витаминов. Разработанный авторами по такому принципу препарат Метовитан может быть с успехом применен для повышения устойчивости организма человека и животных к действию неблагоприятных факторов.

Литература

1. Донченко Г.В., Пархоменко Ю.М. и др. Обеспеченность жителей г. Киева витаминами С и В₁ и Эффективность комплексных витаминно-минеральных препаратов в профилактике весенних авитаминозов/ Укр. Биохим. Журн., 2000, № 6, С.
2. Пархоменко Ю.М., Донченко Г.В., Протасова З.С и др. "Препарат для підвищення життєстійкості організму". Патент України № 39228 від 15.06. 2001 р. , Бюл.№5
3. Кулинский В. И. Глутатион // Успехи биол. химии. –1990. – № 30. – С. 157–180.
4. Ю.М.Пархоменко, Г.В.Донченко, Пилипчук С.Ю., С.П.Степаненко, Л.И.Чеховская, К.П.Клименко. Характерные метаболические нарушения в тканях крыс, вызванные длительным приемом алкоголя/ Укр. Биохим. Журнал, 2007. - т. 79, № 3. - С. 61-69.

5. Schweinsburg BC, Alhassoon OM, Taylor MJ, et al. Effects of alcoholism and gender on brain metabolism /Am J Psychiatry. 2003 Jun;160(6):1180-3.

Резюме

Действие препарата Метовитан в организме направлено на активацию процессов транссульфирования и трансметилирования, что ведет к усилению биохимической системы антиоксидантной защиты и реакций детоксикации ксенобиотиков. Позитивный эффект препарата показан на крысах с моделями гипоксии и алкогольной интоксикации и подтвержден в производственных условиях на телятах в период эпидемии парагриппа.

Дія препарату Метовітан в організмі спрямована на активацію процесів транссульфування та трансметилування, що веде до посилення біохімічної системи антиоксидантного захисту та реакцій детоксикації ксенобіотиків. Позитивний ефект препарату продемонстровано на моделях гіпоксії та алкогольної інтоксикації на щурах і підтверджено в промислових умовах на телятах під час епідемії парагрипу.

The action of drug Metovitan is directed on activation of processes of transsulfurizing and transmethylation in cells that promotes increase of a biochemical system of antioxidation protection and reactions of xenobiotics detoxication. The positive effect of Metovitan on living organism had been shown on models of a hypoxia and alcoholic intoxication. The effect is confirmed on calfs during epidemic of a paraflu under production conditions.

ПОГОРЕЛКО Г.В., ФУРЦОВА О.В., ОГАРКОВА О.А., ТАРАСОВ В.А.

Институт Общей Генетики РАН

ул. Губкина д.3, 119991, Москва, Россия, e-mail: gpogorelko@yandex.ru

НОВЫЙ ПОДХОД В ИЗУЧЕНИИ СУПЕРЭКСПРЕССИРУЮЩИХ МУТАНТОВ *A.thaliana*

Расшифровка полной нуклеотидной последовательности генома *Arabidopsis thaliana* в конце 2000г. позволила реально перейти к решению центральной проблемы молекулярной генетики высших растений – идентификации функции генов.

В последние 10-15 лет были разработаны методы для эффективного массового получения инсерционных мутантов *A. thaliana* (Feldmann et. al., 1987, Bechtold et. al., 1993). В результате были созданы представительные коллекции мутантных линий *A. thaliana*, семена которых собраны в коллекционных центрах ABRC, NASC, SALK и GABI.

Однако большинство созданных коллекций инсерционных мутантов содержат линии, несущие *loss-of-function* мутации – связанные с потерей функции генов, которые позволяют изучать функции только стабильно экспрессирующихся в ходе развития растений генов. Этим обусловлен интерес к индукции мутаций другого типа, например, мутаций, вызывающих суперэкспрессию генов. Индукция мутаций такого рода достигается с помощью векторов, Т-ДНК которых содержит около одного из бордеров сильный промотор (или энхансер) (Weigel et al., 2000).

Однако когда структура инсерции содержит энхансер, могут возникать мутации двух типов: *loss-of-function* мутации, связанные с инактивацией гена при встраивании в него инсерции, и мутации, обусловленные наличием энхансера в структуре инсерции. При массовом получении и анализе инсерционных мутаций, полученных с помощью такого рода векторов, необходимо иметь относительно простую и эффективную систему идентификации *loss-of-function* мутаций и мутаций, связанных с

суперэкспрессией генов – так называемых *gain-of-function* мутаций. Вектора для трансформации растений, несущие в составе Т-ДНК энхансеры, используются для получения суперэкспрессирующих мутантов *A.thaliana* уже более 10 лет (Koncz et al. 1994; Weigel et al., 2000). Однако, при использовании таких векторов, возникают технические и принципиальные сложности. Основная проблема, связанная с использованием этих векторов, заключается в необходимости решения вопроса – обусловлены ли наблюдаемые фенотипические изменения инактивацией гена за счет интеграции в него инсерции или суперэкспрессией близлежащих генов.

Материалы и методы

Растения *A.thaliana* Col-0 экотипа выращивались при 21-23°C с нормальным освещением (16 часов день, 8 часов ночь) лампами Phillips BioLux при 60% влажности.

Трансформация *A. tumefaciens* производилась методом «замораживания-оттаивания» (Höfgen R and Willmitzer L, 1988). Трансформация *Arabidopsis thaliana* производилась методом вакуумной инфльтрации (Bechtold and Pelletier, 1998).

Точную локализацию инсерций в геноме проводили при помощи модифицированного метода inverse PCR.

Результаты и обсуждения

Система векторов pEnLox/pCre.

Система двух векторов pEnLox (Рис.1) и pCre (Погорелко и др., 2007) используется следующим образом. Энхансер в составе Т-ДНК плазмидного вектора pEnLox окружен *loxP*-сайтами. Следующее поколение от скрещивания исследуемого инсерционного мутанта, полученного путем трансформации вектором pEnLox, с другой трансгенной линией *A. thaliana*, несущей ген *cre*, высевается *in vitro* на селективную среду с антибиотиком гигромицином и после отбора устойчивых растений обрабатывается экзогенно дексаметазоном, в результате чего происходит удаление энхансерной последовательности. После вырезания энхансера, в последовательности Т-ДНК, по-прежнему встроенной в геномную ДНК, остается ген гербицид устойчивости с промотором и один из *loxP*-сайтов. Таким образом этот оставшийся интегрированным в геном фрагмент Т-ДНК преобразуется в обычный тип инсерций, которые используются для получения *loss-of-function* мутантов, а сам мутант, после вырезания энхансера, преобразуется в обычного *loss-of-function* мутанта.



Рисунок 1. Физическая карта вектора pEnLox. На последовательности, ограниченной бордерами, показан ген устойчивости к селективному гербициду Баста, под контролем промотора и терминатора и энхансер окаймленный *lox*-сайтами.

Получение коллекции инсерционных мутантов *Arabidopsis thaliana* при помощи вектора pEnLox.

Используя данную систему векторов, была получена начальная коллекция новых линий мутантов, несущих в геноме инсерцию Т-ДНК плазмиды pEnLox.

На первом этапе анализа семян Т2 поколения было отобрано 156 устойчивых к гербициду Баста растений (Е-линий), и 8 устойчивых к антибиотику гигромицину растений (С-линии).

Для подтверждения наличия инсерции/инсерций Т-ДНК в геноме мутантов анализируемых линий растений, а также для определения их количества, было осуществлено два последовательных эксперимента.

Анализ Т3 поколения

Три четверти анализируемых линий показали в Т3-поколении наследование маркера устойчивости к гербициду по моногенному типу, что соответствовало расщеплению 3:1, и одна четверть мутантов содержала в геноме 2 независимо интегрированных инсерции.

Данные, полученные путем анализа расщеплений по признаку устойчивости к селективному маркеру в Т3-поколении отобранных линий, были проверены более точно с помощью блот-гибридизации по Саузерну рестрицированной геномной ДНК с фрагментом Т-ДНК плазмиды pEnLox.

Установление точной локализации инсерций в геноме.

На следующем этапе анализа геномную ДНК мутантов линий: E1, E4, E7, E10, E12, E13, E14, E15, E17, E18, E20, E21, E23, E30, E31, E35, E37 и E40 использовали для RC-PCR. В результате были амплифицированы 38 независимых «гибридных» фрагментов ДНК, состоящих из околорядерной последовательности Т-ДНК и примыкающей к ней неизвестной геномной.

Полученные FSFs были секвенированы и результаты были проанализированы с помощью программы BLAST сервера NCBI, что позволило конкретно локализовать нахождение инсерций Т-ДНК в геномах исследуемых E-мутантов, а также определить возможные гены, на экспрессию которых возможно повлияла инсерция..

Проверка работоспособности системы векторов pEnLox/pCre.

Для доказательства работоспособности системы векторов pCre/pEnlox мы использовали 6 E-линий (E1, E4, E7, E9, E10, E12) и 8 гомозиготных C-линий (C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8), не отличающихся от фенотипа растений дикого типа. В связи с тем, что для скрещивания необходимы зрелые растения, в работе использовались растения 4-х недельного возраста.

Скрещивание E-линий с C-линиями.

Не опыленные бутоны E-растений (акцепторы) были скрещены со зрелыми цветами C-линий (доноры) путем непосредственного тесного контакта таким образом, чтобы донорная пыльца максимально покрыла поверхность бутона. Известно, что для максимальной эффективности оплодотворения сторонней пыльцой у однодомных растений самоопылителей с обоеполыми цветками необходимо удалить андроцей до созревания гинецея и раскрыть бутон для увеличения вероятности попадания пыльцы на поверхность пестика. Такие кропотливые процедуры, требующие большого опыта, часто приводят к гибели цветков. Однако, в случае системы pCre/pEnLox, как упоминалось выше, скрещиваемые растения несут принципиально разные селективные маркеры и процесс получения мутантов, несущих Т-области обоих векторов, значительно упрощается.

Удаление энхансера из состава интегрированной в геном Т-ДНК.

Через 2-3 дня после пересадки в открытый грунт, устойчивые к гигромицину растения опрыскивались 0.1 μ M дексаметазоном один раз в день в течение 6 дней и гербицидом Баста (250мг/л) 6 раз через день в течение 12 дней. После обработки вторым селективным маркером и дексаметазоном – стимулятором изменения третичной структуры GR-домена белка фьюжена CreGR, в течение нескольких часов происходило проникновение в ядра клеток рекомбиназы Cre и удаление энхансера из геномной ДНК под ее воздействием.

Проверка эффективности удаления методом ПЦР

Через неделю после обработки, геномную ДНК растений мы проанализировали при помощи ПЦР, используя фланкирующие энхансер праймеры, и показали 100% эффективность вырезания внутреннего фрагмента между двумя *lox*-сайтами. Мы

использовали геномную ДНК - пул из 5-ти независимых «двойных» мутантов для каждой E-линии.

Идентификация генов, супер-экспрессия которых влияет на морфогенез *Arabidopsis thaliana*.

Среди отобранных нами трансформантов нам удалось выявить 3 линии: E9, E78 и E134, отличающихся от растений дикого типа по морфологическим признакам. Проверка точной локализации инсерций в морфологических мутантах показала, что во всех трех линиях Т-ДНК встроилась непосредственно перед старт-кодонами генов таким образом, что энхансер направлен на старт-кодоны и потенциально может вызывать супер-экспрессию этих генов (Табл. 1).

Таблица 1

Локализация инсерций в линиях с измененной морфологией

№ линии	Ген/Длина	Описание продукта	Стрра гена	Локализация/Ориентация инсерции	GenBank Acc.№
E9	<i>AT5G10080</i> 2538 п.н.	Белок семейства аспартил протеаз	9 экз.	Инсерция за 400 п.н. до старт-кодона. Энхансер направлен на старт-кодон.	DX575044
E78	<i>AT1G33390</i> 4371 п.н.	DEAH-бок АТФ-зависимая хеликаза	8 экз.	Инсерция за 530 п.н. до старт-кодона. Энхансер направлен на старт-кодон.	EI183464
E134	<i>AT5G13760</i> 2922 п.н.	Неизвестный белок содержащий пролин богатый домен	5 экз.	энхансер за 270 п.н. до старт кодона и смотрит на него	EI232171

Реверсия E-мутантов к фенотипу дикого типа.

После удаления энхансера из геномной ДНК E-мутантов экспрессия генов *At5g10080*, *At1g33390* и *At5g13760* была остановлена тогда как остаток Т-ДНК присутствовал в геноме. Растения мутантной линии с удаленным энхансером обладали фенотипом растений дикого типа, т.е. являлись полными ревертантами (Рис.2).

Рисунок 2

Сравнение фенотипов растений E9, E9/C4 E78, E78/C4, E134, E134/C4 и A. thaliana Col0. Возраст 7 недель.



- (A) Исходный мутант E9
- (B) «Двойной мутант» E9/C4 после скрещивания обработанный дексаметазоном
- (C) Исходный мутант E78
- (D) «Двойной мутант» E78/C4 после скрещивания обработанный дексаметазоном
- (E) Исходный мутант E134
- (F) «Двойной мутант» E134/C4 после скрещивания обработанный дексаметазоном
- (G) Растение дикого типа *A. thaliana Col0*

Основываясь на полученных данных можно утверждать, что супер-экспрессия гена *At5g10080*, кодирующего белок класса аспартиловых протеаз А1 локализирующегося в клеточных мембранах приводит к нарушениям нормального морфогенеза растений – замедляет рост, изменяет окраску и приводит к уменьшенному габитусу взрослых растений. Супер-экспрессия гена *At1g33390*, кодирующего белок класса АТФ-зависимых хеликаз вызывает нарушения нормального развития стеблей растений, а именно вызывает развитие фасцированного стебля. Изменение экспрессии гена *At5g13760*, кодирующего белок содержащий пролин-богатый домен приводит к нарушениям нормального развития растений, а именно вызывает замедление роста и уменьшение фертильности.

Литература.

1. *Feldmann, K., Marks, M.*, Agrobacterium-mediated transformation of germinating seeds of *Arabidopsis thaliana*: A non-tissue culture approach. *Mol. Gen. Genet.* 1987. 208, 1-9
2. *Bechtold, N., Ellis, J., Pelletier, G.*, In planta Agrobacterium-mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. Paris: C. R. Acad. Sci. Sciences de la vie / Life sciences. 1993-316, 1194-1199.
3. *Bechtold, N., Pelletier G.*, In planta Agrobacterium-mediated transformation of adult *Arabidopsis thaliana* plants by vacuum infiltration. *Methods Mol Biol.* 1998. 82, 259-266
4. *Höfgen, R., Willmitzer, L.*, Storage of competent cells for Agrobacterium transformation. *Nucl. Acids Res.* 1988. 16, 9877
5. *Koncz, C., Martini, N., Szabados, L., Hrouda, M., Bachmair, A., Schell, J.*, Specialized vectors for gene tagging and expression studies. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. 1994- B1-22
6. *Pogorelko, G., Fursova, O., Ogarkova, O., Tarasov, V.*, New vector system for induction of gene expression in dicotyledonous plants. *Genetika (Rus)* 2007. 43-2, 194-201
7. *Weigel, D. et al.*, Activation tagging in *Arabidopsis*. *Plant Physiology.* 2000. 122-4, 1003-13

РАХМЕТОВ Д.Б.², БАЄР Г.Я.¹, СТАДНІЧУК Н.О.², ЄМЕЦЬ А.І.¹, БЛЮМ Я.Б.¹

¹*Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України,*

Україна, 03680, Київ, вул. акад. Заболотного, 148,

E-mail: galinabayer@univ.kiev.ua

²*Національний ботанічний сад ім. М.М. Гришка НАН України,*

Україна, 01014, Київ, вул. Тимірязєвська, 1

ВИВЧЕННЯ БІОХІМІЧНИХ ХАРАКТЕРИСТИК СОМАКЛОНАЛЬНИХ ВАРІАНТІВ ПАЛЬЧАСТОГО ПРОСА

Традиційний селекційний процес, що базується на використанні статевої гібридизації як засобу передачі генетичної інформації, дозволив досягти значних успіхів у підвищенні урожайності і якості багатьох культур, однак інтенсифікація сільського господарства ставить перед селекціонерами складні задачі по створенню нових сортів, що відрізняються високою врожайністю, стійкістю до хвороб, шкідників, стресових факторів навколишнього середовища, високою пластичністю. Для створення більш досконалих сортів необхідно розробляти нові прискорені методи підвищення результативності селекційного процесу. Одним з важливих шляхів у цьому напрямі на сьогоднішній день є використання біотехнологічних прийомів, одним з яких є отримання соматоклональних варіантів в культурі *in vitro*, які набули нових ознак. Перевагою даного методу є поява нових форм з високим рівнем адаптації і неспецифічної стійкості до шкідливих факторів навколишнього середовища з покращеними господарсько цінними характеристиками (Arun et al., 2003; Bulk, 1991;

Carver and Jonson, 1989; Maralappanavar et al., 2000; Mohmand and Nabros, 1990; Patnaik et al., 1999). Отже, виходячи з наведеного вище, соматоклональну варіабельність розглядають як ефективний інструмент, що значно прискорює селекційний процес у процесі створення нових сортів рослин.

Останнім часом особливу увагу привертає створення нових сортів нетрадиційних культур, серед яких важливе значення має пальчасте просо (*Eleusine coracana* (L.) Gaertn.) як зернова та фуражна культура, а також сировина для виробництва біоетанолу. Раніше нами було отримано соматоклональні варіанти пальчастого проса (Емец и др., 2003), серед яких було відібрано три лінії SE-1, SE-4, SE-7, котрі відрізнялись високою врожайністю, скороченим періодом вегетації та здатністю проростати при нижчих температурах у порівнянні з вихідною лінією (Баер и др., 2007). Тому метою даної роботи було проведення біохімічного аналізу соматоклональних варіантів для виявлення генотипів з покращеними господарськими якостями.

Матеріали та методи

В роботі використовували вихідну лінію *E. coracana* (Стадничук и др., 2003) і три лінії соматоклональних варіантів пальчастого проса: SE-1, SE-4, SE-7 (Баер и др., 2007). Біохімічну оцінку насіння та надземної маси проводили згідно стандартних методик (Крищенко, 1983; Починок, 1976; Разумов, 1986).

Результати та обговорення

Порівняльні дослідження біохімічного складу надземної маси і насіння дозволили встановити, що за кількістю поживних, мінеральних та біологічно активних речовин соматоклони перевищують вихідну лінію (Табл. 1-3). Так, зокрема, не дивлячись на те, що за вмістом сухої речовини у надземній масі майже немає відмінності між соматоклонами SE-1, SE-7 і контролем, у варіанті SE-4 даний показник дещо нижчий. Однак вміст ліпідів у надземній масі даного соматоклону майже вдвічі вищий порівняно з контролем і становить 4%, тоді як у двох інших зразках цей показник на відсоток нижчий порівняно з контролем. Найменший вміст клітковини був у соматоклонального варіанту SE-1, а найбільший – у SE-4 і SE-7. За кількістю загального білку і аскорбінової кислоти, що знаходилися у надземній масі рослин, усі соматоклони переважали контроль. При цьому слід виділити соматоклон SE-1, для якого відмічали загальний вміст білку на рівні 7,47 % та аскорбінової кислоти – 736,03 мг %, тоді як для контролю дані показники були в півтора-два рази меншими.

Таблиця 1

Біохімічна характеристика надземної маси соматоклональних варіантів та вихідної лінії пальчастого проса *E. coracana* на початку фази колосіння

Варіант	Суха речовина, %	Ліпіди, %	Клітковина, %	Білок, %	Аскорбінова кислота, мг %	Каротин, мг %	БЕР, %	Зола, %	Загальний цукор, %
Контроль	28,82	2,81	36,49	4,88	280,15	1,73	49,37	6,45	5,38
SE-1	29,08	1,85	34,00	7,47	736,03	2,68	53,92	4,76	6,16
SE-4	21,69	4,01	39,32	6,84	373,44	4,10	42,02	7,81	13,51
SE-7	27,45	1,99	38,40	5,40	321,95	2,92	50,61	3,61	7,91

Таблиця 2

2

Біохімічна характеристика насіння соматоклональних варіантів та вихідної лінії пальчастого проса *E. coracana*

Варіант	Суха речовина, %	Ліпіди, %	Клітковина, %	Білок, %	Каротин, мг %	БЕР, %	Зола, %	Загальний цукор, %

Контроль	90,27	0,63	2,9	10,3	0,7	83,17	2,84	1,6
SE-1	90,94	0,89	3,5	8,7	0,9	83,80	2,99	2,0
SE-4	91,03	1,44	2,9	8,6	0,5	84,43	2,58	2,0
SE-7	91,02	0,84	2,7	6,9	1,0	87,0	2,9	2,1

Таблиця 3

Біохімічна характеристика надземної маси (на початку колосіння) та насіння соматоклональних варіантів та вихідної лінії *E. coracana*

Варіант	Мікроелементи, % на абсолютно суху речовину					
	надземна маса на початку колосіння			Насіння		
	Азот	P ₂ O ₅	CaO	азот	P ₂ O ₅	CaO
Контроль	0,78	0,60	0,51	1,6	0,6	0,08
SE-1	1,19	0,67	0,58	1,4	0,5	0,19
SE-4	1,09	0,44	0,63	1,4	0,5	0,05
SE-7	0,82	0,65	0,51	1,0	0,5	0,06

Ще одним важливим вітаміном для нормальної життєдіяльності організму є вітамін А. У рослинних кормах міститься не сам вітамін А, а його провітаміни - каротиноїди. Вміст каротину в надземній масі SE-4 був вдвічі більшим за контроль – 4,1%, два інші соматоклони мали дещо нижчі показники від попереднього, однак незначно переважали контроль. Вміст безазотистої екстрактивної речовини (БЕР), яка включає в себе крохмаль, цукри, геміцелюлози і пектини, був достатньо високим у надземній масі всіх зразків і знаходився на рівні 50%. Одним з факторів, що впливає на енергоємність є кількість золи в сухій речовині. Як правило, вміст золи у вегетативній частині рослини значно вищий, ніж у насінні (Омельяненко, 1985). Найбільша кількість золи знайдена в надземній масі соматоклону SE-4-7,81 %, тоді як в SE-7 містилось золи майже вдвічі менше порівняно з контролем. Було також досліджено вміст загального цукру. В результаті було виявлено, що за даною характеристикою всі соматоклони перевищують контроль. Так, у надземній масі варіанту SE-4 містилося вдвічі більше цукру ніж у контролю - 13,51% і 5,38%, відповідно.

За вмістом сухої речовини в насінні майже не було відмінності серед досліджуваних зразків, однак по вмісту ліпідів слід виділити SE-4, в якому їх знаходилося вдвічі більше порівняно з контролем. Інші соматоклони майже не відрізнялися від контролю за даним показником. Не зважаючи на те, що у SE-1 містилося найменше клітковини у надземній масі, в насінні вміст даної сполуки був найвищим. За кількістю білку в насінні переважав контроль, тоді як у соматоклональних варіантів SE-1 та SE-4 значення майже не відрізнялися. У SE-7 вміст білку був найменшим. За вмістом золи дещо відставав соматоклон SE-4. Найбільший вміст БЕР відмічали у соматоклона SE-7, у насінні двох інших соматоклонів кількість даної речовини була однаковою. В результаті дослідження концентрації цукру в як в насінні, так і в надземній масі відповідні показники для соматоклонів перевищували контрольний варіант. Зокрема, всі соматоклони містили 2 % цукру в надземній масі, і 1,6 % цукру знаходилося у насінні вихідної лінії. Тож, крім вихідної лінії всі соматоклони містили однаково високу концентрацію цукру.

Важливим показником для кормових культур є вміст мікроелементів. Біохімічний аналіз соматоклонів показав, що у наземній біомасі соматоклонів знаходиться дещо вищий вміст азоту і становить від 0,82 до 1,19% відповідно для варіантів SE-7 і SE-1, однак у насінні контрольного варіанту знаходилася найбільша кількість азоту. За вмістом фосфору в надземній масі та насінні значних відмінностей між зразками не відмічали. Одержані результати за вмістом мікроелементів у надземній масі та насінні показали, що соматоклони *E. coracana* мають досить високий рівень вмісту кальцію та фосфору, що взагалі не характерно для злакових культур, по цих показниках соматоклони

не поступаються таким бобовим культурам, як люцерна посівна і соя (Омельяненко, 1985; Reed, 1976).

Отже, як видно з представлених результатів, у надземній масі соматоклону SE-1 міститься найбільша кількість білку, БЕР, сухої речовини, аскорбінової кислоти та найменший вміст клітковини. Виходячи з вищенаведеного, соматоклон SE-1 можна рекомендувати як високоякісну кормову культуру, а варіант SE-4 завдяки підвищеному вмісту цукру представляє інтерес як біоенергетична культура для виробництва етанолу.

Робота виконана за підтримки цільової комплексної програми НАН України «Біомаса як паливна сировина», грант № 6/П-19-07(2007-2009 рр.).

Література

Емец А.И., Баер Г.Я., Климкина Л.А., Стадничук Н.А., Абрамов А.А., Блюм Я.Б. Введение в культуру *in vitro* и регенерация растений дагуссы *Eleusine coracana* (L.) Gaertn. сорта Тропиканка // Физиол. биохим. культ. растений.-2003. – Т.35, № 2. – С. 1-8.

Крищенко В.П. Методы оценки качества растительной продукции.- Москва.-1983.-192с.

Починок Х.М. Методы биохимического анализа растений. – К.:Наука. Думка. – 1976. – 334с.

Разумов В.А. Справочник лаборанта-химика по анализу кормов. – Москва. – 1986.-304с.

Омельяненко А.А. Справочник по качеству кормов. – К.: Урожай, 1985. – 192 с.

Стадничук Н.О. Интродукция *Eleusine coracana* (L.) Gaertn. на уровне сорта в Лесостепи Украины //Биологическое разнообразие. Интродукция растений. –Санкт-Петербург. – 2003. – С. 257-259.

Arun B., Joshi A.K., Chand R., Singh B.D. Wheat somaclonal variants showing earliness, improved spot blotch resistance and higher yield //Euphytica. – 2003. – 132. – P. 235-241.

Bulk R.W. Application of cell and tissue culture and *in vitro* selection for disease resistance breeding - a review //Euphytica. – 1991. – 56. – P. 269-285.

Carver B.F., Jonson B.B. Partitioning of variation derived from tissue culture of winter wheat //Theor. Appl. Genet. – 1989. – 78. – P. 405-410.

Larkin P., Scowcroft W.R. Somaclonal variation - a novel source of variability from cell culture for plant improvement // Theor. Appl. Genet. – 1981. – 60. – P. 197-214.

Maralappanavar M. S., Kuruvinashetti M.S., Harti C.C. Regeneration, establishment and evaluation of somaclones in *Sorghum bicolor* (L.) Moench. //Euphytica. – 2000. – 115. – P. 173-180.

Mohmand A.S., Nabors M.W. Somaclonal variant plants of wheat derived from mature embryo explants of three genotypes // Plant Cell Rep. – 1990. – 8. – P. 558-560.

Patnaik J., Sahoo S., Debata B.K. Somaclonal variation in cell suspension culture-derived regenerants of *Cymbopogon martinii* (Roxb.) Wats var. *motia* //Plant Breed. – 1999. – 118. – P. 351-354.

Reed C. F., 1976. Information summaries on 1000 economic plants. Typescripts submitted to the USDA.

Ryan S. A., Larkin P. J., Ellison F. W. Somaclonal variation in some agronomic and quality characters in wheat //Theor. Appl. Genet. – 1987. – 74. – P. 77-82.

Резюме

У роботі наведено результати біохімічного аналізу соматоклональних варіантів пальчастого проса *E. coracana*. За цінними господарськими характеристиками соматоклон SE-1 можна рекомендувати використовувати як кормову культуру, а SE-4, завдяки підвищеному вмісту цукру, представляє інтерес як біоенергетична рослина для виробництва етанолу.

В работе представлены результаты биохимического анализа соматоклональных вариантов пальчатого проса *E. coracana*. Благодаря ценным хозяйственным признакам соматоклон SE-1 можно рекомендовать использовать в качестве кормовой культуры, а SE-4, благодаря повышенному содержанию сахара представляет интерес как биоэнергетическая культура для производства этанола.

The results of biochemical analysis of somaclonal variants of finger millet *E. coracana* have been presented in this report. Owing to the important economic traits the somaclon SE-1 can be recommended to use as qualitative feed crop, and due to high sugar content SE-4 is of interest as bio-energetic culture for bioethanol production.

СОРОЧИНСЬКИЙ Б.В., БЛЮМ Я.Б.

*Інститут клітинної біології і генетичної інженерії НАН України,
вул. Заболотного 148, Київ, 03143, e-mail: bsorochinsky@yahoo.com*

ПРИНЦИПИ РЕГУЛЮВАННЯ ДІЯЛЬНОСТІ, ЩО СТОСУЄТЬСЯ ГМ ОРГАНІЗМІВ, ТА ДЕЯКІ ПРОБЛЕМИ БІОБЕЗПЕКИ В УКРАЇНІ

Масштаби досліджень та сфера застосування генетично модифікованих організмів (ГМО) зростають з року в рік, що вимагає розроблення правових засад та формування відповідних національних і міжнародних систем біобезпеки при роботі з ГМО. Ефективна система біобезпеки повинна регулювати та регламентувати дослідницькі роботи на етапі створення ГМО, їх реєстрації і використання та запобігти також неконтрольованому розповсюдженню та поширенню генетично модифікованих організмів.

Під біобезпекою стосовно генетично модифікованих організмів розуміють стан захищеності, що досягається за допомогою використання системи заходів, які направлені на запобігання або пониження до безпечного рівня можливих шкідливих впливів ГМ організмів на здоров'я людини та на навколишнє середовище. Система біобезпеки повинна, насамперед, бути ефективною адміністративною системою, що керується в своїй діяльності відповідною законодавчою базою. Така система повинна забезпечувати обгрунтоване прийняття рішень стосовно різних етапів генно-інженерної діяльності, включаючи оцінку і попередження ймовірного ризику при її здійсненні на етапі проведення науково-дослідних робіт, та в інших видах діяльності, а також передбачити механізми залучення громадськості до прийняття рішень стосовно вивільнення ГМО для практичного використання. Відповідна законодавча, на яку спирається функціонування системи біобезпеки, повинна врегулювати питання, що мають відношення до всіх головних напрямів генно-інженерної практики, враховуючи діяльність в замкнених системах, тобто системах, які дозволяють ізолювати генетично-модифіковані організми від контактів з навколишнім середовищем; вивільнення ГМО в навколишнє середовище та їх використання в господарській діяльності, включаючи також і правові акти, що зазначають правила ввозу ГМ організмів в країну та їх вивіз за кордон.

Регулювання активності стосовно ГМО впроваджене в США та в країнах Західної Європи з кінця 80-х років. Станом на сьогодні велика кількість країн, у т.ч. і країн так званого "третього світу" в Азії, Африці та Латинській Америці, впровадили національне законодавство стосовно регулювання, вивільнення та маркування генетично модифікованої продукції. Загалом, вже понад 50 країн мають відповідну законодавчу базу, що регламентує процедуру створення, випробування та використання генетично модифікованих організмів. Передумовою для розроблення законодавчої та нормативно-правової бази стосовно генетично модифікованих організмів можна

вважати "мораторій Берга" (1974 р.) з пропозицією тимчасово призупинити роботи з рекомбінантними ДНК та конференцію в Асіломарі, Каліфорнія (1975 р.), на якій було вирішено перервати мораторій та продовжити дослідження з дотриманням спеціально розроблених прави.

Основним принципом, що є основою системи біобезпеки багатьох країн стосовно генетично змінених організмів, є принцип перестороги (precautionary principle). Вперше такий підхід (пересторога та упередження можливих ризиків) був використаний в ЄС у 80-х роках при розробці законодавчої бази щодо традиційних продуктів харчування, у подальшому цей принцип знайшов своє відображення і в документах стосовно регулювання генно-інженерної діяльності. При цьому, правда, посилаються на Картахенський Протокол, як основний міжнародний документ, в якому такий принцип вперше був відображений. Зауважимо, що в англійському тексті Картахенського Протоколу, скрізь використовується термін precautionary approach, а не precautionary principle (Preamble, Article 1) [1]. Водночас, в офіційному російському тексті скрізь значиться "принцип прийняття мер предосторожності" (Преамбула, Стаття 1) [2]. Як би там не було, формулювання "принцип перестороги" стало основою для більшості міжнародних та національних регуляторних документів стосовно ГМО. Наявність в законодавстві ЄС положення про потребу постреєстраційного моніторингу ГМО та про їх відстежування (traceability) вже після вивільнення на ринок є фінальним етапом, який довершує функціонування цілісної і логічної системи біобезпеки країн-членів ЄС і обумовлює потребу в маркуванні ГМ продукції та в розробленні правил стосовно співіснування (co-existence) "традиційних" сортів та отриманих на їх основі нових "біотехнологічних" продуктів.

Світова спільнота вже придбала достатній досвід в питаннях, що стосуються аналізу ризиків, реєстрації, використання та регулювання ГМО, тому в Україні не варто придумувати самостійні "правила гри" в питаннях, що стосуються регуляторних актів стосовно сучасних біотехнологій та біобезпеки. Нещодавне, і, на жаль, досить поспішне прийняття Верховною Радою України Закону "Про державну систему біобезпеки при створенні, випробуванні, транспортуванні та використанні генетично модифікованих організмів" немов би і стало законодавчою основою для формування в Україні нормативно-правового поля стосовно біобезпеки ГМО у вигляді відповідних підзаконних актів, але, при цьому, внесло і певну плутанину в саме питання. На жаль, Закон не встановлює базовий принцип, яким держава Україна керується стосовно генно-інженерної діяльності. – Мова, йде про принцип перестороги, як основу регуляторних документів ЄС, та про принцип суттєвої еквівалентності, який лежить в основі системи біобезпеки США і деяких інших країн. Підхід, яким керується Директорат ЄС в питанні регуляторної політики стосовно ГМО, "одна подія (трансформації) – одне рішення", зовсім не прийнятний в Україні. Основним мотивом в ЄС для прийняття рішення стосовно реєстрації ГМО (або ж його відхилення) є експертне заключення EFSA (Європейського агентства з безпечності продуктів харчування) стосовно безпеки ГМО, що заявлений до реєстрації. В Україні ж питання реєстрації генетично-модифікованих організмів належать, згідно Закону, до компетенції різних міністерств, - Міністерства освіти і науки, Міністерства охорони навколишнього природного середовища, Міністерства охорони здоров'я і Міністерства агропромислової політики. При цьому запропонований алгоритм для прийняття рішень є надзвичайно складним, позаяк Закон не визначає схему взаємодії між різними органами центральної виконавчої влади на етапі реєстрації та випробування ГМО та не узгоджений з іншими Законами, що вже діють. Насамперед, мова йде про Закон України "Про охорону прав на сорти рослин" та Закон України "Про захист прав споживача" [4,5].

Згідно Закону України “Про охорону прав на сорти рослин”, всі сорти, що внесені до “Державного реєстру сортів рослин, придатних для поширення в Україні”, автоматично стають дозволені для подальшого використання. Таким чином, жодної законодавчої передумови для здійснення постреєстраційного моніторингу ГМО в Україні немає, так само як і не передбачено механізмів відслідковування ГМО, що будуть вивільнені на ринок після їх формальної реєстрації. Відсутність в Законі “Про охорону прав на сорти рослин” чіткого порядку контролю за ринковим обігом сортів дозволяє безкарно використовувати назву чужих сортів і створює додаткові передумови для несанкціонованого обігу незареєстрованих ГМ сортів. Водночас, Законом “Про захист прав споживача” передбачається потреба в маркуванні ГМ продукції, що вивільнена на ринок. При цьому жодним чином не аргументується і не встановлюється поріг вмісту ГМО для подальшого маркування і не визначається перелік продукції, для якої є обов'язковим її аналіз на вміст ГМ інгредієнтів, не зрозумілим є порядок таких аналізів, не розроблені і не затверджені відповідні методи. Т.ч., відсутність належного правового поля створює передумови для несанкціонованого використання ГМО та для непрозорого прийняття рішень щодо маркування самої різноманітної продукції на вміст ГМ інгредієнтів.

Два принципово різних питання – про безпечність ГМО і ГМ продукції та аналіз ризиків від її використання і про право споживача на інформацію (тобто, про маркування продукції, що містить ГМ інгредієнти) змішуються в “одну купу”. Таким чином, створюється штучний фон не для професійних дискусій та фахового аналізу стосовно перспектив впровадження різних біотехнологій в Україні, а для функціонування не дуже прозорої системи прийняття рішень щодо реєстрації, вивільнення та маркування ГМО. Створюючи ілюзію, що ми маємо своє бачення для вирішення питань, які світова спільнота вже для себе вирішила, за подібними дискусіями, на жаль, ми не бачимо більш нових і принципових питань стосовно оцінки і аналізу ймовірних ризиків та функціонування системи біобезпеки, що їх ставить сучасна біотехнологія. Насамперед, мова йде про аналіз ризиків від практичного використання та поширення деревовидних порід рослин, генетично модифікованих риб та ГМ рослин, що призначені для виробництва певних медичних препаратів (фармацевтичних рослин). При цьому з'явилися вже більш новітні проблеми для дискусій стосовно ймовірних ризиків від продукції сучасних біотехнологій завдяки можливості перенесення в геном цілих “блоків” генів у вигляді мініхромосом, модифікації власного геному організму без залучення чужинного генетичного матеріалу та вражаючому розвитку синтетичної біології (SynBio).

Держава Україна, повинна, з нашої точки зору, організувати і провести досить ґрунтовні дискусії та всебічний експертний аналіз стосовно того, чи потрібні ГМО в Україні, чи ні? Якщо так, то які саме і чому? Якщо ні, то чому? Що виграє Україна та її громадяни від використання (або заборони) ГМО? В таких дискусіях варто, насамперед, керуватися аргументами стосовно економічної доцільності від використання тих, чи інших, видів генетично модифікованих організмів, та стратегічним баченням місця агропромислового комплексу України на світовому аграрному ринку. Хто ми є – споживачі чужих технологій і сировинний придаток для розвинених країни, чи ми самостійний “гравець”, котрий сам визначає власні потреби і може також серйозно впливати на кон'юктуру світового ринку? Саме такі аргументи потрібно, з нашої точки зору, використовувати в дискусіях стосовно перспектив використання ГМО в Україні, а не користуватися в них непрофесійними і не вмотивованими “страшилками” на кштал “ГМО шкідливі, тому їх всі варто маркувати”. Аналіз чисельних оглядових документів, що підготовлені експертами різних міжнародних організацій (CBD, FAO, ICGEB, OECD, WHO) свідчить про те, що станом на сьогодні достовірно не встановлені будь-які негативні ефекти для довкілля та для здоров'я людини від використання вивільнених сьогодні на ринок ГМ

рослин та отриманих з них продуктів харчування і кормів для тварин. Тому в дискусіях стосовно біобезпеки ГМО варто керуватися новітніми питаннями і проблемами, що з'явилися сьогодні, на не повертатися до тем що вже є "вчорашнім днем".

Враховуючи те, що наша держава постійно декларує прагнення інтегруватися у світову економіку як рівноправний партнер, найкращий шлях для створення і функціонування ефективної і зрозумілої системи біобезпеки стосовно ГМО в Україні, - скористатися отриманим чужим досвідом і не придумувати свої "містечкові" правила. Це може бути можливим лише тоді, коли академічна наука більш активно буде виконувати свої просвітницькі функції у суспільстві, а ті, чи інші, рішення щодо ГМО будуть прийматися лише за результатами всебічної, ґрунтовної та публічної наукової експертизи.

Література

1. Cartagena Protocol on biosafety to the Convention on biological diversity. – Montreal: Secretariat of the CBD.- 2000.- 30 p.
2. Картахенский Протокол по биобезопасности к Конвенции о биологическом разнообразии.- Montreal: Secretariat of the CBD.- 2000.- 30 p.
3. Закон України "Про державну систему біобезпеки при створенні, випробуванні, транспортуванні та використанні генетично модифікованих організмів", № 1103-V від 31.05.2007 р.
4. Закон України "Про охорону прав на сорти рослин", № 3116-XII, редакція від 29.11.2006 р.
5. Закон України "Про захист прав споживачів", №1023-12, редакція від 13.01.2006 р.

Резюме

Обговорюються основні принципи регулювання генно-інженерної діяльності та системи біобезпеки, що діють в різних країнах та питання, що є актуальними для України

Обсуждаются основные принципы регулирования генно-инженерной деятельности и системы биобезопасности, которые действуют в разных странах и вопросы, представляющие актуальность для Украины.

Basic principles for the regulation of the genetic engineering and biosafety systems in some countries are discussed. Most important questions for the Ukraine have been announced.

СТРУНИН Д.Е.¹, АБРАИМОВА О.Б.², ПЭРИ Л.³, ХРИСТАН О.О.¹, ТИЩЕНКО Е.Н.¹

¹*Институт физиологии растений и генетики НАН Украины, 03022, Киев, ул. Васильковская 31/1, e-mail: oltyko@gmail.com*

²*Институт зернового хозяйства ААН Украины, Днепропетровск, 49600 ул Дзержинского, 13*

³*Institute of Experimental Botany Academy of Sciences, Czech Republic, Rozvojova 135, Prague, 6 CZ-16502*

СКРИНИНГ НА КОМПЕТЕНТНОСТЬ К АГРОБАКТЕРИАЛЬНОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ КАЛЛУСНЫХ КУЛЬТУР, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ НЕЗРЕЛЫХ ЗАРОДЫШЕЙ ИНБРЕДНЫХ ЛИНИЙ КУКУРУЗЫ (*Zea mays* L.).

Agrobacterium-опосредованная трансформация кукурузы (*Zea mays* L.) рассматривается как перспективное направление исследований [1-4], в связи с рядом

преимуществ, которые имеет этот способ по сравнению с биолистическим методом: интеграция единичных копий Т-ДНК в транскрипционно-активные области ядерного генома, стабильная экспрессия трансгенов в ряду поколений, низкая стоимость работ. Так по сравнению с биолистическим методом при *Agrobacterium*-опосредованной трансформации в геном кукурузы может включаться меньшее количество трансгенов, стабильно и с большим уровнем экспрессирующихся в R1 и R2 поколениях [5].

Для кукурузы предложен ряд методов *Agrobacterium*-опосредованной трансформации [1-4]. Эти исследования показали перспективность использования в качестве эксплантатов незрелых зародышей, каллусных тканей и апикальных меристем побега. Несмотря на широкое применение метода *Agrobacterium*-опосредованной трансформации для генетической модификации различных видов растений, каждая из его стадий требует оптимизации с целью повышения эффективности переноса, интеграции Т-ДНК и регенерации трансформантов для каждого конкретного генотипа.

Целью данной работы был первичный скрининг на компетентность к агробактериальной инфекции эмбрионного каллуса, индуцированного из незрелых зародышей растений инбредных линий Чи-31, Дк-443, Дк-675, Плс-61.

Материалы и методы

Эмбрионный каллус индуцировали из незрелых зародышей, выделенных на 12-14 день после опыления растений инбредных линий кукурузы Чи-31, Дк-443, Дк-675, Плс-61 (селекции Института зернового хозяйства УААН, г. Днепропетровск), используя модифицированную среду N6 [6]содержащую 1,3 мг/л 2,4-Д и 2,2 мг/л пиклорама (Ск) [7].

Для *Agrobacterium*-опосредованной трансформации использовали штамм LVA 4404, несущий плазмиду pBI121 с генами неомизинфосфотрансферазы (*ntpII*) и β-глюкуронидазы (*uidA*), любезно предоставленный Институтом экспериментальной ботаники, АН Чешской Республики. Ночную культуру *A. tumefaciens* получали культивированием на среде YEP с добавлением 100 мг/л канамицин сульфата (*Km*), и 150 мг/л рифампицина при температуре 27°C. За час до трансформации в агробактериальную суспензию вводили ацетосирингон (As), 200 μM. После инокуляции с *A. tumefaciens* каллусные культуры переносили на среду кокультивирования (Ск+200 μM As) и культивировали в течение 2-3 дней. Селекцию на устойчивость к *Km* осуществляли, на селективной среде (Ск+ 100 мг/л *Km* + 150 мг/л цефотаксима). Пассирование каждые 10 дней, культивирование в течение месяца, в темноте при 27°C. На следующем этапе каллусы устойчивые к летальной дозе *Km* переносили на регенерационную среду (селективная среда без 2,4-Д и пиклорама), культивировали на свету, с 16-часовым фотопериодом при 27°C, пассирование каждые 14 дней.

Для ПЦР-анализа гена случайным образом было отобрано по пять каллусов каждого генотипа. После 30 дней культивирования на селективной среде. ДНК изолировали с использованием препарата Plant DNAzol (Invitrogen Corporation, США). Применяли следующие праймеры к *ntpII* гену: *ntpIIF* (5'- TGA ATG AAC TGC AGG ACG AG-3') и *ntpIIR* (5'- AGT GAC AAC GTC GAG CAC AG-3'), (Invitrogen Corporation, США), реакцию амплификации проводили согласно рекомендациям фирмы изготовителя. Продукты амплификации анализировали в 2% агарозном геле при 3-4 В/см в течение 1-2 часов.

Результаты и обсуждение

При разработке системы методов *Agrobacterium*-опосредованной трансформации растений критическим этапом является перенос Т-ДНК в клетки и её интеграция в ядерный геном. Перед скринингом приведенных выше линий кукурузы на чувствительность к агробактериальной инфекции проводили их тестирование на способность к образованию эмбрионных каллусных культур. Показано, что частота индукции эмбрионного каллуса варьировала от 27,4 % (Дк-675) до 98,3 % (Дк-443). Различия по частоте каллусообразования были достоверными для всех этих линий.

Agrobacterium-опосредованную трансформацию с использованием каллусных культур, полученных из эксплантатов тестируемых инбредных линий, проводили в соответствии с рекомендациями [4] с внесением незначительных модификаций. Каллусные культуры, которые на селективной среде с летальной дозой антибиотика продолжали рост и дифференциацию, рассматривались нами как *Km*-устойчивые. В результате агробактериальной трансформации были получены *Km*-устойчивые каллусы генотипов Чи-31, Дк-443, Дк-675 и Плс-61, частота образования которых составила 80,9 %, 54,6 %, 37,8 % и 78,4 %, соответственно (табл. 1). Она достоверно не отличалась только между линиями Чи-31 и Плс-61. В целом, полученные данные свидетельствуют о различной ответной реакции каллусных культур, Чи-31, Дк-443, Дк-675, Плс-61, Л-250, Л-370, Л-390, Л-391 на агробактериальную инфекцию.

Таблица 1.

Селекция на устойчивость к канамицин сульфату эмбрионного каллуса, индуцированного из незрелых зародышей кукурузы

Инбредная линия	Количество эмбрионных каллусов	Количество <i>Km</i> -устойчивых каллусов	Частота <i>Km</i> УК
Чи-31	225	182	80,9 ± 2,6*
Дк-443,	262	143	54,6 ± 3,1*
Дк-675	111	42	37,8 ± 4,6*
Плс-61	125	98	78,4 ± 3,7

* - достоверно при уровне значимости 0,05

Вместе с тем устойчивость каллусных тканей при культивировании на селективных средах с токсичными концентрациями канамицин-сульфата не исключает адаптации растительных клеток к этому стрессору. Для проведения ПЦР-анализа, по гену *ntpII* случайным образом были отобраны *Km*УК. Данные молекулярно-генетического анализа свидетельствуют в пользу переноса Т-ДНК в клетки и, возможно, её интеграции в ядерный геном инбредных линий Чи-31, Дк-675, Плс-61. Несмотря на то, что для инбредной линии Дк-443 наблюдалось образование *Km*-устойчивых каллусов, ПЦР-анализ не подтвердил наличие гена *ntpII* при произвольной выборке *Km*УК.

В ходе дальнейшего культивирования *Km*УК на регенерационных средах, содержащих селективную концентрацию канамицин-сульфата, у них наблюдали отсутствие или резкое падение морфогенетического потенциала. Индукция побегообразования с низкой частотой (8%) наблюдалась только для генотипа Чи-31. Учитывая литературные данные [4, 8], изменения в регенерационной способности полученных нами *Km*УК могут быть обусловлены влиянием канамицин сульфата на этот процесс и/или программируемой гибелью клеток, индуцированной взаимодействием культивируемых тканей кукурузы с *Agrobacterium tumefaciens*.

Обращает на себя внимание тот факт, что некоторые *Km*УК инбредной линии Плс-61, ДНК которых по результатам ПЦР-анализа может содержать ген *ntpII*, в ходе дальнейшего культивирования теряли *Km*-устойчивость. Возможно, это является следствием эпигенетических изменений в экспрессии гена неомидинфосфотрансферазы, связанного с его сайленсингом на транскрипционном и/или посттранскрипционном уровнях. Не исключена возможность недостаточно эффективной селекции трансформированных тканей канамицин сульфатом, что выражается в неодинаковой чувствительности тканей различных генотипов к антибиотику.

Таким образом, установлена различная способность *Agrobacterium tumefaciens* к переносу Т-ДНК. в клетки эмбрионных каллусных культур, индуцированных из незрелых зародышей инбредных линий кукурузы (Чи-31, ДК-443, Дк-675, Плс-61).

Показано, что летальная доза антибиотика канамицин сульфата негативно влияет на процесс индукции регенерации из эмбрионного каллусов этих генотипов. Работа выполнена при поддержке International Visegrad Fund (Kralovske udolie 8, 811 02 Bratislava, Slovakia).

Литература

1. *Ishida Y., Satto h., Hiei Y., Komari T., Kumashiro T.* High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens* // Nat. Biotech. – 1996. – 14. – 745-750.
2. *Sairam R.V., Parani M., Franklin G., et all.* Shoot meristem: an ideal explant for *Zea mays* L. transformation // Genome. – 2003. – 46. – P. 323-329.
3. *Sidorov V., Gillertson L., Addae P., Duncan D.* *Agrobacterium* – mediated transformation of seedling-derived mays callus // Plant Cell Rep. – 2006. -25. P.320-328.
4. *Данилова С.А., Долгих Ю.И.* Условия, необходимые для эффективной агробактериальной трансформации *Agrobacterium tumefaciens* эмбрионного каллуса кукурузы // Физиология растений. – 2005. – т.25, №4. – С.600-608.
5. *Shou H., Frame B/R., Whitham S.A., Wang K.* Assessment of transgenic maize events produced by particle bombardment or *Agrobacterium* – mediated transformation // Molecular Breeding. – 2004. – 13. – P.201-208.
6. *Chu C.C.* The N6 medium and its application to anther culture of cereal crops // Plant Sci. - 1990. – 66. – P. 225-262.
7. *Пиралов Г.Р., Абраимова О.Е.* Межсезонные различия в динамике развития зародышей кукурузы, их каллюсогенеза и регенерации // Сучасні технології селекційного процесу сільськогосподарських культур. Збірник тез наукового міжнародного симпозіуму 7-9 липня 2004 р. Харків. – 2004. – С.163-164.
8. *Hansen G.* Evidence for *Agrobacterium*-induced apoptosis in maize cells // MPM. - 2000. – 13, N6. – P.645-657.

Резюме

Анализировали компетентность к агробактериальной трансформации эмбрионного каллуса, индуцированного из незрелых зародышей инбредных линий Чи-31, Дк-443, Дк-675, Плс-61. Методом ПЦР показано наличие гена *ntpII* в ДНК каллусных тканей, Чи-31, Дк-675, Плс-61 устойчивых к летальной дозе канамицин-сульфата линий. Km оказывает негативное влияние на процесс индукции регенерации из каллусных культур этих генотипов.

Аналізували компетентність до агробактеріальної трансформації ембріонного калюсу, якій отримано із незрілих зародків інбредних ліній Чи-31, Дк-443, Дк-675, Плс-61. Методом ПЛР показано наявність гену *ntpII* в ДНК каллюсних. тканин Чи-31, Дк-675, Плс-61, стійких до летальної дози канамицин сульфату. Km негативно впливає на процес індукції регенерації з калюсних культур цих генотипів.

The competence to agrobacterial transformation of embryogenic callus induced from immature embryos of inbred lines plant of Chi-31, Dk-443, Dk-675, Pls-61 were studied. Presence of *ntpII* gene in callus tissue DNA of Chi-31, Dk-675, Pls-6 resistant to lethal dose of kanamycin by PCR have been shown. Negative affect of Km on morphogenic potential took place.

СУПРУН С.М.¹, ДОНЧЕНКО Г.В.¹, КУЧМЕРОВСКАЯ Т.М.¹, ПАРХОМЕНКО Ю.М.¹, ИСАЕВА Н.М.²

¹Институт биохимии им. А. В. Палладина НАН Украины, Украина, 01601, Киев, ул. Леонтовича, 9, e-mail: kuch@biochem.kiev.ua

²Институт зоологии им. И.И.Шмальгаузена НАН Украины, Украина, 01601, Киев, ул. Б. Хмельницкого, 15, e-mail: morleone2000@hotmail.com

БИОТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ГРИБНОГО ПРЕПАРАТА

Микромицеты являются перспективными для использования в различных отраслях народного хозяйства – защите окружающей среды, сельском хозяйстве, медицине. В настоящее время известно более 100 биотехнологий с применением различных таксономических групп грибов для получения ферментов, витаминов, антибиотиков полисахаридов и лекарственных средств [1,2]. Грибы - ценный источник природных форм биологически активных веществ, а именно незаменимых аминокислот, ненасыщенных жирных кислот, витаминов, таких витаминоподобных веществ, как убихинон Q₁₀ и других, обладающих свойствами антиоксидантов и антимуtagens. Известно, что грибной белок по аминокислотному составу не уступает животному, что является основанием их использования для получения пищевых и кормовых добавок. На биологическую ценность биомассы грибов влияет состав клеточной стенки, которая, содержит хитин и его производные, которые могут выполнять функции природных сорбентов. Грибы нетребовательны к субстрату для культивирования, устойчивы к изменениям природных условий, технологичны. Цель исследований: разработка биотехнологии получения пищевой и кормовой добавки на основе селекционированных штаммов продуцентов витаминов, коферментов и белка.

Материалы и методы

Использовали метод поэтапной селекции для отбора штаммов белково - витаминных продуцентов среди различных таксономических групп микромицетов. Для получения витаминно-коферментного препарата путем совместного культивирования подобраны следующие штаммы грибов: *Fusarium sambucinum* F-10011 - продуцент витамина PP (никотиновой кислоты) и его производных, а также штамм *Fusarium sambucinum* F-139 - продуцент CoA и белка. Штаммы депонированы и хранятся в коллекции культур Института микробиологии и вирусологии НАН Украины. Микромицеты выращивали на синтетической питательной среде Чапека с мелассой (1% по р.в.) в качестве источника углерода. Посевной материал (инокулят) выращивали в колбах Эрленмейера на качалках при 240 об./мин. в течение 24 часов. Ферментацию проводили при глубинном культивировании в колбах или в производственных условиях на лабораторной стендовой установке Научно-технического центра производственной биотехнологии ОАО "Стиролбиотех". Среду для ферментации стерилизовали в автоклаве при 1–1,5 атм. в течение 30 мин и засеивали 5%-ным инокулятом. Продолжительность культивирования в лабораторных условиях составляла 62 часа, а в производственных — 42–48 часов. Получено две формы препарата – порошкообразную и жидкую (гранулированную при внесении наполнителя.). Жидкую форму препарата получали по разработанной нами технологии с использованием термической обработки. Содержание биологически активных веществ в грибах и в препарате определяли с использованием методов, приведенных в справочнике по микологии [6]:

- убихинон Q₁₀ — спектрофотометрически с предварительным хроматографическим разделением компонентов неомыляемых веществ [7];

-содержание хитина в биомассе по разнице количества N-ацетилглюкозамина после гидролиза соляной кислотой и производили перерасчет количества глюкозамина на хитин с использованием коэффициента 1.17.

Витаминно-коферментный препарат был протестирован на животных: дубовом шелкопряде, рыбах, перепелах и белых мышах. В первом опыте использовали гусениц дубового шелкопряда *Antheraea pernyi* G.-M., которые обрабатывали препаратом в разведении (1:20). Корм контрольных гусениц в соответствующие периоды обрабатывали водой.

Во втором опыте для обработки икры карпа *Ciprinus carpio* L. (0,5 кг), полученной от одной самки, использовали грибной препарат, разведенный водой (1:1), который вносили в объеме, равном объему икры, за 1 мин до окончания оплодотворения сухим способом. В контроле в процессе инкубации применялась профилактическая антисапролегниозная обработка фиолетовым "К" (в опыте обработка химическими препаратами не проводилась). В третьем опыте использовали две группы перепелов - контрольную и опытную по 90 голов каждая (45 самцов и 45 самок). В комбикорм опытной группы вводили препарат, который позволил повысить уровень сырого протеина в комбикорме на 1,5%. Длительность опыта 28 дней, препарат вводили начиная с 14 дня.

В четвертом опыте биотестирование препарата проводили в двух сериях опытов на трех группах мышей по 7 особей в каждой. Длительность экспериментов составляла 21 сутки. Животные, содержащиеся на стационарном рационе вивария, получали биопрепарат из расчета 0,36 г/особь для 1-й подопытной группы и 1,8 г/особь для 2-й группы. Контролем служили мыши, которые содержались на стандартном рационе вивария. Для оценки влияния биопрепарата использовали такие критерии: поведенческие реакции животных, потребление корма и воды, выживаемость, показатели периферической крови (количество лейкоцитов, эритроцитов, лейкоцитарная формула, свертываемость крови) и биохимические тесты: уровень белка в сыворотке крови и отдельных ее фракциях, активность сывороточной холинэстеразы, содержание аммиака в ткани мозга, а также морфоструктура внутренних органов. Определение выше указанных показателей проводили общепринятыми методами.

Результаты и обсуждение

Нами селекционированы штаммы белково-витаминные продуценты: *Mycelia sterilia* ИМВ, *Fusarium sambucinum* F-139, *Fusarium sambucinum* ИМВ F-10011, *Penicillium sclerotiorum* F-10015. Основываясь на изучении их физиолого-биохимических особенностей, биосинтеза отдельных витаминов, скорости роста, отсутствие антогонизма, были отобраны культуры для совместного культивирования с целью получения кормовой и пищевой добавки. Для получения витаминно-коферментного препарата подобраны культуры *Fusarium sambucinum* ИМВ F-10011-продуцента никотиновой кислоты и ее производных, незаменимых аминокислот (лизина и триптофана) и *Fusarium sambucinum* F-139 - продуцента кофермента CoA и белка. Нами отработаны условия их совместного культивирования и согласно регламенту на стенодовой установке Научно-технического центра производственной биотехнологии ОАО «Стиролбиотех» были наработаны партии препарата. В результате совместного культивирования в 2-3 раза повышается содержание исследуемых витаминов, увеличивается количество белка в препарате, сокращаются сроки ферментации до 46 часов. Витаминно-коферментный препарат 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.), тиамина, витаминов E, витамина B₁₂.

Полученный препарат испытан в опытах на шелкопрядах, икре карпа, перепелах и лабораторных мышах. Использование препарата способствовало значительному

повышению жизнеспособности гусениц: на 14,8 %, массы кокона и шелковой оболочки до 11,2 % и 12,8 %, соответственно. Полученный препарат позволяет защищать полезных насекомых от инвазийных (микроспориоз дубового шелкопряда) и экзогенных инфекций (ядерного полиэдроза). При применении препарата снизилось заболевание ядерным полиэдрозом на 9–12 %.

При обработке икры карпа биопрепаратом выход личинок из подопытной икры в условиях тепловодного хозяйства Киевской ТЭЦ–5 составил около 100 %, тогда как выход в контроле не превышал 74 %. Таким образом, можно сделать вывод, что данный биопрепарат повышает, во-первых, процент выхода личинок из икры, снижает пораженность их сапролегниозом и, во-вторых, увеличивает стойкость личинок, вышедших из обработанной биопрепаратом икры, по отношению к неблагоприятным факторам внешней среды. В опыте с перепелами отмечено повышение массы молодняка начиная с 21 дня, к 28 суткам живой вес в опыте составлял $124,5 \pm 1,1$, а в контроле $116,6 \pm 1,5$ г %.

В эксперименте с мышами установлено, что при введении в корм биопрепарата общее состояние мышей было удовлетворительным, корм они поедали полностью, водопотребление обычное. Выживаемость животных в подопытных группах составила 100 %, т.е. была выше, чем в контроле. Темпы прироста массы тела не имели межгрупповых различий. Результаты исследований периферической крови свидетельствуют о том, что уровень гемоглобина, количество эритроцитов и лейкоцитов у подопытных мышей находилось в пределах физиологических норм. При исследовании лейкоцитарной формулы установлено преобладание лимфоцитов и сегментоядерных форм. Зафиксированное снижение палочкоядерных форм лейкоцитов можно расценивать как положительный фактор. Что касается свертывающей способности крови, то она сохранялась без изменений.

Включение в экспериментальные рационы мышей биопрепарата приводило к некоторому снижению уровня альбуминов у подопытных животных по сравнению с контрольными величинами и повышению γ -глобулиновой фракции сывороточных белков.

О благоприятном влиянии исследуемого витаминно-белкового препарата на организм мышей свидетельствуют и показатели активности сывороточной холинэстеразы. Также отмечено снижение в 2,85 раза количества аммиака в ткани мозга мышей, получавших препарат из расчета 1,8 г/особь и идентичность уровней данного метаболита азотистого обмена с контролем в ткани мозга мышей в другом варианте опыта.

Выводы

Полученные результаты свидетельствуют о том, что биологическая ценность грибного препарата состоит в том, что он содержит природный комплекс биологически активных веществ, а также значительное содержание витаминов. Высокое содержание витаминов, в частности, никотиновой кислоты и ее производных в препарате, соединений с чрезвычайно широким спектром действия, способствует улучшению обменных процессов в организме и повышению иммунитета, что свидетельствует о возможности использования его, как основы для получения лекарственных средств.

Применение биопрепарата не только повышает выживаемость животных, физиологические и производственные показатели шелкопряда и рыб, но также защищает их от инвазионных (микроспориоз дубового шелкопряда) и инфекционных заболеваний, как например, дубового шелкопряда - от полиэдроза, икру карпа - от сапролегниоза. Результаты испытания грибного препарата позволило обнаружить его благоприятное влияние на рост и развитие теплокровных животных, гематологические и биохимические их показатели, что позволяет прогнозировать

эффективность дальнейшего использования биопрепарата в сельском хозяйстве, а также для получения на его основе лекарственных средств.

Литература

1. *Wainwright M.* Novel use for fungi in biotechnology // *Chem.* 1990. № . P. 131–134.
2. *Hobbs Ch.* Medicinal mushrooms an exploration of tradition healing and culture. – Botanica press. Santa Cruz , С.А. 1995. 251 p.
3. *Беккер З. Е.* Физиология и биохимия грибов. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1988. 260 с.
4. *Феофилова Е. П., Немцев Д. В., Терешина В. М., Козлов В. П.* Полиаминосахариды мицелиальных грибов: новые биотехнологии и перспективы практического использования // *Прикладная биохимия и микробиология.* — 1996. — 32, № 5. - С. 483–492.
6. *Билай В.И.* Методы экспериментальной микологии.-К.Наукова думка,1982 С.261-268.
7. *Донченко Г.В.* Биохимия убихинона Q. К.:Наук.думка, 1988.- 297 с.

Резюме

Разработана биотехнология получения биопрепарата при совместном культивировании штаммов микромицетов *Fusarium sambucinum* F-139 и *Fusarium sambucinum* F-10011, что позволило сократить сроки ферментации и повысить выход биологически активных веществ. Испытания грибного препарата с высоким содержанием витаминов, коферментов и других биологически активных веществ свидетельствуют о возможном применении его в качестве кормовой и пищевой добавки.

Розроблена біотехнологія отримання біопрепарату при сумісному культивуванні штамів мікроміцетів *Fusarium sambucinum* F-139 і *Fusarium sambucinum* F-10011, що дозволило скоротити терміни ферментації та підвищити вихід біологічно активних речовин. Випробування грибного препарату з високим вмістом вітамінів, коферментів та інших біологічно активних речовин свідчить про можливе застосування його в якості кормової та харчової добавки.

The biotechnology of obtaining of fungial preparation based on joint cultivations of micromycetes strains of *Fusarium sambucinum* and *Fusarium sambucinum* was developed. Joint cultivation of strains has allowed to reduce the terms of fermentation and augment the output of various biologically active substances. The preparation has high content of vitamins and other biologically active substances that suggest the possibility of its using as food and chow additives.

ФУРСОВА О.В., ОГАРКОВА О.А., ТАРАСОВ В.А.

Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН РФ,

Россия, 119991, Москва, ул. Губкина, 3, e-mail: oksfursova@yandex.ru

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ФУНКЦИИ ДВУХ ГЕНОВ *ARABIDOPSIS THALIANA*, КАК НОВЫХ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ РЕГУЛЯТОРОВ ОТВЕТА НА ХОЛОДОВОЙ СТРЕСС У РАСТЕНИЙ.

Ранее методом агробактериальной трансформации прорастающих семян (Томилов и др., 1999) с использованием вектора pLD3 (Гапеева и др., 1995) был получен и описан инсерционный мутант *Arabidopsis thaliana*, характеризующийся нарушением морфогенеза семядолей на ранних стадиях развития растений (Томилова и др., 2001). Анализ ДНК с использованием ПЦР, блот-гибридизации и компьютерного анализа позволил определить, что геном мутанта несет одну инсерцию, сцепленную с

мутантным фенотипом и расположенную в первом экзоне гена *At1g12860*. Этот ген находится в левом плече первой хромосомы и состоит из пяти экзонов.

Известно, что F-бокс связан с протеканием процесса убиквитин-зависимой деградации белков. Оказалось, что, наряду с F-боксом в первом экзоне, этот ген во втором экзоне содержит MYC – подобный транскрипционный фактор типа «спираль-петля-спираль». Одновременное присутствие в пределах одного гена доменов, участвующих в регуляции процессов катаболизма и анаболизма, заставило нас предположить, что рассматриваемый ген потенциально является одним из ключевых регуляторов метаболизма растительной клетки (Фурсова и др., 2004). Компьютерный анализ показал, что ген *At1g12860* содержит два промотора, расположенных перед первым экзоном и между первым и вторым экзонами. Более того, каждая из отдельных частей этого гена (1-ый экзон и 2-5-ый экзоны) по доменному составу в геноме *A. thaliana* имеет гомологи, выступающие в качестве самостоятельных генов. При этом ген *At3g26744*, известный также под названием *ICE1*, содержит в своей структуре домен транскрипционного активатора, полностью идентичный по нуклеотидному составу, соответствующему домену рассматриваемого нами гена *At1g12860*, и является ключевым регулятором ответа на холодостресс у *A. thaliana* (Chinnusamy et al., 2003). Свою функцию ген *ICE1* осуществляет не непосредственно путем влияния на эффекторные гены, названные *COR* – генами (Thomashow, 1999), которые непосредственно участвуют в детерминации особенностей метаболизма клеток в условиях холодостресса, а путем активации транскрипции вторичных транскрипционных активаторов, в частности гена *CBF3*.

Следует подчеркнуть, что изучение генетического контроля ответа растительной клетки на абиотические стрессы, в частности, на холодостресс, интенсивно проводится лишь в последние несколько лет и многие вопросы, связанные с идентификацией генов, детерминирующих этот процесс, их регуляция, еще далеки от своего решения. В этой связи данная работа посвящена идентификации нового гена, являющегося транскрипционным активатором, экспрессия которого зависит от активности исследуемого нами гена *At1g12860*.

Материалы и методы

Объектом исследования являлись растения *Arabidopsis thaliana* (ecotype Columbia). В работе использовались традиционные методы анализа. Амплифицированные копии исследуемого гена (и его частей) под конститутивным промотором в геном трансгенных растений вводились путем агробактериальной трансформации с использованием вектора pMLBart. Анализ экспрессии гена *At5g61270* проводился путем амплификации по стандартному протоколу фирмы «Изоген».

Результаты и обсуждение

Для исследования функции двух биологически значимых доменов (транскрипционного активатора и F-бокса) гена *At1g12860* были получены три трансгенные линии *A. thaliana*. Структура Т-ДНК, интегрированной в геном этих линий, содержит полноразмерную копию гена *At1g12860*, а также копии его 1-го экзона и 2-5-го экзонов, находящихся под сильным конститутивным промотором. При исследовании функциональной организации этого гена, проводимой на линии, содержащей полноразмерную копию гена, был обнаружен неожиданный факт – в этой линии в отличие от растений дикого типа, наблюдается суперэкспрессия гена *At5g61270*. Этот факт был подтвержден в специальных экспериментах (рис. 1).

Видно, что суперэкспрессия полной копии гена *At1g12860* (*superICE2*) либо его части, содержащей домен транскрипционного активатора (*superHALF2-ICE2*), приводит к экспрессии гена *At5g61270*. Компьютерный анализ этого гена показал, что его структура также содержит домен транскрипционного активатора типа «спираль-петля-спираль».

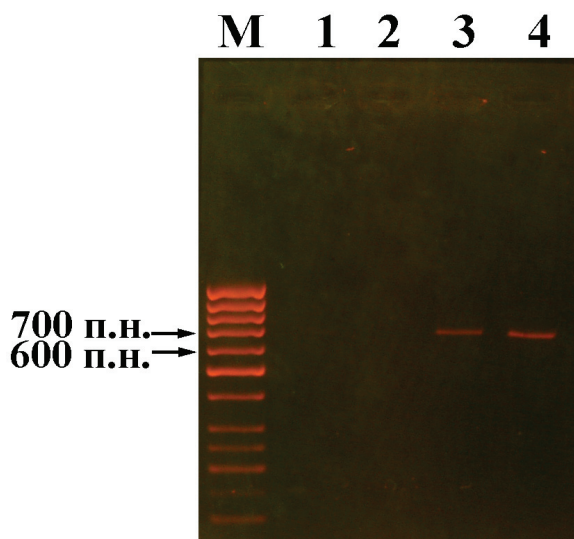


Рисунок 1. Анализ экспрессии гена *At5g61270*.

М - маркеры размера ДНК;

1), 2) растения дикого типа расы Columbia;

3) трансгенные линии с суперэкспрессией части гена *At1g12860*(*superHALF2-ICE2*), содержащей 2-5 экзоны;

4) трансгенные линии с суперэкспрессией полноразмерной копии гена *At1g12860* (*superICE2*) .

Выводы

Таким образом, полученные данные позволяют предполагать, что ген *At1g12860*, наряду с контролем морфогенеза, участвует в детерминации ответа клеток *A. thaliana* на холодовой стресс. При этом, так же как ген *ICE1*, исследуемый нами ген включен в каскад регуляторных событий, когда под его контролем находится вторичный активатор транскрипционной активности- ген *At5g61270*. Функция этого гена до последнего времени оставалась неизвестной.

Литература

1. Томилов А.А., Томилова Н.Б., Огаркова О.А., Тарасов В.А. Инсерционный мутагенез *Arabidopsis thaliana*: Увеличение эффективности трансформации прорастающих семян в результате предобработки их ультразвуком // Генетика. 1999. Т. 35. № 9. С. 1214-1222.
2. Ганеева Т.А., Огаркова О.А., Тарасов В.А., Вологовский И.Д. Новые вектора для трансформации двудольных растений // Генетика. 1995. Т. 31. № 8. С. 1085-1091.
3. Томилова Н.Б., Томилов А.А., Огаркова О.А., Тарасов В.А. Идентификация гена, мутация в котором обуславливает возникновение некрозов семядолей при развитии проростков *Arabidopsis thaliana* // Генетика. 2001. Т. 37. №1. С. 36-45.
4. Фурсова О.В., Погорелко Г.В., Авсюк А.Ю., Томилова Н.Б., Томилов А.А., Тарасов В.А., Огаркова О.А. Идентификация потенциального гена – регулятора развития семядолей у проростков *Arabidopsis thaliana*. Докл. Акад. Наук. 2004. Т. 395. №. 5. С. 1-3.
5. Chinnusamy V, Ohta M, Kanrar S, Lee BH, Hong X, Agarwal M, Zhu JK. ICE1: a regulator of cold-induced transcriptome and freezing tolerance in *Arabidopsis* // *Genes Dev.* 2003. V. 17. No. 8. P. 1043-54.
6. Thomashow MF. Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1999,50:571-599

ШЕМЕТУН О.В., ТАЛАН О.О.

Науковий Центр радіаційної медицини АМН України

Україна, 040050, Київ, вул. Мельникова, 53, e-mail: lshem@ukr.net

МОДЕЛЮВАННЯ РАДІАЦІЙНО ІНДУКОВАНОГО ЕФЕКТУ СВІДКА В УМОВАХ IN VITRO

Різномічне вивчення ефекту свідка є одним з пріоритетних напрямків сучасної медичної генетики. Актуальність його дослідження зумовлюється необхідністю

розкриття механізмів розвитку радіаційно індукованої патології (і, зокрема, онкологічної), яка може бути спричинена не лише прямим радіаційним ушкодженням клітин-мішеней, а й вторинними біологічними змінами в оточуючих неопромінених клітинах.

Найбільш важливі результати з вивчення закономірностей і механізмів розвитку ефекту свідка отримані при використанні експериментального моделювання цього феномену в умовах *in vitro*. Принциповими вимогами при створенні таких моделей є необхідність опромінення лише частини клітин і можливість розрізнення популяцій опромінених та неопромінених клітин при проведенні досліджень. Тому моделювання радіаційно індукованого ефекту свідка в умовах *in vitro* здійснюється, головним чином, з застосуванням альфа-опромінення. Такі моделі дозволяють реєструвати треки від проходження альфа-частинок, що перетинають клітини, безпосередньо пошкоджуючи їх. Варто зауважити, що вперше радіаційно-індукований ефект свідка був описаний Н. Nagasawa і J. Little (1992 р.) саме з застосуванням альфа-опромінення [1].

Використання при дослідженні радіаційно-індукованого ефекту-свідка рентгенівського та гамма випромінювань здійснюється, головним чином, на змішаних міжвидових культурах клітин ссавців, що дає можливість розрізняти опромінені й неопромінені популяції клітин. З застосуванням таких моделей досліджують апоптоз, диференціацію, проліферацію, трансформацію в клітинах-свідках [2, 3].

Вивчення ефекту свідка в клітинах людини вимагає застосування нових методичних підходів. Нами розроблено модель для виявлення ефекту свідка на цитогенетичному рівні з використанням змішаної культури лімфоцитів периферичної крові людини. Така модель складається з популяції опромінених рентгенівськими чи гамма променями в умовах *in vitro* або *in vivo* лімфоцитів та популяції неопромінених лімфоцитів осіб іншої статі, що використовуються як свідок [4, 5]. Головними цитогенетичними маркерами для розрізнення опромінених і неопромінених лімфоцитів при сумісному культивуванні *in vitro* в такій моделі є чоловічі (Y) та жіночі (XX) статеві хромосоми. Вказана модель апробована нами при оцінці цитогенетичного ефекту в неопромінених лімфоцитах людини при культивуванні в змішаних культурах з лімфоцитами, опроміненими рентгенівськими променями в умовах *in vitro* в дозах 0,25 та 1 Гр [6].

Метою представленої роботи було встановлення можливості індукції ефекту свідка в неопромінених лімфоцитах крові людини при їх сумісному культивуванні в змішаних культурах з опроміненими *in vivo* лімфоцитами.

Матеріали і методи

Матеріалом дослідження були лімфоцити периферичної крові, отримані від 6-ти донорів (3-х чоловічої і 3-х жіночої статі), які заперечували свідомий контакт з іонізуючою радіацією і склали групу контролю та 7-ми ліквідаторів наслідків ліквідації аварії на ЧАЕС, які зазнали опромінення в дозах 1,01-2,37 Гр.

Кров культивували за загальноприйнятим напівмікрометодом D.A. Hungerford. При постановці змішаних культур дотримувалися цього ж методу, але до культуральної суміші в пробірку додавали по 0,3 мл крові від двох осіб різної статі, що розрізнялись за статтю (в контролі) та наявністю опромінення *in vivo* (при моделюванні радіаційно індукованого ефекту свідка).

Цитогенетичний аналіз виконували з застосуванням диференційного G-забарвлення метафазних хромосом з використанням барвника Гімза та трипсину за методом M.Seabright. Це дозволило точно ідентифікувати статеві хромосоми та морфологічні варіанти соматичних хромосом.

Отримані дані опрацьовували з використанням методу порівняння середніх величин за Ст'юдентом-Фішером.

Результати та обговорення

В результаті проведених досліджень встановлено, що частота абераційних клітин та рівень аберацій хромосом ($2,56 \pm 0,53$ на 100 метафаз) в змішаних культурах неопромінених лімфоцитів донорів знаходились на популяційному рівні.

Цитогенетичне обстеження осіб, які зазнали опромінення внаслідок ліквідації аварії на ЧАЕС, показало, що рівні аберацій хромосом в їх лімфоцитах перевищували показники неопроміненого контролю ($p < 0,05$) і статистично не розрізнялись при окремому культивуванні ($5,63 \pm 0,98$ на 100 метафаз) та в змішаних культурах з неопроміненими лімфоцитами осіб іншої статі ($5,21 \pm 0,89$ на 100 метафаз) ($p > 0,05$). Спектр аберацій хромосом не залежав від способу культивування (рис. 1).

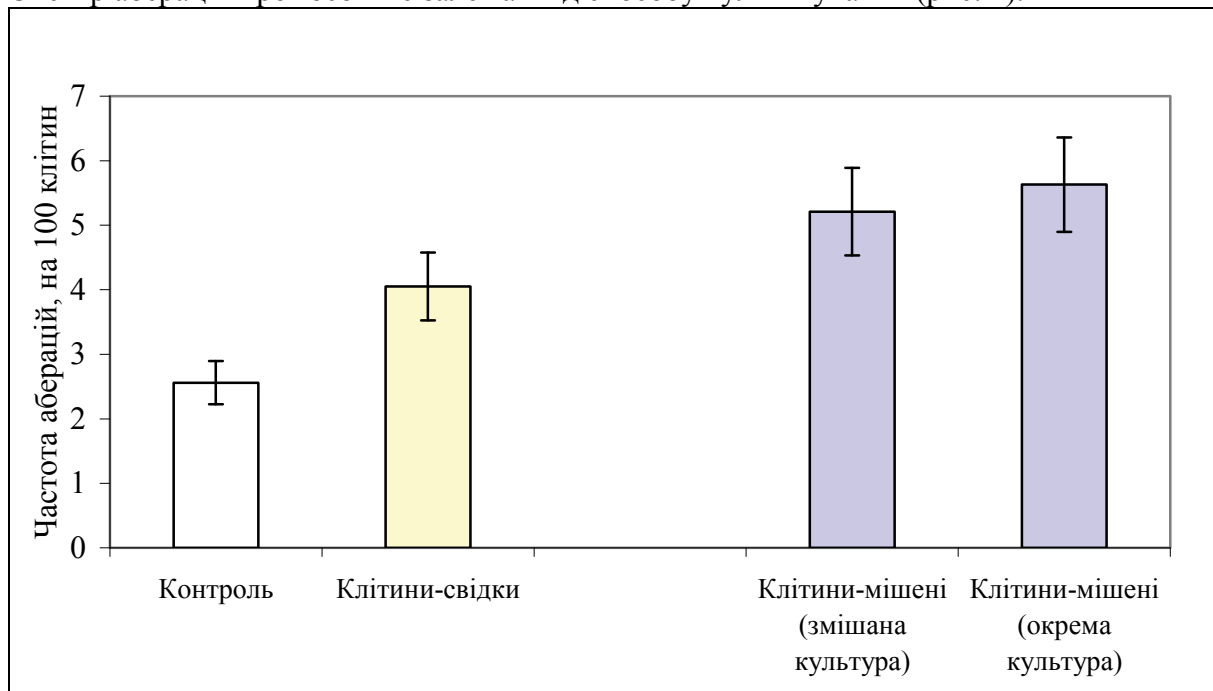


Рис. 1. Частота аберацій хромосом в неопромінених клітинах-свідках та опромінених *in vivo* клітинах-мішенях при культивуванні в змішаних культурах

Цитогенетичний аналіз неопромінених лімфоцитів периферичної крові, що культивувались в змішаних культурах з лімфоцитами, опроміненими *in vivo*, показав, що частота аберацій хромосом ($4,05 \pm 0,64$ на 100 метафаз) в клітинах-свідках статистично перевищувала контрольний рівень аберацій в змішаних культурах неопромінених лімфоцитів ($p < 0,05$).

Аналіз спектру виявлених пошкоджень показав зростання частоти аберацій хроматидного типу в неопромінених клітинах, що культивувались з опроміненими, до $2,49 \pm 0,50$ порівняно з $1,12 \pm 0,42$ на 100 метафаз в контролі ($p < 0,05$). (рис. 2). Рівень маркерів радіації в клітинах-свідках був на рівні контрольного.

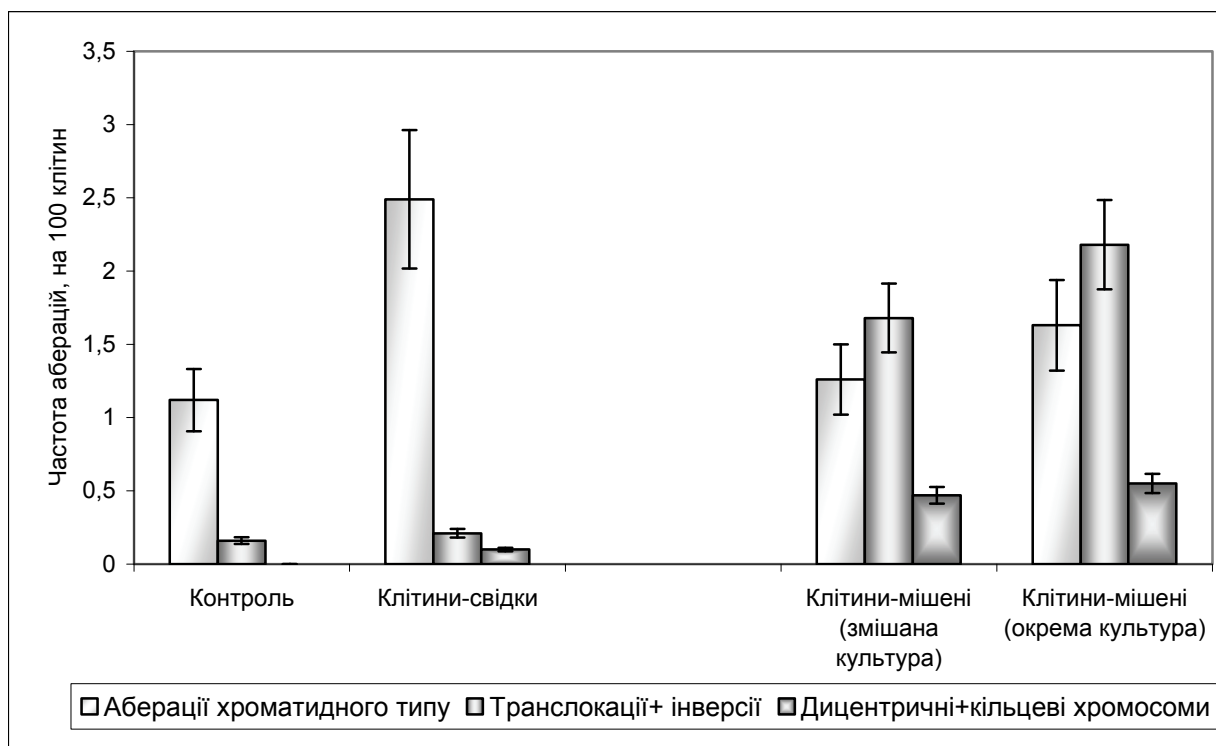


Рис. 2. Частота аберацій хроматидного типу та маркерів дії радіації в клітинах-свідках та опромінених *in vivo* клітинах-мішенях при культивуванні в змішаних культурах

Наведені дані щодо рівня і спектру аберацій хромосом в клітинах-свідках (зростання частоти пошкоджень хроматидного типу та стабільний рівень транслокацій і дицентриків) узгоджуються з результатами наших попередніх дослідів, отриманих при моделюванні ефекту свідка з використанням лімфоцитів крові, опромінених *in vitro* [6].

В лімфоцитах ліквідаторів аварії на ЧАЕС у віддалені строки після опромінення рівень транслокацій, які є стабільними маркерами дії радіації, на порядок перевищував популяційний. Частота нестабільних маркерів дії радіації в 3 рази перевищувала популяційну. Більшість цих пошкоджень була представлена кільцевими хромосомами.

Висновки

З використанням моделі зі змішаної культури опромінених *in vivo* і неопромінених лімфоцитів крові людини зареєстровано радіоіндукований ефект свідка на цитогенетичному рівні. Частота аберацій хромосом в клітинах-свідках зростала за рахунок підвищеної індукції хроматидних розривів.

Література

1. Nagasawa H., Little J. B. Induction of sister chromatid exchanges by extremely low doses of alpha- particles // *Cancer Res.* – 1992. – Vol. 52. – P. 6394–6396.
2. Луттл Д.Б. Немишеневые эффекты ионизирующих излучений: выводы применительно к низкодозовым воздействиям // *Радиационная биология. Радиоэкология.* – 2007. – Т. 47, № 3. – С. 262-272.
3. Prise K.M., Belyakov O.V., Newman H.C. et al. Non-targeted effects of radiation: Bystander responses in cell and tissue models. // *Radiat. Prot. Dosimetry.* – 2002. – Vol. 99, № 1-4. – P. 223–226.
4. Шеметун О.В., Пілінська М.А., Талан О.О. Підходи до виявлення радіаційно індукованого „ефекту свідка” в соматичних клітинах людини на цитогенетичному рівні // *Українські медичні вісті.* – 2005. – Т. 6, № 1-2. – С. 427.
5. Шеметун О.В., Талан О.О., Пілінська М.А. Модель для дослідження радіаційно-індукованого «ефекту свідка» з використанням лімфоцитів периферичної крові людини // *Журнал АМН України*. – 2006. – Т. 12, № 3. – С. 556-565.

6. Шеметун О.В., Талан О.О., Пілінська М.А. Дослідження радіаційно-індукованого «ефекту свідка» з використанням моделі з лімфоцитів крові людини при опроміненні *in vitro* // Журнал АМН України”. – 2007. - Т.13, № 3. - С. 592-599.

Резюме

Приведены результаты исследования радиационно индуцированного эффекта свидетеля с использованием модели из лимфоцитов крови человека. Показано, что в результате этого феномена уровень aberrаций хромосом в необлученных клетках при культивировании в смешанных культурах с облученными *in vivo* в дозах 1,01-2,37 Гр лимфоцитами достоверно превышал контрольный.

Наведені результати дослідження радіаційно індукованого ефекту свідка з використанням моделі з лімфоцитів крові людини. Показано, що внаслідок цього феномену рівень аберацій хромосом в неопромінених клітинах при культивуванні в змішаних культурах з опроміненими *in vivo* в дозах 1,01-2,37 Гр лімфоцитами достовірно перевищував контрольний.

The results of cytogenetic investigation of radioinduced bystander effect with the help of human blood lymphocytes had been presented. It had been shown that as the result of this phenomenon the level of chromosome aberrations in bystander cells cultivated jointly with irradiated *in vivo* in dose 1,01-2,37 Gy was significantly higher, than control level.

ШЕРЕМЕТ Я.О., ЄМЕЦЬ А.І., БЛЮМ Я. Б

*Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України,
Україна, 03680, Київ, вул. акад. Заболотного, 148, *e-mail: alyemets@univ.kiev.ua*

З'ЯСУВАННЯ РОЛІ ФОСФОРИЛЮВАННЯ ТУБУЛІНУ ПО ЗАЛИШКАМ ТИРОЗИНУ У ФОРМУВАННІ МЕХАНІЗМІВ ХОЛОДОСТІЙКОСТІ РОСЛИННИХ КЛІТИН

Низька температура є одним із найважливіших абіотичних факторів, який впливає на ріст, розвиток та продуктивність рослин. На даний час особливо важливим питанням біології рослин є з'ясування механізмів формування холодостійкості у рослин. Відомо, що температура є одним із основних факторів, що впливає на організацію мікротрубочок (МТ) у рослинній клітині (Wasteneys, 2000). У ряді робіт показано, що низькі температури призводять до катастрофічних змін в організації МТ тваринних клітин, викликаючи їх повну деполімеризацію (Wallin and Strömberg, 1995). Відомо, що динаміка та організація МТ може регулюватись за рахунок посттрансляційних модифікацій тубуліну як основного структурного компоненту МТ (Westermann and Weber, 2003). Нещодавно за допомогою біохімічних методів нами було встановлено, що фосфорилування рослинного тубуліну по залишкам тирозину приймає участь в регуляції чутливості МТ до дії холоду (Blume et al., 2008). Для більш детального вивчення ролі даного типу посттрансляційної модифікації на структурно-функціональні властивості МТ у рослинних клітинах було досліджено кореляцію між процесами фосфорилування/дефосфорилування по залишкам тирозину та стійкістю/чутливістю кортикальних МТ до дії холоду в клітинах коренів проростків *Arabidopsis thaliana* (GFP-MAP4).

Матеріали і методи

Як експериментальний матеріал використовували 4-денні проростки лінії *Arabidopsis thaliana*, що експресує химерний білок GFP-MAP4 (Mathur and Chua, 2000), який декорує нативні структури МТ. Матеріал для проведення експериментів отримували згідно протоколу, описаного нами раніше (Yemets et al., 2008).

Для дослідження впливу процесів фосфорилування білків по залишкам тирозину на стійкість/чутливість кортикальних МТ в клітинах коренів *Arabidopsis* до дії низької температури (+0,5° С) було використано гербіміцин А, як інгібітор нерцепторної тирозинкінази (Sigma, USA) та ортованадат натрію у якості інгібітору тирозинфосфатази (Sigma, USA), у концентраціях 30 мкМ та 250 мкМ, відповідно, як було встановлено нами раніше (Yemets et al., 2008). Проростки *A. thaliana* обробляли гербіміцином та ортованадатом натрію при кімнатній температурі (+24° С) протягом 1 та 2 год. Надалі їх утримували в умовах холодного стресу (+0,5° С) протягом 1-5 год. Як контроль використовували корені після 1-5 год. Експозиції при температурі +0,5° С без попередньої експозиції із інгібіторами.

Кортикальні МТ в клітинах різних функціональних зон первинного кореня (меристематичної, дистальної та центральної зон елонгації та зони диференціації) досліджували *in vivo* за допомогою конфокального лазерного скануючого мікроскопу LSM 510 META (Carl Zeiss, Німеччина). Для отримання тривимірного зображення було використано 488 лінію аргонного лазера (зі збудженням на 488/543 нм та емісією при 510/540 нм), імерсійний об'єктив із 63-кратним збільшенням (Plan-Apochromat).

Результати та обговорення

Спочатку досліджували вплив низької температури при експозиції протягом 1-5 год на організацію кортикальних МТ у клітинах різних функціональних зон кореня *A. thaliana*. Було встановлено, що обробка проростків *Arabidopsis* холодом протягом 1 та 2 год не викликала значних змін в організації та орієнтації МТ у всіх досліджуваних зонах кореня, у порівнянні з контролем. Обробка проростків холодом протягом тривалішого часу (4 год) призводила до порушення нативної організації МТ в епідермальних клітинах меристематичної зони кореня, де вдавалось візуалізувати лише короткі МТ. У більшості клітин зон елонгації та диференціації значна частина кортикальних МТ була деполімеризована, а в окремих клітинах було виявлено тільки поодинокі тяжі довгих МТ. Після 5 год обробки холодом кортикальні МТ у всіх типах клітин кореня були повністю деполімеризовані. Результати досліджень підсумовані в Табл. 1.

Таблиця 1.

Вплив гербіміцину А, ортованадату натрію та низької температури на організацію кортикальних МТ в клітинах різних зон кореня *A. thaliana* (GFP-MAP4)

Інгібітор	Обробка		Зони кореня									
			меристематична			елонгації				диференціації		
	інгібітор, 24° С, год	холод, 0.5°С, год	кореневий чохлик	епідерміс	меристема	дисталь на		центрально на		епідерміс	кортекс	кореневі волоски
						епідерміс	кортекс	епідерміс	кортекс			
	-	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	-	2	+	+	+	+/-	+	+	+	+	+	+
	-	3	+/-	+/-	+/-	-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
	-	4	+/-	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
гербіміцин	1	-	+	+	+	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	-
	1	1	+/-	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1	2	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	+/-	+/-	+/-	+/-	-	+/-	-	+/-	-	-
	2	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ортова-	1	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

надат натрію	1	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	1	2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	1	5	+/-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	2	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	2	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	2	2	+/-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	2	5	+/-	+	+	+/-	+	+/-	+	+	+	-

*Умовні позначення: “+” – візуалізація нативної організації кортикальних МТ; “+/-” – часткова деполімеризація кортикальних МТ, “-” – кортикальні МТ не піддаються візуалізації.

Отримані дані узгоджуються із результатами інших робіт по вивченню впливу низьких температур на організацію МТ в клітинах інших видів рослин (Abdrakhamanova et al., 2003; Valuška et al., 1993), в яких показано, що в залежності від типу клітин та зони кореня рослинні МТ мають різну чутливість до дії холоду. Так, наприклад, на коренях кукурудзи було продемонстровано, що найбільш чутливими до дії низької температури є кортикальні МТ у постмітотичній зоні (дистальній зоні елонгації) та центральній зоні елонгації кореня, тоді як МТ в клітинах меристематичної зони кореня мають більшу стабільність до дії холоду (Valuška et al., 1993). У свою чергу нами було встановлено, що кортикальні МТ в клітинах кореня *Arabidopsis* мають подібну чутливість до дії низьких температур.

Для виявлення можливого функціонального взаємозв'язку між рівнем фосфорилування тубуліну по залишкам тирозину та чутливістю МТ до дії холоду було досліджено вплив інгібіторів тирозинкіназ та тирозинфосфатаз на стійкість/чутливість кортикальних МТ у клітинах кореня *Arabidopsis* до низької температури. Встановлено, що попередня обробка проростків гербіміцином протягом 1 год (при 24°C) та їх подальша експозиція за умов низької температури протягом 1 год та 2 год призводили до драматичних змін в організації МТ. Так, зокрема, в епідермальних клітинах зон елонгації та диференціації кортикальні МТ взагалі було неможливо візуалізувати (МТ були повністю деполімеризовані). В епідермальних клітинах меристематичної зони кореня були виявлені окремі лише короткі кортикальні МТ. Однак, в контрольних проростках, що були експоновані лише в умовах низької температури протягом аналогічного часу (1 та 2 год) не спостерігали значних змін в організації кортикальних МТ. Збільшення часу попередньої обробки гербіміцином до 2 год з подальшою експозицією проростків при температурі 0,5°C (1 год) призводило до повної деполімеризації МТ у всіх досліджуваних зонах кореня.

Показано, що обробка проростків *Arabidopsis* ортованодатом натрію пооттягом 1 та 2 год за умов кімнатної температури не викликала очевидних змін в організації та орієнтації кортикальних МТ в епідермальних та клітинах кортексу всіх зон кореня. Встановлено, що попередня обробка інгібітором тирозинфосфатаз (1 та 2 год) та подальша експозиція за умов низької температури як протягом 1 та 2 год, так і протягом тривалішого часу (5 год) не призводила до деполімеризації кортикальних МТ. В свою чергу, в контрольних проростках, що знаходились в аналогічних умовах холодостресу протягом 5 год, обробка низькою температурою призводила до повної деполімеризації МТ в клітинах усіх функціональних зон кореня.

Раніше за допомогою біохімічних методів нами вперше було встановлено, що посттрансляційне фосфорилування тубуліну по залишкам тирозину приймає участь в регуляції чутливості МТ до дії холоду (Blume et al., 2008). На клітинах суспензійної культури моркви було встановлено, що холодочутлива фракція МТ має вищий рівень фосфорилування по залишкам тирозину, ніж холодостабільна фракція. Проте функціональний вплив даного типу фосфорилування тубуліну на рівень стійкості/чутливості МТ у різних типах рослинних клітин до дії холоду не було досліджено. В ряді попередніх робіт було показано, що фосфорилування білків по

залишкам серину/треоніну може впливати на чутливість МТ в різних типах рослинних клітин до дії низьких температур (Katsute and Shibaoka, 1992; Mizuno, 1992; Zhao et al., 2003). Зокрема, на клітинах кореневого апексу огірка (*Cucumis sativus* L.) було продемонстровано, що зменшення рівня фосфорилування в рослинній клітині по залишкам серину/треоніну після обробки специфічним інгібітором протеїнкіназ призводить до підвищення чутливості кортикальних МТ в клітинах кореневого апексу кореня до дії холоду (Zhao et al., 2003).

В результаті проведених досліджень нами вперше було встановлено, що обробка проростків *A. thaliana* інгібітором тирозинкіназ значно збільшує чутливість кортикальних МТ до дії холоду. На противагу цьому після обробки коренів інгібітором тирозинфосфатаз кортикальні МТ у різних типах клітин кореня стають більш стійкими до дії низької температури у порівнянні із контролем. Отримані результати дозволяють зробити припущення про те, що існує певний функціональний взаємозв'язок між рівнем фосфорилування білків і, очевидно, тубуліну, по залишкам тирозину та чутливістю/стабільністю кортикальних МТ до дії холоду.

Література

1. *Abdrakhamanova A., Wang Q., Khohlova L., Nick P.* Is microtubule disassembly a trigger for cold acclimation? // *Plant Cell Physiol.* - 2003. - vol. 44, №7. - P. 676-686.
2. *Baluška F., Parker J.S., Barlow P.W.* The microtubular cytoskeleton in cells of cold-treated roots of maize (*Zea mays* L.) shows tissue-specific responses // *Protoplasma.* - 1993. - vol. 172.- P.84-96.
3. *Blume Ya., Yemets A., Sulimenko V., Sulimenko T., Chan J., Lloyd C., Draber P.* Evidence of tyrosine phosphorylation of plant tubulin // *Planta* – 2008, in press.
3. *Huang R., Lloyd C.* Gibberellic acid stabilizes microtubules in maize suspension cells to cold and stimulates acetylation of α -tubulin // *FEBS Lett.* – 1999.- vol. 443.– P.317-320.
4. *Katsuta J., Shibaoka H.* Inhibition by kinase inhibitors of the development and disappearance of the preprophase band of microtubules in tobacco BY-2 cells // *J. Cell Sci.* – 1992. – vol. 103.- P.397-405.
5. *Mathur J., Chua N.* Microtubule stabilization leads to growth reorientation in *Arabidopsis* trichomes // *Plant Cell.* - 2000.- vol.12.- P.65-477.
6. *Mizuno K.* Induction of cold stability of microtubules in cultured tobacco cells // *Plant Physiol.* – 1992.- vol. 100.– P.740-748.
7. *Wallin M. Strömberg E.* Cold-stable and cold-adapted microtubules // *Int. Rev. Cytol.*– 1995.- vol. 157.– P.1-31.
8. *Wasteneney G.* The cytoskeleton and growth polarity // *Curr. Opin. Plant Biol.*– 2000.- vol. 3.– P.503-511.
9. *Yemets A., Sheremet Ya., Vissenberg K., Van Orden U., Verbelen J.-P., Blume Ya. B.* Effects of tyrosine kinase and phosphatase inhibitors on microtubules in *Arabidopsis* root cells // *Cell Biol. Int.*– 2008. –doi:10.1016/j.cellbi.2008.01.013 .
10. *Zhao J.-L., Li X.-L., Zhang H., Li Y.* Chilling stability of microtubules in root-tip cells of cucumber // *Plant Cell Rep.*– 2003.- vol. 22.- P.32-37.

Резюме

Встановлено, що обробка проростків *Arabidopsis thaliana*, що експресують GFP-MAP4, інгібітором тирозинкіназ (гербіміцином А) значно підвищує чутливість кортикальних мікротрубочок (МТ) клітин коренів до дії холоду; тоді як після обробки інгібітором тирозинфосфатази (ортованадатом натрію) кортикальні МТ ставали більш стійкими до дії низької температури у порівнянні із контролем.

Установлено, что обработка проростков *Arabidopsis thaliana*, экспрессирующей GFP-MAP4, ингибитором тирозинкиназ (гербиимицином А) значительно повышает чувствительность кортикальных микротрубочек (МТ) клеток корней к действию холода;

тогда как после обработки ингибитором тирозинфосфатазы (ортованадатом натрия) кортикальные МТ становились более устойчивыми к действию низкой температуры по сравнению с контролем.

It was found that treatment of *Arabidopsis thaliana* (GFP-MAP4) seedlings with tyrosine kinase inhibitor (herbimycin A) significantly increase the cortical microtubules (MTs) sensitivity of the root cells to cold, whereas after treatment with inhibitor of tyrosine phosphatase (sodium orthovanadate) cortical MTs become more resistant to low temperature exposure as compared to control.

**ШЛЯХОТКО Е.А.¹, САПУНОВА Л.И.¹, ЛОБАНОК А.Г.¹, ЕВТУШЕНКОВ А.Н.²,
ВЫГОВСКАЯ О.Н.²**

¹ГНУ «Институт микробиологии НАН Беларуси», Беларусь, 220141, Минск,
ул. В.Ф.Купревича, 2, тел.: + (37517) 267-62-09, факс: + (37517) 267-47-66,
e-mail: leonida@mbio.bas-net.by

²Белорусский государственный университет, Беларусь, 220050, Минск,
пр-кт Независимости, 4, e-mail: evtushenkov@bsu.by

КОНСТРУИРОВАНИЕ ГИБРИДНОГО ВЕКТОРА ДЛЯ КЛОНИРОВАНИЯ ГЕНА ХУЛА В БАКТЕРИЯХ РОДА *ARTHROBACTER*

Широкое практическое использование бактерий родов *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Brevibacterium* и *Mycobacterium* в микробиологической промышленности обусловлено необычайно разнообразным спектром продуцируемых ими метаболитов. Повышение продуктивности имеющихся и создание новых производственных штаммов – одно из необходимых условий развития и поддержания рентабельности существующих и создания современных биотехнологий, в основе которых лежит микробный синтез. Благодаря достигнутому в последние десятилетия успехам молекулярной биологии, при создании штаммов-суперпродуцентов коммерчески востребованных продуктов на смену традиционным генетическим методам приходят технологии рекомбинантных ДНК, или генной инженерии.

Генно-инженерное изменение наследственных свойств организма является результатом конструирования из различных фрагментов нового генетического материала, введения его в реципиентный организм и создания условий для стабильного наследования и функционирования генетических конструкций. В настоящее время большинство векторных молекул для клонирования и экспрессии генов, а также методик введения генетического материала в компетентные клетки разработано для манипуляций с грамотрицательными микроорганизмами, в частности, с различными штаммами бактерий *Escherichia coli*. Как правило, указанные генетические конструкции и методические приемы не предназначены для работ с грамположительными организмами, в том числе и с актинобактериями рода *Arthrobacter*. Создание векторов для клонирования генов в указанной группе микроорганизмов позволит конструировать на их основе новые высокоактивные штаммы-продуценты коммерчески востребованных продуктов.

Ранее нами был отобран штамм *Arthrobacter nicotianae* БИМ В-5-МГ-1, характеризующийся высоким уровнем синтеза ксилозиомеразы (D-ксилоза кетол-изомераза, КФ 5.3.1.5) [1]. Фермент предназначен для промышленного производства натуральных подсластителей – глюкозо-фруктозных сиропов и кристаллической фруктозы из осахаренного крахмала [2].

Для конструирования рекомбинантного штамма-продуцента ксилозиомеразы на основе бактерий рода *Arthrobacter* необходимо создание векторных систем для

прямого клонирования генов и их эффективной экспрессии в указанной группе микроорганизмов, что является целью данной работы.

Материалы и методы

Бактерии выращивали глубинно в 250 мл колбах Эрленмейера при 28⁰С (бактерии рода *Arthrobacter*), 30⁰С (*Corynebacterium glutamicum*) и 37⁰С (*Escherichia coli*) в течение соответственно 72, 30 и 24 ч на питательной среде Лурия-Бертани (LB-среде), содержащей (в г/л): пептон – 10,0, дрожжевой экстракт – 5,0, NaCl – 10,0. При выращивании рекомбинантных штаммов указанная среда дополнительно включала антибиотик, соответствующий селективному маркеру резидентной плазмиды, – канамицин, тиострептон или ампициллин в количестве соответственно 0,02, 0,05 или 0,1 г/л.

Посевным материалом служила суспензия 16-18-часовой культуры исследуемых бактерий, выращенной на жидкой LB-среде, в количестве 1 об.%.

Выделение ДНК плазмид из клеток *Escherichia coli*, *Corynebacterium glutamicum*, *Arthrobacter citreus* проводили согласно протоколам [3-5]. Рестрикцию и лигирование ДНК осуществляли общепринятыми методами [6]. В работе использовали ферментные препараты «Fermentas» (Литва).

Выделение и очистку фрагментов ДНК проводили в соответствии с инструкцией производителя набора «Fermentas» (Литва), трансформацию бактерий рода *Arthrobacter* – согласно [5].

Электрофоретическое разделение фрагментов ДНК осуществляли общепринятым методом в 1%-ном агарозном геле.

Результаты и обсуждение

Важной предпосылкой успешного клонирования генов является использование генетических конструкций, которые содержат репликон, ведущий свое происхождение от резидентной плазмиды модифицируемого организма. Согласно результатам выполненных нами исследований, резидентные плазмиды в клетках одиннадцати различных штаммов рода *Arthrobacter*, хранящихся в Белорусской коллекции непатогенных бактерий, не выявляются. Анализ данных литературы показал, что специальные векторы для клонирования и экспрессии генов в бактериях рода *Arthrobacter* в настоящее время также отсутствуют. Принимая во внимание вышеизложенное, одним из решений проблемы введения генетического материала в актинобактерии рода *Arthrobacter* является использования известных генетических конструкций, которые предназначены для трансформации близкородственных видов и родов. Успешное клонирование генов в бактериях рода *Arthrobacter* осуществлено в составе векторов, сконструированных для *Brevibacterium lactofermentum*, *Corynebacterium glutamicum* и *Streptomyces lividans* [5, 7].

Поэтому нами была изучена возможность экспрессии векторов, созданных для вышеуказанных организмов, в клетках *Arthrobacter nicotianae*. Трансформацию бактерий *A. nicotianae* осуществляли векторами *pHY416* (*C. glutamicum* – *Bacillus subtilis*), *pHAG6* (*C. glutamicum*) и *pIJ702* (*Streptomyces lividans*) по методике, описанной в [5] с модификациями. А именно: при получении протопластов Р-буфер заменяли 1 М фосфатным буфером (рН 8,0), содержащим 10,3 % сахарозы, а инкубацию клеток с лизоцимом (5 мг/мл) проводили при комнатной температуре без периодического перемешивания.

В результате проведенных исследований было установлено, что клоны, выросшие из подвергнутых трансформации протопластов бактерий *A. nicotianae*, приобретали устойчивость к канамицину или тиострептону, обусловленную соответственно векторами *pHY416* и *pHAG6* или *pIJ702*.

Результаты определения частоты образования трансформантов *A. nicotianae* в условиях опыта представлены в табл. 1.

Частота образования гибридных клонов при трансформации *A. nicotianae* различными векторами

Вектор	Частота образования гибридных клонов, клеток/мкг ДНК
<i>pHY416</i>	$10^4 - 10^5$
<i>pHAG6</i>	$10^2 - 10^3$
<i>pIJ702</i>	$10 - 10^2$

Как видно из представленных данных, наиболее подходящей для трансформации актинобактерий *A. nicotianae* оказалась плазмида *pHY416*, отобранная нами для дальнейшей работы по клонированию гена ксилосоизомеразы в клетках актинобактерий рода *Arthrobacter*. Указанный вектор размером 9,3 т.п.н. несет маркер устойчивости к канамицину и представляет собой гибридную молекулу ДНК, включающую резидентную плазмиду *pSRI* бактерий *Corynebacter glutamicum* и вектор *pBD10* *Bacillus subtilis*.

Для конструирования гибридной плазмиды *pHY416xylA*, наследующей ген ксилосоизомеразы *A. nicotianae*, в вектор *pHY416* встраивали ген *xylA*, находящийся в полученной ранее гибридной плазмиде *pUC18xylA* [8]. С этой целью векторы *pHY416* и *pUC18xylA* подвергали рестрикции соответственно ферментами *ScaI* и *SmaI*, рестрикционные смеси разделяли в агарозном геле, полученные фрагменты очищали адсорбцией на пористом стекле. Результаты электрофоретического анализа полученных фрагментов ДНК *pHY416/ScaI* и *xylA/SmaI* представлены на рис. 1.

Для увеличения выхода гибридных конструкций при лигировании, проводимом в течение 2 ч при комнатной температуре, фрагмент *xylA/SmaI* был представлен в 5-кратном избытке по отношению к фрагменту *pHY416/ScaI*. Отбор клонов, полученных в результате трансформации протопластов дефицитного по ксилосоизомеразе штамма *A. citreus*, проводили на полноценной среде с канамицином. Для контроля жизнеспособности протопласты высевали на полноценную среду без канамицина.

Рестрикционный анализ плазмидной ДНК, выделенной из клеток *A. citreus*, растущих на среде с канамицином и продуцирующих ксилосоизомеразу, подтвердил наличие в составе вектора *pHY416* вставочного фрагмента, содержащего ген *xylA* (рис. 2). Карта гибридной плазмиды *pHY416xylA* представлена на рис. 3.

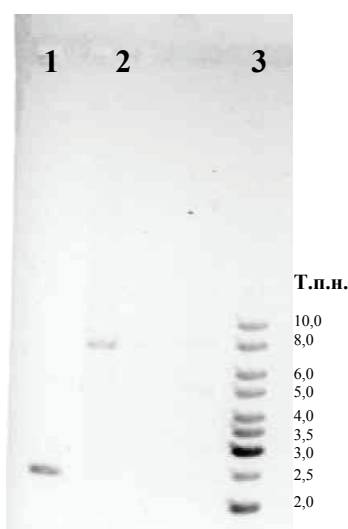


Рисунок 1

Электрофореграмма очищенных фрагментов ДНК:
1 – *pHY416/ScaI*, 2 – *xylA/SmaI*,
3 – молекулярный маркер

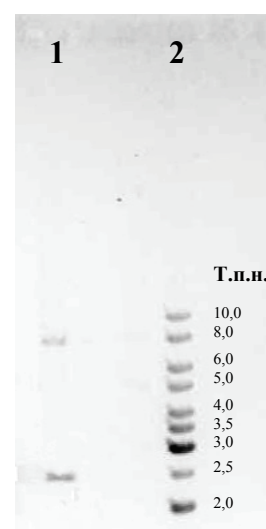


Рисунок 2

Электрофореграмма фрагментов рестрикции гибридной плазмиды *pHY416xylA* (1). Молекулярный маркер (2)

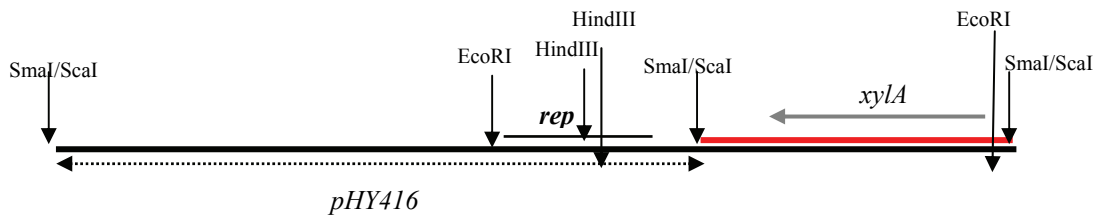


Рисунок 3
Карта гибридной плазмиды *pHY416xylA*

Заключение. Поиск резидентных плазмид в клетках одиннадцати различных штаммов бактерий рода *Arthrobacter*, предпринятый с целью конструирования вектора для клонирования генов в указанной группе микроорганизмов, не дал результата. Применение для трансформации *A. nicotianae* генетических конструкций близкородственных видов показало, что наибольшее число гибридных клонов (10^4 - 10^5 клеток/мкг ДНК) образуется при трансформации протопластов *A. nicotianae* вектором *pHY416*, созданным для клонирования в клетках *Corynebacterium glutamicum*. Сконструирована и использована для трансформации *Arthrobacter citreus* (*xylI*) гибридная плаزمида *pHY416xylA*, наследующая ген ксилоизомеразы *A. nicotianae*. Полученный трансформант *A. citreus* характеризуется устойчивостью к канамицину и способностью к синтезу ферментного белка, обусловленными экспрессией указанного вектора в клетках бактерий.

Литература

1. Lobanok A.G., Sapunova L.I., Dikhtievski Ya.O., Kazakevich I.O. // World J. Microbiol. Biotechnol. – 1998. – Vol. 14, № 2. – P. 259–262.
2. Bhosale S.H., Rao M.B., Deshpande V.V. // Microbiol. Rev. – 1996. – Vol. 60, № 2. – P. 280–300.
3. Birnboim H.G., Doly G. // Nucleic Acids Res. – 1979. –7. – P. 1513–1523.
4. Manual of industrial microbiology and biotechnology / ed. Demain A.L., Davies J.E. ... [et al]. – Washington. – 1999. – P. 830.
5. Roberts A.N., Barnet L., Brenner S. // Biochem J. – 1987. – Vol. 243. – P. 431–436.
6. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. – М.: Мир. – 1984. – 479 с.
7. Shaw P.C., Hartley B.S. // J Gen Microbiol. – 1988. – Vol. 134, № 4. – P. 903–911
8. Шляхотко Е.А., Сапунова Л.И., Лобанок А.Г., Евтушенко А.Н. // Доклады НАН Беларуси. – 2006. – Т. 50, № 3. – С. 73–76.

Резюме

Сконструирована гибридная плазмида *pHY416xylA* с геном *xylA* *Arthrobacter nicotianae*. Трансформированный вектором *pHY416xylA* штамм *Arthrobacter citreus* (*xylI*) приобрел устойчивость к канамицину и способность к продукции ксилоизомеразы.

Сконструйована гібридна плазмідна *pHY416xylA* з геном *xylA* *Arthrobacter nicotianae*. Трансформований вектором *pHY416xylA* штаб *Arthrobacter citreus* (*xylI*) набував стійкість до канаміцину і здатність до продукції ксилозоізомерази.

Hybrid plasmid *pHY416xylA* carrying gene *xylA* of *Arthrobacter nicotianae* was designed. *Arthrobacter citreus* (*xylI*) after transformation by such plasmid became canamycin resistant and xylose isomerase positive.

ЩЕРБАК О.В., ТРОЦЬКИЙ П.А., ЗЮЗІОН А.Б.

Інститут розведення і генетики тварин УААН,

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

e-mail: ov19792006@yandex.ru

БІОТЕХНОЛОГІЧНІ МЕТОДИ ОДЕРЖАННЯ І ЗБЕРІГАННЯ ГАМЕТ СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКИХ ТВАРИН

Проблема збереження біологічного різноманіття рідкісних видів диких та зникаючих порід сільськогосподарських тварин має світове значення і зумовлює підвищену увагу до удосконалення методів одержання і збереження повноцінних гамет, придатних для отримання потомства. Метод кріоконсервування репродуктивних клітин ссавців, який вперше був запропонований у 1947 році Міловановим В.К., Соколовською І.І., Смирновим І.В., створив можливість довготривалого збереження генетичного матеріалу (сперми) тварин у замороженому стані. Збереження генетичних ресурсів рідкісних, зникаючих та унікальних видів тварин має значну наукову, інформаційну, економічну і медичну цінність. Ініціатором створення генетичних кріобанків і використання методів біології розвитку для збереження різних видів тварин був Б.М. Вепрінцев [1].

При збереженні генофонду тварин, які знаходяться на межі зникнення, привертає особливу увагу метод кріоконсервування сперматозоїдів, вилучених із придатків сім'яників (епідидимальні). У Всеросійському науково-дослідному інституті тваринництва створений банк кріоконсервованих епідидимальних сперматозоїдів диких тварин (вівцебик, як, сайгак) [2].

Перспектива практичного використання генетичного матеріалу передбачає всебічне вивчення можливої побічної дії кріопротекторів, або їх багатокомпонентних сумішей. Особливу увагу приділяють цитотоксичній дії кріозахисних середовищ при вітрифікації у зв'язку із застосуванням високих концентрацій кріопротекторів. Наразі при проведенні експериментальних досліджень із заморожування зародків великої рогатої худоби, одержаних як *in vivo* так і *in vitro*, та гамет самиць корів, використовується широкий спектр кріопротекторів ендо- і екзоцелюлярної дії та різних їх співвідношень у вітрифікаційному розчині [3, 4, 5].

Метою досліджень було вдосконалити розроблені нами біотехнологічні методи кріоконсервування епідидимальних сперматозоїдів бугаїв та кнурів і незрілих ооцит-кумуляюсних комплексів (ОКК) корів для підвищення ефективності збереження генофонду тварин.

Матеріали і методи

Для досліджень використовували сім'яники бугаїв голштинської породи і кнурів великої білої породи. Сім'яники відділяли від мошонки після кастрації тварин і доставляли в лабораторію. В лабораторних умовах звільняли сім'яник від оболонки і відокремлювали хвіст придатка сім'яника (епідидиміса). Сперматозоїди вилучали шляхом розрізання хвостової частини епідидимісів скальпелем. Надрізи придатків робили у місці скупчення каналців, видавлюючи вміст і відбираючи отриману суміш сперматозоїдів. Для заморожування епідидимальних сперматозоїдів бугаїв у формі відкритих гранул використовували лактозо-гліцеріно-жовтковий розбавник (ЛГЖ), а для кнурів „Біоконсан”.

Іншим об'єктом експериментальних досліджень були ОКК корів. Їх одержували шляхом надрізу лезом антральних фолікулів, вимивали середовищем Дюльбекко та оцінювали за морфологічними ознаками. Для заморожування використовували ооцити корів з гомогенною тонкозернистою ооплазмою, неущкодженою прозорою оболонкою,

щільним або частково розпушеним кумулюсом. Перед заморожуванням гамети обробляли еквілібраційним розчином, потім переносили у вітрифікаційний розчин. Для заморожування ооцит-кумулясних корів використовували п'ять різних вітрифікаційних розчинів: ВР - 1 – 40% етиленгліколю + 0,5 М сахарози + 18% фіколу (гр. А); ВР - 2 – 40% гліцерину + 0,5 М сахарози + 18% фіколу (гр. Б); ВР - 3 – 25% етиленгліколю + 25% диметилсульфоксиду (гр. В); ВР - 4 – 25% етиленгліколю + 25% пропандіолу (гр. Г); ВР - 5 – 25% гліцерину + 25% пропандіолу (гр. Д). Група К, в якій ооцит-кумулясні комплекси корів не заморожували, була контрольною.

Всі вітрифікаційні розчини були приготовлені на фосфатно-сольовому буфері Дюльбекко з додаванням 20% фетальної сироватки корів. Після розморожування гамет корів виведення кріопротекторів з них проводили шляхом перенесення їх на 10 хвилин у розчин 1,0 М сахарози. Потім клітини тричі відмивали середовищем 199, оцінювали за морфологічними ознаками і переносили в середовище для культивування. ОКК корів культивували протягом 27 годин при температурі 38,5°C, 5% CO₂ у повітрі, в краплях середовища 199 з 10% попередньо інактивованою сироваткою корів, 2,5 мкг/мл ФСГ, 1,0 мкг/мл естрадіолу, 2,5 М Од/мл лютеїнізуючого гормону, 2,0 мМ натрія пірувату, 2,92 мМ кальція лактату, 40 мкг/мл гентаміцину. Після культивування поза організмом здійснювали цитогенетичний аналіз гамети корів. Цитогенетичні препарати готували за методом Tarowski A.K., забарвлювали 10% розчином Гімза та досліджували під мікроскопом.

Результати і їх обговорення

В Інституті розведення і генетики тварин УААН функціонує Банк генетичних ресурсів тварин в якому накопичено 132 тис. спермодоз еякульованих сперматозоїдів 25 порід великої рогатої худоби. На зберігання в банк закладено 1100 спермодоз бугаїв та 3800 спермодоз кнурів епідидимальних сперматозоїдів. Даний матеріал використовується не лише для зберігання, а і для наукових досліджень з відпрацювання, удосконалення ефективності формування ембріонів *in vitro* та розробки, на основі цього методу, новітніх біотехнологічних напрямків. Такі дослідження вимагають наявності великої кількості вихідного біологічного матеріалу для експериментів. Також в банк генетичних ресурсів нами закладено епідидимальні сперматозоїди від бугаїв та кнурів, яких використовували як плідників (табл.).

Таблиця

Наявність кріоконсервованих епідидимальних сперматозоїдів у Банку генетичних ресурсів тварин Інституту розведення і генетики тварин УААН

Вид тварин	Кличка, № плідника/порода	Господарство, якому належав плідник	Заморожено доз	Рухливість розморожених сперматозоїдів, бали
Бугаї	Океан 2163/ голштинська	ДСП „Головний селекційний центр України”	60	5
	Араб 1985/ голштинська	ДСП „Головний селекційний центр України”	100	5
Кнури	Бистрий 523 / синтетична популяція Дніпропетровського аграрного університету	ПЗ „Самарський”	450	3
	00360/велика біла	ВАТ „Агрокомбінат „Калита”	150	3

Відомо, що епідидимальні сперматозоїди баранів, кнурів і бугаїв проявляють вищий рівень стійкості до холодового шоку порівняно з еякульованими [6]. Нами відмічено, що рухливість свіжоодржаних епідидимальних сперматозоїдів залежно від виду складає від 3 до 8 балів, а після розморожування від 3 до 5 балів. Такий прояв рухливості епідидимальних сперматозоїдів самців є стабільним, що свідчить про ефективність даного методу для збереження генофонду тварин.

Застосування кріоконсервованих епідидимальних сперматозоїдів кнурів для осіменіння яйцеклітини поза організмом дозволило встановити запліднювальну здатність кнура Бистрий 523 на рівні 45,7% за результатами формування зигот *in vitro* (37/81). При аналізі ефективності використання заморожено-розморожених епідидимальних сперматозоїдів цього кнура встановлений рівень дроблення ембріонів свиней поза організмом (35,8%) та розвитку *in vitro* сформованих ембріонів до доімплантаційних стадій (23,5%). Ці дані узгоджуються з результатами досліджень Х. Ікеди із співавторами, якими відмічено 60%-й рівень запліднення *in vitro* яйцеклітин свиней та ефективність дроблення зародків на рівні 21% при використанні кріоконсервованих епідидимальних сперматозоїдів кнурів [7]. Заплідненість гамет самок поза організмом у наших дослідженнях була нижчою, але підібрані нами умови культивування ембріонів свиней *in vitro* забезпечили вищий рівень дроблення ембріонів.

Результати застосування кріоконсервованих епідидимальних сперматозоїдів свідчать про можливість їх використання для сучасних біотехнологічних методів і стосовно цього виду тварин про відсутність альтернативного джерела гамет кнурів для співкультивування з яйцеклітинами поза організмом у будь-який час.

Дослідження з поєднання ендо- і екзоцелюлярних кріопротекторів у вітрифікаційному розчині при заморожуванні ооцит-кумуляусних комплексів корів. Після розморожування гамет корів і їх оцінки за морфологічними ознаками переважна більшість з них виявились придатними для подальших маніпуляцій, зокрема культивування (гр. А – 93,3%; гр. Б – 88,9%; гр. В – 92,2%; гр. Г – 90,0%; гр. Д – 95,6%). За результатами цитогенетичного аналізу деконсервованих і прокультивованих поза організмом 27-м годин гамет корів виявлено різний рівень досягнення клітин стадії метафази-2 мейозу. Так 64,3 та 55,0% клітин знаходяться на метафазі-2 мейозу відповідно в групах А і Б, в яких для їх заморожування використовували поєднання проникаючих і непроникаючих кріопротекторів. При використанні для заморожування гамет тільки проникаючих кріопротекторів стадії метафази-2 мейозу після 27-ми годин культивування досягали 48,2; 56,8 і 54,7% гамет відповідно у групах В; Г і Д. Показник клітин з хромосомними порушеннями становив 22,6 і 28,8% відповідно у групах А і Б та 37,3; 30,9 і 26,7% у групах В; Г і Д. В контрольній групі, в якій використовували нативні гамети, через аналогічний термін культивування дозрівали до метафази-2 мейозу 81,2% клітин, а 10,6% при цьому мали порушення хромосом.

Висновки

Застосування методу кріоконсервування епідидимальних сперматозоїдів можна використовувати для удосконалення сучасних біотехнологічних розробок, збереження генофонду видатних особин та отримання потомства.

Застосування для кріоконсервування гамет корів вітрифікаційного розчину, який складається з 40% етиленгліколю, 0,5М сахарози і 18% фіколу збільшує показник дозрівання поза організмом деконсервованих ооцитів корів до метафази-2 мейозу на 7,5 - 16,1%, та зменшує кількість клітин з хромосомними порушеннями на 4,1 – 14,7%.

Створення генетичних банків є важливою ланкою у збереженні зникаючих генетично цінних тварин від яких життєво неможливо одержати біологічний матеріал унікальних генотипів.

Література

1. Методологічні аспекти збереження генофонду сільськогосподарських тварин / М.В. Зубець, В.П. Буркат, Ю.Ф. Мельник та ін., Наук. ред. І.В. Гузев.- К.: Аграрна наука: 2007.-120 с.
2. Сохранение генетических и уникальных видов животных / В.А. Багиров, Л.К. Эрнст, П.М. Кленовицкий, Н.А. Зиновьева // Цитология. - 2004.-Т. 46.- № 9, .-С.767-768.
3. Improving cryopreservation systems / G. Vajta, M. Kuwayama // Theriogenology.- 2006.- Vol.65, I.1.- P.236-244.
4. Криоконсервация половых клеток и эмбрионов животных: Монография / Л.В.Горбунов, Л.П. Бучацкий - К.: Издательско-полиграфический центр "Киевский университет", 2005.- 325 с.: ил., табл.- Библиогр.: с. 317-322.
5. Вплив різних кріопротекторів та їх сумішей на морфокінетичні характеристики сперміїв людини / В.І. Грищенко, Н.Н. Чуб, В.Л. Родіонова та ін. // Науково-технічний бюлетень: Зб. наук. праць.- Харків, 2008.- № 96.- С. 130-137.
6. The relationship of swimming movements of epididymal spermatozoa to their fertilizing capacity / R.J. Blandau, R.E. Rumery // Fertil. Steril.- 1964. № 15.- P 571-579.
7. Effect of preincubation of cryopreserved porcine epididymal sperm / H. K. Ikeda, J. Kikuchi, H. Noguchi et al. //Theriogenology.- 2002.-V.57.-P. 1309-1318.

Резюме

Обсуждается эффективность использования эпидидимальных сперматозоидов быков и хряков для сохранения генофонда и использования в биотехнологических исследованиях. Установлена эффективность применения эндо- и экзоцеллюлярных криопротекторов в витрификационном растворе для замораживания ооцит-кумулюсных комплексов коров.

It is discussed effects of using bull and board epididymal spermatozoa in preservation of gene pool and biotechnology investigation. It is investigated efficiency of application intracellular and outside cellular crioprotectors in vitrification solution for bovine oocytecumulus complexes freezing.

ЭЛЬКОНИН Л.А., КОЖЕМЯКИН В.В., ЦВЕТОВА М.И.

ГНУ НИИ сельского хозяйства Юго-Востока Россельхозакадемии,
Россия, 410010, Саратов, ул. Тулайкова, 7, e-mail: elkonin@mail.saratov.ru

НАСЛЕДУЕМАЯ АКТИВАЦИЯ ГЕНОВ-ВОССТАНОВИТЕЛЕЙ УСЛОВИЯМИ ВЫРАЩИВАНИЯ РАСТЕНИЙ КАК МЕХАНИЗМ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ФЕРТИЛЬНОСТИ В ЦМС-ИНДУЦИРУЮЩЕЙ ЦИТОПЛАЗМЕ ТИПА «9Е» У СОРГО

Наследуемые изменения генной активности, возникающие в онтогенезе растений и происходящие без изменений последовательности ДНК, относятся к числу наиболее интригующих явлений генетики, составляя сферу эпигенетики растений [1]. Известно, что подобные эпигенетические явления весьма чувствительны к условиям внешней среды и возникают как ответ на действие конкретных факторов. Так, у кукурузы температура или длина фотопериода влияют на индукцию парамутаций в генах, контролирующих окраску зерновки [2]. К сожалению, подобные эффекты для многих генетических систем растений изучены чрезвычайно слабо, в том числе, и для систем, контролирующую цитоплазматическую мужскую стерильность (ЦМС).

Нами в течение ряда лет проводилось исследование линий сорго с ЦМС типа «9Е» и генетически близкими к нему типами А4 и «М35-1А» [3,4]. В результате этих исследований было выявлено крайне необычное явление. Ген-восстановитель,

проявлявшийся в F_1 и, следовательно, являвшийся доминантным геном, не передавался через пыльцу и не восстанавливал фертильность ни гибридов с другими ЦМС-линиями с тем же типом цитоплазмы, ни гибридов с исходной ЦМС-линией. Вместе с тем, фертильность стабильно наследовалась при самоопылении фертильных гибридов (вплоть до F_8). Для объяснения этого явления нами была выдвинута гипотеза об изменении типа цитоплазмы под влиянием генов-восстановителей [5]. Однако эта гипотеза не получила экспериментального подтверждения; в то же время были получены косвенные данные, указывавшие на зависимость уровня мужской фертильности гибридов F_1 от влагообеспеченности растений на этапе развития генеративной сферы [4].

В данной работе сообщаются результаты экспериментов по проверке гипотезы о наследуемой активации генов-восстановителей у гибридов F_1 условиями окружающей среды (влагообеспеченностью и длиной фотопериода) и наследовании «включенных» генов в самоопыленном потомстве фертильных гибридов и в тест-кроссах с ЦМС-линиями на цитоплазме «9E» при выращивании в неиндуктивных условиях.

Материалы и методы

В работе использовали ЦМС-линии [9E]Желтозерное-10 ([9E]Ж-10), [9E]Пищевое-614 и [9E]Тх398; в качестве восстановителей фертильности служили фертильная линия в цитоплазме «9E», КВВ-263, которая была получена в результате самоопыления гибрида F_1 [9E]Тх398/КВВ-112, сортообразец Перспективное-1 (П-1) и линия КВВ-34, несущая ядерные гены эуплазматической линии-донора цитоплазмы «9E».

Для проверки гипотезы о наследуемой активации генов-восстановителей под влиянием внешней среды одни и те же гибриды F_1 , F_2 и BC_1 , полученные от скрещивания линий-восстановителей с разными ЦМС-линиями, выращивали одновременно на разных участках при разном режиме влагообеспеченности: в условиях дополнительного регулярного полива (50 л/м^2 начиная со стадии формирования трубки) и «засушника», изготовленного из прозрачного поликарбоната и установленного на делянку на стадии трубкования растений. В опытах по влиянию длины фотопериода растения на ранних этапах онтогенеза (до стадии 5-6 листьев) закрывали темными вегетационными сосудами; контрольные растения выращивали на этой же делянке без укрывания.

Уровень мужской фертильности определяли по степени завязываемости семян под изоляторами. При этом растения классифицировали как стерильные (0-2%), полустерильные (<40%, чаще – 10-15%), полуфертильные (40-80%,) и фертильные (>80%).

Для цитологического исследования развития пыльцы метелки фиксировали в ацетоалкоголе (1:3), промывали и хранили в 75% спирте. Для окраски использовали ацетокармин (2%). Давленные препараты из пыльников готовили с использованием смеси 45% уксусной кислоты и 70% хлоралгидрата (1:1), подкрашенной ацетокармином.

Результаты и обсуждение

Результаты анализа гибридных популяций, выращивавшихся параллельно в условиях «засушника» и дополнительного полива, свидетельствуют, что уровень влагообеспеченности растений на этапе формирования генеративной сферы регулирует экспрессию генов-восстановителей на цитоплазме «9E». При этом резкие различия по уровню фертильности наблюдаются, главным образом, у гибридов F_1 и BC_1 (тест-кроссов), в которых гены-восстановители находятся в гетерозиготном состоянии, тогда как в F_2 в большинстве гибридных комбинациях условия влагообеспеченности не оказывают столь резкого влияния на экспрессию генов-восстановителей. Эти данные доказывают, что неканонический характер наследования восстановления фертильности на стерильной цитоплазме «9E» (стабильное наследование при самоопылении гибридов

F₁, но стерильность их тест-кроссов с ЦМС-линиями), по-видимому, обуславливается высокой чувствительностью гетерозиготы Rf^{9E}/rf^{9E} к уровню влагообеспеченности. Гомозигота Rf^{9E}/Rf^{9E} не проявляет такой зависимости, в результате чего самоопыленное потомство гибридов F₁ оказывается фертильным даже в засухе.

Так, в комбинации [9E]Ж-10/КВВ-263 гетерозигота по генам-восстановителям в условиях «засушника», как показывает анализ гибридов F₁, имеет почти полностью стерильный фенотип. Однако в F₂, полученном от полустерильных растений F₁, выращенных при дополнительном поливе, соотношение фертильных и стерильных форм соответствовало доминантному характеру экспрессии генов-восстановителей.

Для объяснения данного явления нами выдвигаются две гипотезы:

(1) Существует эпигенетический механизм, регулирующий взаимодействие аллелей в ядерных локусах, контролирующих восстановление фертильности на цитоплазме 9E, который чувствителен к уровню влагообеспеченности растений. Поскольку, в соответствии с современными данными [6], функциональным аллелем является ген-восстановитель, подавляющий экспрессию митохондриальных генов, вызывающих ЦМС, то, возможно, в условиях засухи ген-восстановитель не способен эффективно функционировать и проявляется как рецессивный, тогда как во влажных условиях – как доминантный. В результате «включения» в F₁ и последующего самоопыления ген-восстановитель переходит в гомозиготное состояние, и такие гомозиготы в F₂ оказываются фертильными даже в условиях засухи;

(2) Возможно, доминантный статус гена-восстановителя обуславливается эпигенетическими изменениями, возникающими в F₁ под действием достаточного режима увлажнения. Этот статус наследуется при самоопылении и проявляется в F₂ и в последующих поколениях при самоопылении, однако в новом гибридном геноме – в F₁ или в BC₁ (тест-кроссе) – он устанавливается *de novo* и только при наличии оптимального уровня влагообеспеченности.

Следует отметить, что даже в условиях дополнительного полива гибриды F₁ [9E]Ж-10/КВВ-263 проявляли значительно более низкий уровень фертильности, нежели [9E]Тх398/КВВ-263. В то же время, различия по уровню фертильности между гибридами [9E]Ж-10/П-1 и [9E]Тх398/П-1 отсутствовали. По видимому, в геноме [9E]Ж-10 имеются дополнительные ядерные гены, участвующие в контроле ЦМС типа «9E», супрессия которых достигается только при скрещивании с линией П-1, но не с линией КВВ-263. Эти данные показывают, что восстановление фертильности у разных ЦМС-линий на цитоплазме «9E» требует разных генов-восстановителей. Данный факт свидетельствует в пользу гипотезы, что в ЦМС типа «9E» стерильный фенотип обуславливается не только цитоплазматическими ЦМС-индуцирующими генами, как у большинства известных типов ЦМС, но и ядерными «плазмон-чувствительными» генами, усиливающими стерилизующий эффект цитоплазмы. В пользу этой гипотезы также свидетельствуют данные о разном характере расщепления в F₂ у гибридов разных ЦМС-линий на цитоплазме «9E» с одной и той же линией-восстановителем фертильности.

Обращает на себя внимание отсутствие выщепления стерильных форм в F₂ в потомстве гибридов F₁ [9E]Тх398/П-1 и в их тест-кроссе с ЦМС-линией [9E]Ж-10 в условиях «влажника», не наблюдающееся в условиях «засушника». Этот факт может быть объяснен большим числом генов-восстановителей у П-1, функционирующих в условиях «влажника» (возможно, «включением» дополнительных генов), при котором для выявления рецессивных гомозигот требуется большая популяция F₂.

Анализ фертильности гибридных популяций F₁ [9E]Пищевое-614/КВВ-34, выращивавшихся на ранних стадиях развития в условиях короткого или длинного светового дня (соответственно, КД и ДД), свидетельствуют о том, что сокращение длины фотопериода на фотопериодически-чувствительной стадии онтогенеза значительно увеличивает число фертильных и снижает число полностью стерильных

растений в F₁. Примечательно, индукция экспрессии генов-восстановителей в F₁ носит наследственный характер и ведет к увеличению доли фертильных растений в F₂, выращивавшемся в условиях естественного освещения (КД→ДД), по сравнению с контролем (потомством гибрида F₁, выращивавшемся в условиях длинного дня, ДД→ДД). Возможно, при коротком фотопериоде происходит активация дополнительных генов-восстановителей, которые, будучи «включенными», функционируют и в условиях длинного фотопериода.

Такая чувствительность генов-восстановителей к длине фотопериода, возможно, связана с тем, что донором этих генов являлся тропический образец, IS12603 – донор цитоплазмы «9E», адаптированный к условиям КД, и для их «включения» необходим некоторый индуктор, преимущественно накапливающийся в условиях КД. Наследование «активного» состояния генов-восстановителей в F₂, выращенном в условиях естественного светового дня, подтверждает гипотезу о существовании эпигенетического механизма, «включающего» гены-восстановители в F₁ при наличии оптимальных условий внешней среды, и наследовании установленного функционального статуса этих генов в самоопыленном потомстве [4].

Цитологический анализ микроспорогенеза показал, что у изученных ЦМС-линий ≈90% микроспор и 95-100% пыльцевых зерен (ПЗ) на стадии, предшествующей миграции вегетативного ядра, имели нормальную морфологию на уровне световой микроскопии. В период гаметогенеза и накопления крахмала возникало множество различных типов нарушений: наблюдались ПЗ с полностью дегенерировавшим содержимым, с задержкой развития на стадии одно- и двуядерного гаметофита, нарушениями в накоплении крахмала. Отдельную группу составляли ПЗ с разъединением интины и экзины, причем на интине развивались элементы поры. Наблюдались ПЗ неправильной формы, но полностью заполненные крахмалом. Тем не менее, 3-9% ПЗ у линии [9E]Ж-10 были внешне нормальными. У линии [9E]Тх398 количество внешне нормальных ПЗ составляло 30%. Спектр аномалий у обеих линий одинаков.

У гибридов F₁ сохранялся спектр аномалий ПЗ, присутствовавших у материнских ЦМС-линий. Вместе с тем, у гибридов F₁ [9E]Ж-10/Перспективное-1 количество фертильных ПЗ значительно возрастало, по сравнению с материнской линией, в отличие от гибридов [9E]Ж-10/КВВ-263. У гибридов F₁ на основе [9E]Тх398 количество полностью окрашенных ПЗ не возрастало, однако завязываемость семян, при наличии генов-восстановителей Перспективного-1 оказалась 100%-ной, а под действием генов-восстановителей КВВ-263 варьировала почти от нуля до 80%. У самой линии КВВ-263, полностью фертильной, уровень фертильных ПЗ составлял 50%.

Выводы

1. «Включение» генов-восстановителей ЦМС-индуцирующей цитоплазмы типа «9E» регулируется условиями окружающей среды: влагообеспеченностью на этапе формирования метелки и коротким световым днем на фотопериодически-чувствительной стадии онтогенеза растений. Такая «активация» носит наследуемый характер и сохраняется в самоопыленном потомстве гибридов F₁.
2. Восстановление фертильности у разных ЦМС-линий на цитоплазме «9E» требует разных генов-восстановителей, поскольку степень стерилизующего эффекта данной цитоплазмы зависит от ядерного генома ЦМС-линии.
3. Изученные гены-восстановители оказывают только частичный эффект на формирование фертильной пыльцы, при этом в геноме [9E]Тх398 они не повышают долю фертильных ПЗ (с «нормальным» фенотипом) (30%), но восстанавливают их оплодотворяющую способность, а в геноме [9E]Ж-10 увеличивают долю «нормальных» ПЗ до уровня [9E]Тх398.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, грант 06-04-49119.

Литература

1. Grant-Downton R.T., Dickinson H.G. Epigenetics and its Implications for Plant Biology. 1. The Epigenetic Network in Plants // *Annals of Botany*.- 2005.- vol. 96.- P.1143-1164.
2. Mikula S. Environmental programming of heritable epigenetic changes in paramutant *r*-gene expression using temperature and light at a specific stage of early development in maize seedlings // *Genetics*.- 1995.- vol. 140.- P.1379-1387.
3. Elkonin L.A., Kozhemyakin V.V., Ishin A.G. Nuclear-cytoplasmic interactions in restoration of male fertility in the '9E' and A4 CMS-inducing cytoplasm of sorghum // *Theor. and Appl. Genet.*- 1998.- vol. 97.- P. 626-632.
4. Elkonin L.A., Kozhemyakin V.V., Ishin A.G. Influence of water availability on fertility restoration of CMS lines with the 'M35', A4 and '9E' CMS-inducing cytoplasm of sorghum // *Plant Breeding*.- 2005.- vol.134.- P.565-571.
5. Elkonin L.A., Kozhemyakin V.V. Cytoplasmic reversions as a possible mechanism of male-fertility restoration in the '9E' CMS-inducing cytoplasm of sorghum // *Intern. Sorghum and Millet Newslett.*- 2000.- № 41.- P. 30-31.
6. Chase C.D., Gabay-Laughnan S. Cytoplasmic male sterility and fertility restoration by nuclear genes. In: H. Daniell, C.D. Chase (eds.) *Molecular biology and biotechnology of plant organelle*. Springer. Netherlands. 2004. P.593-621.

Резюме

Установлено, что экспрессия генов-восстановителей у гибридов F₁ сорго на стерильной цитоплазме «9E» активируется высоким уровнем влагообеспеченности в период развития метелки, а также коротким фотопериодом на ранней стадии онтогенеза растений. Будучи «включенными» гены-восстановители сохраняют активный (доминантный) статус при самоопылении и выращивании в «неиндуктивных» условиях.

Встановлено, що експресія генів-відновників у гібридів F₁ сорго на стерильній цитоплазмі «9E» активується високим рівнем вологозабезпеченості на період розвитку суцвіття, а також коротким фотоперіодом на ранній стадії онтогенезу рослин. «Вмикаючись», гени-відновники зберігають активну (домінантну) позицію при самозапиленні і вирощуванні в «неіндуктивних» умовах.

Expression of fertility restoring genes in the F₁ sorghum hybrids with the '9E' CMS-inducing cytoplasm was shown to be activated by high level of water availability at panicle development or short photoperiod at the early stage of plant development. Being 'switched on' fertility restoring genes maintain their active (dominant) status in self-pollinated progenies grown at 'non-inductive' conditions.

**ЯМСКОВА В.П.¹, СКРИПНИКОВА В.С.², КРАСНОВ М.С.¹, БИТКО С.А.²,
БЕРЕЗИН Б.Б.², ЯМСКОВ И.А.²**

¹Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН,
Россия, 119334, Москва, ул. Вавилова 26, e-mail: embrmsk@mail.ru

²Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН,
Россия, 119991, Москва, ул. Вавилова 28

МОДУЛЯТОРЫ АКТИВНОСТИ РЕГУЛЯТОРНЫХ БЕЛКОВ, ДЕЙСТВУЮЩИХ В МИКРОДОЗАХ

Нами были исследованы регуляторные белки (РБ), выделенные из тканей заднего отдела глаза крупного рогатого скота (сетчатки, пигментного эпителия, стекловидного тела, радужки, цилиарного тела) (Краснов и др., 2003а, б; Скрипникова

и др., 2007). РБ представляют собой низкомолекулярные белки, которые оказывают влияние на основные биологические процессы (адгезия, миграция, дифференцировка, клеток), способствуют поддержанию гистоструктуры ткани при культивировании *in vitro*, увеличивая жизнеспособность клеток. Показано, что РБ взаимодействуют с белками, модулирующими их биологическую активность, и в этом взаимодействии участвуют ионы Ca^{2+} . Методом электрофореза в ПААГ было показано, что белки-модуляторы имеют молекулярную массу 66-70 кДа. На модели органоспецифического культивирования сетчатки и пигментного эпителия в составе заднего отдела глаза тритона было показано, что полученные таким способом фракции РБ сетчатки и пигментного эпителия в микродозах тканеспецифично влияли на клеточную адгезию, жизнеспособность и дифференцировку [Краснов и др., 2003а]. Разработана концепция создания фармакологических препаратов на основе РБ данной группы [Ямсков, Ямскова, 1998].

Материалы и методы

РБ были выделены из различных тканей глаз крупного рогатого скота по разработанной методике. Ткани отдельно экстрагировали в растворе, содержащем 1мМ $CaCl_2$, 0,15М $NaCl$, 1мМ HEPES, при 4-6 °С в течение 2,5-3,0 ч [Краснов и др., 2003б]. Высаливание тканевых экстрактов осуществляли, прибавляя при перемешивании сухой сернокислый аммоний до образования насыщенного раствора соли. После центрифугирования (10000 g, 30 мин) собирали фракции осадков и надосадочных жидкостей – супернатантов, которые длительно диализовали до полного удаления сернокислого аммония, осуществляя многократную смену воды. В отдельном эксперименте после диализа во фракции осадков добавляли ЭДТА (до образования 10^{-2} М раствора) и оставляли на 48 ч при 4 °С, а затем прибавляли сухой сернокислый аммоний до образования насыщенного раствора соли, которые выдерживали в течение 70 ч при 4 °С. После центрифугирования при 105000 об/мин, с помощью пипетки аккуратно собирали флотирующую фракцию, оставшийся раствор сливали и отделяли от осадка. Сернокислый аммоний и ЭДТА удаляли из фракций длительным диализом против дистиллированной воды.

Для обращено-фазовой ВЭЖХ применяли хроматограф Agilent 1100 Series (США), колонка Биохиммак С8-200 (4.6 мм x 150 мм), градиент вода (0,1% ТФА)–ацетонитрил, скорость элюции 0.5мл/мин. Электрофорез в ПААГ проводили по методу Лэммли [Laemmli, 1970]. Western-блоттинг проводили в системе Bio-Rad, используя перенос белков в буфере на PVDF мембрану и проявление с помощью ECL-kit. Для биотестирования фракций РБ использовали ранее разработанный адгезиометрический метод [Ямскова и др., 1978]. Биологическое действие исследуемых РБ в микродозах (10^{-10} - 10^{-12} мг/мл) изучали на моделях органного культивирования заднего отдела глаза тритона *Pl. waltl* (Краснов и др., 2003а,б).

Результаты и обсуждение

Нами было показано, что РБ тканей витреоретинальной области глаза прочно связаны с белками, модулирующими их биологическую активность, и что это взаимодействие опосредовано ионами Ca^{2+} . Об этом свидетельствует тот факт, что при высаливании сернокислым аммонием экстрактов этих тканей, РБ переходят в осадок, и только после обработки ЭДТА растворяются в насыщенном растворе соли. Исследование РБ-содержащих фракций методом электрофореза в ПААГ показало, что комплекс РБ и белков-модуляторов характеризуется значением «кажущейся» молекулярной массы 66-70 кДа. Можно предположить, что обнаруженные во всех фракциях белки с молекулярной массой 66-70 кДа относятся к семейству альбуминов. Методом Western-блоттинга, используя поликлональные антитела к БСА, было выявлено, что белки-модуляторы имеют к ним сродство. В пользу этого предположения свидетельствуют также данные, полученные при обращено-фазовой ВЭЖХ фракций, флотирующихся при 105000 g: время удержания БСА и данных белков-

модуляторов соответствовало 19,0-19,8 мин. Ранее для РБ сыворотки крови также был выявлен белок-модулятор, относящийся к семейству альбуминов (Ямсков и др., 2004). Только при обработке хелатирующим агентом (ЭДТА) и используя обращено-фазовую ВЭЖХ удалось разделить этот комплекс и получить фракции, в которых преобладали РБ (Рис. 1а) и фракции, в которых преобладали белки-модуляторы (Рис. 1б). Обращает на себя внимание присутствие гидрофильной фракции с временем удержания 3,2 мин, которая присутствует во всех изучаемых фракциях и соответствует времени удержания РБ данной группы [Krasnov et al., 2007; Margasyuk et al., 2007; Yamskova et al., 2007].

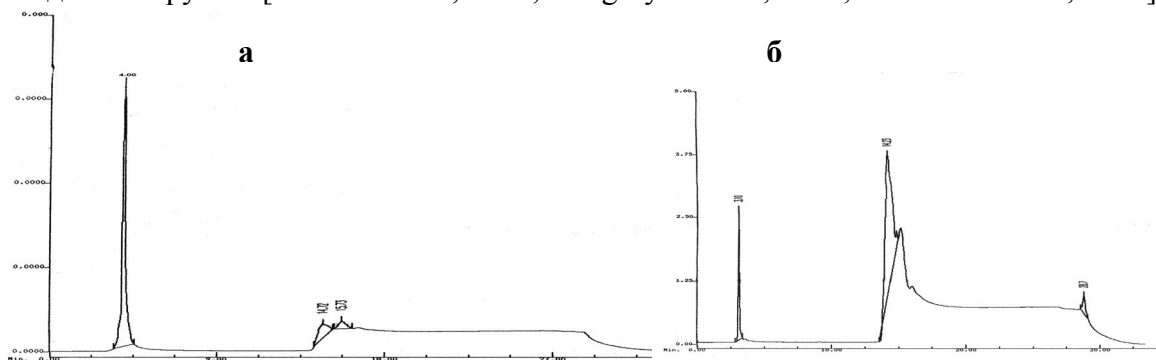


Рис. 1. Обращено-фазовая ВЭЖХ (вода-ацетонитрил): а). комплекс «РБ ПЭ – белок-модулятор» во фракции супернатанта; б). комплекс «РБ ПЭ – белок-модулятор» во фракции, флотирующей при 105000g. По оси абсцисс – время элюции (мин). По оси ординат – детекция при длине волны 280 нм.

Таким образом, результаты этого исследования показывают, что во фракциях осадков, выделенных из экстрактов тканей витреоретинальной области глаза, содержатся комплексы РБ и белков-модуляторов, которые при воздействии Ca^{2+} -хелатирующих агентов и дальнейшем разделении обращено-фазовой ВЭЖХ распадаются на отдельные компоненты, при этом происходит изменение биологической активности РБ. Методом биотестирования было установлено, что мембранотропная активность в микродозах, в основном, соответствует гидрофильным фракциям, содержащим РБ в чистом виде, либо комплексу РБ с белками-модуляторами. Фракции, содержащие только белки-модуляторы, не обладали такой активностью. Для проверки специфической биологической активности РБ, белков-модуляторов и их комплекса нами в условиях *in vitro* был восстановлен комплекс из очищенного методом ВЭЖХ РБ и белка-модулятора в растворе, содержащем ионы Ca^{2+} (Рис. 2).

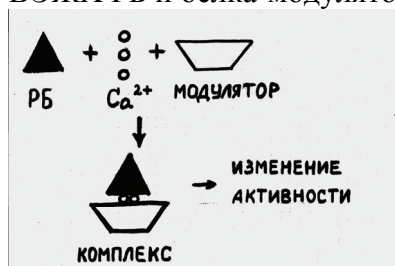


Рис. 2. Восстановление комплекса «РБ - белок-модулятор» в условиях *in vitro* из отдельных высокоочищенных компонентов.

Методом биотестирования было показано, что РБ и комплекс «РБ – белок-модулятор» проявляют различный характер мембранотропного действия. Для тестирования специфической биологической активности была использована модель культивирования тканей заднего отдела глаза тритона. На данной модели были протестированы белки, выделенные из пигментного эпителия. В контроле мы наблюдали изменение состояния клеток пигментного эпителия: нарушалась адгезия в пласте между отдельными клетками, пигмент смещался на апикальную сторону, наблюдали частичную гибель клеток (Рис. 3а). При добавлении в среду культивирования РБ или белка-модулятора соответствующего РБ также наблюдали изменение состояния клеток пигментного эпителия и смещение пигмента в клетках,

правда, в менее выраженной форме, чем в контроле (Рис. 3б,в). Совершенно иную картину наблюдали при добавлении в среду культивирования в микродозах восстановленного комплекса «РБ – белок-модулятор» (Рис. 3г). В данном случае комплекс оказывал выраженное протекторное действие на состояние клеток пигментного эпителия, выражающееся в поддержании адгезивных взаимодействий между клетками и их жизнеспособности, препятствии вымещения пигмента из клеток.

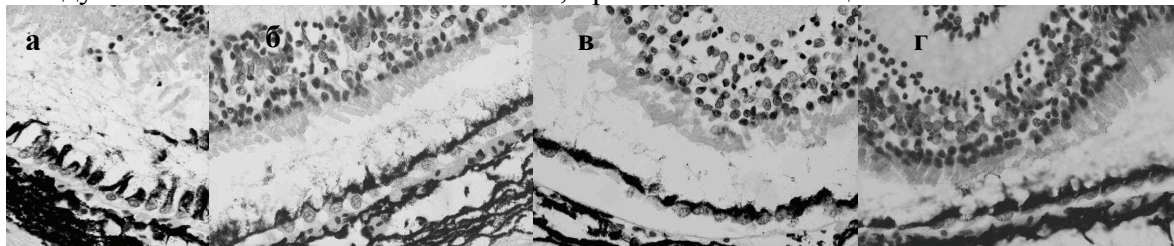


Рис. 3. Культура заднего отдела глаза тритона. а). контроль; б). РБ пигментного эпителия; в). Белок-модулятор для РБ пигментного эпителия; г). комплекс «РБ пигментного эпителия – белок-модулятор».

Таким образом, в данном случае для РБ, выделенных из витреоретинальной области тканей глаза было показано, что только в комплексе с белками-модуляторами они обладают выраженным действием на соответствующие ткани. Эти данные отличаются от данных, полученных для РБ, выделенных из таких тканей глаза, как склера, роговица и хрусталик, где выраженным действием обладают сами РБ, а не комплекс. В тканях заднего отдела глаза, в которых транспорт биологически активных веществ из кровяного русла и в пределах ткани осуществляется, в основном, за счет переноса веществ по межклеточному пространству, эти комплексы, возможно, функционируют не только как биорегуляторы, но играют принципиальную роль в процессах метаболизма и транспорта. Выяснение этого вопроса будет являться предметом наших дальнейших исследований.

Следует отметить, что на основе РБ, выделенных из тканей глаза, разработаны и в настоящее время находятся на стадии клинических испытаний фармакологические препараты нового поколения - глазные капли, предназначенные для лечения таких распространенных глазных заболеваний, как катаракта, повреждения роговицы, миопия, витреоретинальные патологии, дистрофии сетчатки и др.

Выводы

РБ, выделенные из тканей витреоретинальной области глаза, отличались от РБ других тканей глаза способностью образовывать устойчивые комплексы с белками-модуляторами, последние можно отнести к суперсемейству альбуминов. Было показано, что находясь в комплексе изучаемые РБ обладают выраженным действием на соответствующие ткани глаза. При диссоциации комплекса биологическая активность РБ меняется..

Литература

1. *Краснов М.С., Григорян Э.Н., Ямскова В.П.* Модель органотипического культивирования сетчатки вместе с тканями заднего сектора глаза тритона для изучения действия адгезивных гликопротеинов // Изв. Акад. наук. серия биологическая. -2003а N1. -с. 22-36.
2. *Краснов М.С., Григорян Э.Н., Ямскова В.П. и др.* Регуляторные белки тканей глаза позвоночных // Радиционная биология и радиоэкология. -2003б. N3. -с. 265-268.
3. *Краснов М.С., Ямскова В.П., Гурмизов Е.П., Григорян Э.Н., Маргасюк Д.В.* Модели органотипического культивирования тканей глаза in vitro для тестирования регуляторных молекул // Сборник научных трудов III Международной научной конференции “Факторы экспериментальной эволюции организмов”, Алушта (Автономная Республика Крым, Украина), 25-28 сентября. ред. М.В. Роик. К.: -Логос. - 2006. т. 3. -с. 590-595.

4. Ямсков И.А., Ямскова В.П. Фармакологические препараты нового поколения на основе ранее неизвестных биорегуляторов-гликопротеинов клеточного микроокружения // Рос. хим. ж. (ЖРХО им. Д.И. Менделеева). -1998. -Т.42. №3. -с.85-90.
5. Ямскова В.П. Роль ионов кальция в стабилизации адгезионного фактора печени крыс // Биофизика. -1978. -т.23. -с.428-432.
6. Ямскова В.П., Рыбакова Е.Ю., Виноградов А.А., Вечеркин В.В., Ямсков И.А. Исследование белка-инактиватора адгезивного гликопротеина из сыворотки крови млекопитающих.// Прикладная биохимия и микробиология. -2004. -т.40, №4, -с.407-413.
7. Krasnov M.S., Gurmizov E.P., Yamskova V.P., Yamskov I.A. "Analysis of a Regulatory Peptide from the Bovine Eye Lens: Physicochemical Properties and Effect on Cataract Development in vitro and in vivo" pp. 21-33 // In the book "Biochemical Physics Frontal Research", Ed. by S.D. Varfolomeev, E.B. Burlakova, A.A. Popov and G.E. Zaikov, Hauppauge NY, Nova Science Publishers Inc. -2007. -p. 126.
8. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4// Nature. -1970. -V. 227. -P. 680-685.
9. Margasyuk D.V., Krasnov M.S., Blagodatskikh I.V., Grigoryan E.N., Yamskova V.P., Yamskov I.A. "Regulatory Protein from Bovine Cornea: Localization and Biological Activity", pp. 47-59 // In the book "Biochemical Physics Frontal Research", Ed. by S.D. Varfolomeev, E.B. Burlakova, A.A. Popov and G.E. Zaikov, Hauppauge NY, Nova Science Publishers Inc. -2007. -p. 126.
10. Yamskova V.P., Rybakova E.Yu., Vecherkin V.V., Berezin B.B., Filatova A.G. Blagodatskikh I.V. and Yamskov I.A. "Analysis of regulatory proteins from bovine blood serum that display biological activity at ultra low doses: 1. Isolation, purification and physicochemical properties.", pp. 57-67 // In the book "Biochemical Physics Frontal Research", Ed. by Varfolomeev S.D., Burlakova E.B., Popov A.A. and Zaikov G.E., Hauppauge NY, Nova Science Publishers Inc. -2007. -p. 126.

Резюме.

Из тканей витреоретинальной области глаза были выделены РБ, которые образуют комплекс с белками-модуляторами, относящимися к альбуминам. Данный комплекс обладал выраженным биологическим действием в микродозах.

From vitreoretinal tissue of eye have been allocated regulatory proteins which form a complex with the protein-modulators concerning to albumin. The given complex possessed the expressed biological action in microdozes.

ЯЦИШИН В. Ю.^{1,2}, ЩУК О. П.², ВОРОНОВСЬКИЙ А. Я.², ФЕДОРОВИЧ Д. В.^{1,2}, СИБІРНИЙ А. А.²

¹ Львівський національний університет імені Івана Франка,

² Інститут біології клітини НАН України,

Україна, 75005, Львів, вул. Грушевського, 4

e-mail: yatsyshyn.v@gmail.com

УТВОРЕННЯ ФЛАВІНМОНОНУКЛЕОТИДУ РЕКОМБІНАНТНИМИ ШТАМАМИ ДРІЖДЖІВ *CANDIDA FALMATA*, ЩО МІСТЯТЬ ГЕН *FMN1* ПІД ПРОМОТОРОМ *TEF1*

Перетворення рибофлавіну (РФ) до його біологічно активної форми – флавінмононуклеотиду (ФМН) – це АТФ-залежний процес, який здійснює РФ-кіназа (синоніми: флавокіназа, ФМН-синтеаза, АТФ:РФ-5'-фосфотрансфераза) (Е.С. 2.7.1.26). На відміну від ферментів біосинтезу РФ, її синтез не регулюється іонами заліза. Не

зважаючи на те, що існує досить багато природних надсинтетиків РФ, досі не виявлено здатності мікроорганізмів до синтезу значних кількостей ФМН. В той же час, препарати ФМН, отримані ферментативним способом, можуть знайти застосування як лікарські препарати, як реактиви високого ступеня чистоти, а також як компоненти системи біоломінесцентного аналізу.

Попри високу активність РФ-кінази, порівняно з іншими ферментами синтезу флавінів, у клітинах та культуральній рідині флавіногенних дріжджів *Candida famata* нагромаджуються лише слідові кількості вільного ФМН. Причини такого явища невідомі і пов'язуються з дією фосфатаз [4]. Раніше ми показали, що заміна нативного промотора гену *FMNI* (кодує РФ-кіназу) дріжджів *Debaryomyces hansenii* на сильний, конститутивний промотор *TEF1* *C. famata* дає можливість отримати рекомбінантні штами дріжджів із підвищеною активністю РФ-кінази, які здатні виділяти ФМН у середовище [1]. Однак, попри високу активність РФ-кінази, крім ФМН, в культуральній рідині виявлено значні кількості РФ. Дана робота присвячена пошуку причин нагромадження РФ та умов, які б забезпечили максимальну продукцію ФМН такими штамми.

Матеріали та методи

У роботі використовували отримані нами раніше рекомбінантні штами дріжджів *Candida famata*, що містять ген *FMNI* *D. hansenii* під контролем промотора *TEF1* *C. famata*. Схема конструювання плазмід з геном *FMNI* під контролем промотора *TEF1* та отримання трансформантів описані в [1].

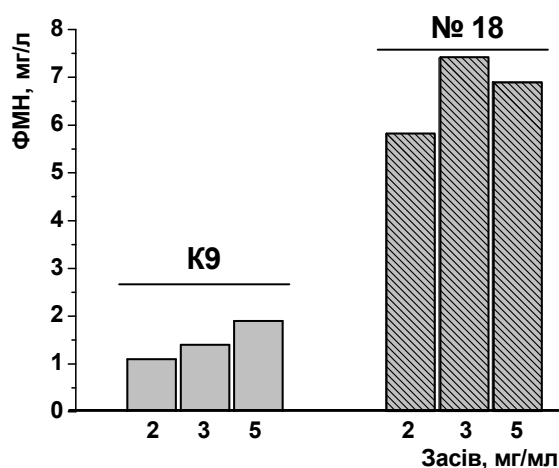
Дріжджі вирощували при 30⁰С у багатому середовищі YPD (дріжджовий екстракт, 0,5%; пептон, 1%; глюкоза, 2%), та мінімальному середовищі Беркгольдера [5].

Вміст флавінів у культуральній рідині визначали флуориметрично на флуорометрі ЕФ-3М після хроматографічного розділення, з використанням синтетичного РФ як стандарту [6]. Безклітинні екстракти отримували шляхом руйнування суспензії клітин в гомогенізаторі для клітин і бактерій Л-17 скляними кульками. Діаліз проводили проти фосфатного буферу при 4⁰С протягом 12 год., вміст білка у зразках визначали за Лоурі [7]. Визначення активності РФ-кінази проводили за [1], лужної фосфатази за [4], кислої фосфатази за [3]. За одиницю активності фермента [U] приймали його кількість, яка забезпечує синтез 1 мкмоль продукту реакції за 1 хв.

Дані представлено як середнє ± похибка середнього ($M \pm m$). Статистичну обробку здійснювали з використанням коефіцієнта Ст'юдента. Математичне опрацювання результатів виконували за допомогою програмного пакета Microsoft Office Excel 2003.

Результати та обговорення

Введення гену *FMNI* *D. hansenii* під контролем сильного конститутивного промотора *TEF1* *C. famata* в геном флавіногенних дріжджів *C. famata* призводило до 6-7-кратного підвищення активності РФ-кінази [1]. У таких штамів вміст ФМН у культуральній рідині за умов вирощування протягом 3 діб у рідкому синтетичному середовищі (СБ) був вищим, ніж у контрольних в 5-6 разів, при цьому частка ФМН від



загального вмісту флавінів становила біля 30%. Для оптимізації умов нагромадження ФМН було використано інкубацію клітин. Продукція ФМН суттєво залежала від кількості інкубованих клітин. Виявилось, що найкращий вихід ФМН спостерігається при засіві 3мг/мл клітин (рис.1), а подальше підвищення їх кількості знижує ефективність синтезу ФМН, можливо внаслідок дефіциту поживних речовин. На відміну від штаму дикого типу L20105 та контрольного штаму K9 (трансформованого плазмідом, що не містила гена *FMNI*), у яких нагромадження ФМН було однаково низьким, незалежно від кількості інкубованих клітин та часу їх інкубації, усі рекомбінантні штами, що містили ген *FMNI* під контролем промотора *TEF1*, характеризувалися суттєвим підвищенням синтезу ФМН на 17-20 год. інкубації. Подальша інкубація клітин не приводила до зростання кількості ФМН в культурі.

Рис.1. Вміст ФМН у культуральній рідині трансформанта №18 та контрольного штаму K9 у залежності від густини засіву

Використовуючи короткочасну інкубацію 3 мг клітин, досліджено активність РФ-кінази та флавіногенну активність рекомбінантних штамів *S. famata*, що містять ген *FMNI* під контролем *TEF1* промотора. Виявилось (табл.), що аналізовані рекомбінантні штами характеризуються вищою в 4-6 разів активністю РФ-кінази, в порівнянні з контрольними штамми L20105 і K9. За сумарною кількістю флавінів у культуральній рідині трансформанти практично не відрізнялися від контрольних штамів, проте нагромаджували до 4,4 мг/л ФМН (в 7 разів більше, ніж вихідний штам). Відсотковий вміст ФМН становив 24-33% у трансформантів та 7% у контрольного та вихідного штамів.

Незважаючи на суттєве підвищення активності РФ-кінази та зростання вмісту ФМН при короткотривалій інкубації клітин рекомбінантних штамів, його кількість була незначною, а РФ складав понад 60% загального вмісту флавінів. Було висловлено припущення про можливість гідролізу синтезованого ФМН неспецифічними клітинними фосфатазами.

Таблиця

Активність РФ-кінази та рівень флавіногенезу в рекомбінантних штамів *S. famata*, що містять ген *FMNI* під контролем *TEF1* промотора

Штам	Активність РФ-кінази, мкмоль х 10^{-5} / хв х мг білка *	Флавіни культуральної рідини, мг/л		
		ФМН **	Сумарна кількість флавінів **	% ФМН
L20105	7,38±0,51	0,6±0,02	8,8±0,90	7
K9	11,07±1,02	0,9±0,07	13,0±1,25	7
трансформант 3	48,38±4,44	2,4±0,11	10,0±0,98	24
трансформант 9	48,79±3,92	4,4±0,39	13,3±1,45	33
трансформант 18	43,05±4,50	4,1±0,37	13,9±1,11	30
трансформант 33	46,74±4,53	2,7±0,30	9,7±1,00	27

Вірогідно відрізняється від відповідних контрольних значень із $p < 0,05$ (*) та $p < 0,025$ (**)

Для дріжджів *Pichia guilliermondii* було показано, що активність фосфатаз, здатних до гідролізу ФМН, інгібується іонами Be^{2+} , F^- , їх сумішшю, а також Ca^{2+} [2, 3]. Інкубація клітин рекомбінантних штамів *S. famata* в середовищі з різними концентраціями $BeSO_4$, NaF та $CaCl_2$ призвела до зростання вмісту ФМН у

культуральній рідині на 12-25% (рис.2). Оптимальною для нагромадження ФМН концентрацією NaF виявилась 0,2 мМ (на 15% більше ФМН), а суміші – 0,2 мМ NaF і 0,5 мМ BeSO₄ (на 23% більше ФМН). Цікаво, що лише одночасне додавання іонів берилію та фториду призводить до зростання продукції ФМН, при цьому додавання лише іонів берилію пригнічує утворення ФМН інкубованими клітинами на 16%. За підвищення у середовищі інкубації вмісту CaCl₂ продукція ФМН зростала на 12%. Приведені дані свідчать, що гідроліз ФМН є однією із причин нагромадження в культуральній рідині, крім ФМН, РФ. Однак токсичність цих інгібіторів виключає застосування їх у процесі ферментації з метою отримання препаратів ФМН.

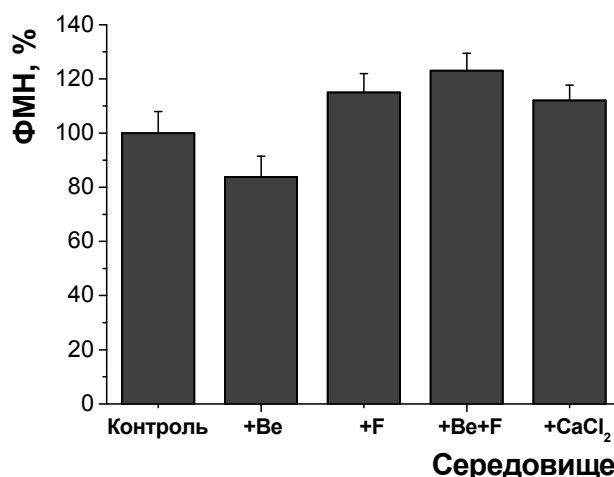


Рис. 2. Вміст ФМН у культуральній рідині штамів *C. famata*, що містять ген *FMN1* під контролем промотора *TEF1*, при інкубації в середовищі з інгібіторами фосфатаз

Цікавою виявилася спроба пригнічення активності фосфатаз шляхом внесення в середовище інкубації підвищених кількостей фосфату калію. Активність кислої фосфатази інгібувалась фосфатом на 18-20%, проте активність лужної фосфатази під впливом KН₂РO₄ зростала на 25%, однак вона є малоактивною в середовищі інкубації дріжджів, рН якого є нижчим 5. За таких умов вміст ФМН у культуральній рідині зростав у 2,5 рази. Таким чином, продукцію ФМН можна регулювати шляхом зміни компонентів середовища.

Наведені результати свідчать про те, що генно-інженерне конструювання штамів із високим рівнем експресії гену *FMN1* є перспективним для створення дріжджових надсинтетиків цього нуклеотиду. Подальші зусилля повинні бути спрямовані на забезпечення РФ-кінази субстратом – РФ, а також делеції генів, які відповідають за гідроліз ФМН.

Література

1. Ішук О.П., Яцишин В.Ю., Дмитрук К.В., Вороновський А.Я., Федорович Д.В., Сибірний А.А. Генно-інженерне конструювання штамів флавіногенних дріжджів *Candida famata* з високою активністю рибофлавінкінази // Укр. біохім. журнал. – 2006. – Т. 78, № 5. – С.53-59.
2. Сибірний А.А., Шавловський Г.М. Об ингибировании щелочной фосфатазы I дрожжей *Pichia guilliermondi* *in vitro* и *in vivo* // Укр. биохим. журн. – 1978. – Т. 50, № 2. – С. 212-218.
3. Струговицкова Л.П., Федорович І.П., Сенюта Е.З., Шавловський Г.М. Дослідження кислої фосфатази II дріжджів *Pichia guilliermondi* // Укр. біохім. журн. – 1976. – Т. 48, № 3. – С. 320-324.

4. Струговщицова Л.П., Шавловський Г.М., Федорович І.П., Кучерас Р.В. Очищення та деякі властивості лужної фосфатази І дріжджів *Pichia guilliermondii* // Укр. біохім. журн. – 1973. – Т. 45, № 3. – С. 312-317.

5. Шавловский Г.М., Жарова В.П., Щелокова И.Ф., Трач В.М., Сибирный А.А., Кшеминская Г.П. Флавиногенная активность природных штаммов дрожжей *Pichia guilliermondii* // Прикл. биохимия и микробиология. – 1978. – Т.14. – С. 184-189.

6. Bessey O.A., Lowry J.Y., Love R.H.J. The fluorometric measurement of the nucleotides of riboflavin and their concentration in tissues // J. Biol. Chem. – 1949. – Vol. 180, N 2. – P. 378-381.

7. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. and Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. – 1951. – Vol. 193. – P. 265-275.

Резюме

Досліджено флавіногенну активність рекомбінантних штамів дріжджів *Candida famata*, що містять ген РФ-кінази *FMN1* під контролем сильного конститутивного промотора *TEF1*. Оптимізовано умови нагромадження ФМН у культуральній рідині.

Изучена флавиногенная активность рекомбинантных штаммов дрожжей *Candida famata*, содержащих ген РФ-киназы *FMN1* под контролем сильного конститутивного промотора *TEF1*. Оптимизированы условия накопления ФМН в культуральной жидкости.

The flavinogenic activity of recombinant strains of the yeast *Candida famata* that express the *FMN1* gene encoding riboflavin kinase under control of the strong constitutive *TEF1* promoter was studied. Conditions for flavinmononucleotide production were optimized.

LYPOVA N.M., SINDAROVSKA Y.R., GERASYMENKO I.M., SHELUDKO Y.V., BANNIKOVA M.A., KUCHUK N.V.

*Institute of Cell Biology and Genetic Engineering NAS of Ukraine,
Zabolotnogo str. 148, Kiev 03680, Ukraine, e-mail: ysheludko@ukr.net*

COMPARISON OF DIFFERENT SYSTEMS FOR PURIFICATION OF RECOMBINANT PROTEINS PRODUCED BY TRANSIENT EXPRESSION IN PLANTS

Plants as source of recombinant proteins have important advantages over microbial or animal cell systems. Plant cells, unlike bacteria, are able to produce proteins with post-translational modifications, as well as correctly folded and assembled multimeric proteins, e. g. antibodies [1]. In contrast to animal cells, plants are free from human pathogens like viruses and prions, so the recombinant proteins of plant origin are considered to be safer [2]. The main obstacle on the way of using transgenic plants for high-scale production of recombinant proteins is the low level of foreign gene expression in case of stable integration into plant nuclear genome (usually about 0.1-0.5 % TSP) [3]. Transient gene expression may allow for rapid accumulation of considerably larger amount of recombinant proteins (in the range 0.5-10 % TSP or sometimes more) [4], but even in this case an efficient purification system can substantially improve the yield of pure target product.

Here we describe comparative analysis of different approaches for purification of transiently expressed recombinant proteins from plants using green fluorescent protein (GFP) as a reporter. The purification scheme including ammonium sulfate precipitation and anion-exchange chromatography was compared with two tag-based protocols applying metal affinity chromatography with a 6xHis tag (Qiagen) and intein mediated purification with a chitin-binding affinity tag (New England Biolab).

Materials and methods

For transient expression we used a 35S expression system carrying the GFP gene driven by the CaMV 35S promoter (pICH5290) and a viral-based expression system (pICH10881, pICH10570 and pICH7410) carrying the same reporter gene described in details in the recent publications [5-7]). In all experiment p19 protein of *Tomato bushy stunt virus*, a suppressor of post-transcriptional gene silencing, was co-expressed (pICH6692) [8]. For tag-based purification, either the sequence coding for six histidine residues or the fragment encoding intein and chitin-binding domain (derived from the pTYB1 plasmid, New England Biolabs) was fused to the GFP gene immediately before the stop-codon.

Infiltration of *Nicotiana excelsior* plants with *Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101 and transient expression was performed as it was described [7]. Leaf tissue was extracted with 100 mM KPi buffer, pH 7.8, containing 5 mM EDTA and 10 mM β -mercaptoethanol. The protein fraction precipitated between 50 % and 70 % of ammonium sulfate saturation was separated by anion-exchange chromatography on Q-sepharose with a linear NaCl gradient (0-1 M NaCl) [9]. For purification of the His-tagged GFP, the leaf extracts (prepared in 50 mM Tris/HCl buffer, pH 8.0, containing 300 mM NaCl, 10 mM imidazole, 10 mM β -mercaptoethanol, and 2.5 % PVP) were applied onto Ni-NTA sorbent, the column was washed with extraction buffer and the target protein was eluted with the same buffer containing 250 mM imidazole. For intein-mediated purification, the leaf extracts (prepared in 100 mM KPi buffer, pH 7.8, containing 5 mM EDTA, 10 mM β -mercaptoethanol, and 2.5 % PVP) were applied onto chitin sorbent, the column was washed with extraction buffer and the target protein was eluted after intein cleavage induced by 50 mM dithiothreitol (DTT).

The content of GFP was calculated by measurements of fluorescence intensity in dilutions of leaf extracts using fluorescence spectrophotometer Hitachi 4000 (Hitachi, Tokyo, Japan) (excitation at 395 nm, emission at 509 nm) on the basis of standard values. The background fluorescence of control extracts (from leaves infiltrated with bacteria carrying pICH6692 only) was subtracted from values of GFP containing extracts. The identity of GFP in the extracts to the standard was proved by recording their fluorescence spectra. The concentration of total soluble protein was determined by the method of Bradford. The protein mixtures were analyzed by SDS-PAGE with Coomassie staining.

Results and discussion

N. excelsior was used in our experiments because it was shown to be a promising host for production of recombinant proteins by means of *Agrobacterium*-mediated transient expression [7]. The GFP gene was expressed under control of CaMV 35S promoter or as a part of a module viral-based system which allows considerable increase of the reporter protein accumulation [5, 6]. However, in order to confirm that the effectiveness of the purification scheme does not depend on high initial recombinant protein level we performed transient expression under conditions which were not optimal for the maximal GFP accumulation (plant developmental stage and cultivation temperature [9]). GFP content in the crude protein extract amounted to 3.3 % TSP. The crude protein extract from infiltrated leaf tissue was subjected to ammonium sulfate precipitation followed by Q-sepharose anion-exchange chromatography. The concentration of GFP in fractions during purification procedure was estimated by measurements of fluorescence intensity. The developed scheme of enrichment resulted in 26-fold purification of the recombinant GFP. GFP was recovered in high yield (77 %) with about 85 % purity. The described purification procedure was performed in gentle environment conditions and, although some optimization may be required, we consider this scheme may be regarded as a benchmark for purifying of GFP-fusion proteins as well as GFP.

After cloning from the jellyfish *Aequorea victoria* the GFP gene has undergone substantial modifications that resulted in high expression rate, increased fluorescence, stability and low toxicity for wide range of hosts, including plant cells [10]. Such modifications are not always desirable for pharmaceutically valuable proteins, thus their level

of accumulation in plants is often considerably lower than that of GFP. It renders classical purification schemes ineffective. Adding of affinity tags to the protein of interest simplifies the purification procedure and improves the yield of the refined recombinant protein. Proteins tagged with 6 consecutive histidine residues can be efficiently purified using nickel-nitrilotriacetic acid (Ni-NTA) metal-affinity chromatography matrix (Qiagen).

The GFP gene with additional sequence coding for six histidine residues was successfully transiently expressed in *N. excelsior* under control of CaMV 35S promoter. The level of His-tagged GFP reached 5.5 % TSP, which is normal mean for such kind of expression system [7]. One-stage purification procedure resulted in obtaining of homogenous target protein (Fig. 1), although the yield of GFP was about 40 %. The effectiveness of His-tag-mediated purification was shown for many recombinant proteins in different host systems, but for production of pharmaceutically valuable proteins in plants this method has some drawbacks. The protease cleavage of His-tag, which is necessary for obtaining of native product, is an expensive procedure. In addition, some plant proteins containing histidine residues can interact with Ni-NTA matrix and pollute the target product. To overcome these problems, other affinity tag-based systems may be used.

IMPACT (Intein Mediated Purification with an Affinity Chitin-binding Tag, New England Biolabs) is a protein purification system which utilizes the inducible self-cleavage activity of a protein splicing element (intein) to separate the target protein from the affinity tag (chitin-binding domain). It allows purifying in a single chromatographic step without further protease cleavage a native recombinant protein. The drawback of this system is the lower level of fused protein expression, presumably due to the big size of the tag. The GFP gene with additional sequence coding for intein and chitin-binding domain was transiently expressed in *N. excelsior* under control of CaMV 35S promoter. Although starting with comparatively low accumulation level (about 1 % TSP), we were able to obtain homogenous native GFP after one-step purification procedure (data not shown). Although further studies are necessary for optimization of the expression protocol, we can conclude that IMPACT system may be useful for purification of recombinant pharmaceutically valuable proteins transiently expressed in plants in low amounts.

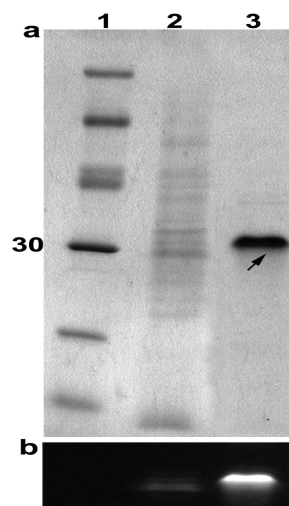
Conclusions

All three tested purification systems can be applied for obtaining of refined recombinant GFP from plant tissues. After optimization they can be considered for purification of other recombinant proteins produced in plants by means of *Agrobacterium*-mediated transient expression.

References

1. Stoger E., Sack M., Fischer R., Christou P. Plantibodies: applications, advantages and

Figure 1. GFP-6xHis SDS-PAGE analyses: a) Coomassie staining of proteins (all samples except of marker without prior heat denaturation); 1 - molecular weight marker proteins, 2 – crude protein extract of *N. excelsior* infiltrated with GFP-6xHis; 3 – Ni-NTA purified protein; GFP is indicated with arrow b) GFP fluorescence in protein extracts without prior heat denaturation (under UV-light).



- bottlenecks. // *Curr. Opin. Biotechnol.* – 2002. – Vol. 13. – P. 161-166.
2. Larrick J.W., Thomas D.W. Producing proteins in transgenic plants and animals. // *Curr. Opin. Biotechnol.* – 2001. – Vol. 12. – P. 411-418.
 3. Daniell H., Streatfield S.J., Wycoff K. Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants. // *Trends in Plant Sci.* – 2001. – Vol. 6. – P. 219–226.
 4. Gleba Y., Klimyuk V., Marillonnet S. Magniflection – a new platform for expressing recombinant vaccines in plants. // *Vaccine.* – 2005. – Vol. 23. – P. 2042–2048.
 5. Marillonnet S., Giritch A., Gils M., Kanzia R., Klimyuk V., Gleba Y. In planta engineering of viral RNA replicons: efficient assembly by recombination of DNA modules delivered by *Agrobacterium*. // *PNAS.* – 2004. – №101. – P. 6852–6857.
 6. Marillonnet S., Thoeringer C., Kandzia R., Klimyuk V., Gleba Y. Systemic *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transfection of viral replicons for efficient transient expression in plants. // *Nat. Biotechnol.* – 2005. – Vol. 23. – P. 718–723.
 7. Sheludko Y. V., Sindarovska Y. R., Gerasymenko I. M., Bannikova M. A., Kuchuk N. V. Comparison of several *Nicotiana* species as hosts for high-scale *Agrobacterium*-mediated transient expression. // *Biotechnol. Bioeng.* – 2007. – Vol. 96. – P. 608-614.
 8. Voinnet O., Rivas S., Mestre P., Baulcombe D. An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. // *Plant J.* – 2003. – Vol. 33. – P. 949–956.
 9. Sindarovska Y. R., Sheludko Y. V., Gerasymenko I. M., Bannikova M. A., Kuchuk N. V. Purification of recombinant GFP produced by *Agrobacterium*-mediated transient expression in *Nicotiana excelsior*. // *Cytology and Genetics.* – Vol. 42 (N2). – (in press).
 10. Chiu W., Niwa Y., Zeng W., Hirano T., Kobayashi H., Sheen J. Engineered GFP as a vital reporter in plants. // *Curr. Biol.* – 1996. – Vol. 6. – P. 325–330.

Summary

Three different approaches for purification of transiently expressed recombinant proteins from plants using GFP as a reporter have been successfully applied. The purification scheme including ammonium sulfate precipitation and anion-exchange chromatography was compared with two tag-based protocols applying metal affinity chromatography with a 6xHis tag and intein mediated purification with a chitin-binding affinity tag.

Три різних підходи для очистки рекомбінантних білків, отриманих методом транз'єнтної експресії в рослинах, були успішно применені з використанням GFP як репортера. Схему очистки, включающую преципітацію сульфатом амонію і аніонообмінну хроматографію, порівнювали з протоколами тегової очистки з використанням 6xHis-тега і хітин-інтеїн-опосередованої очистки.

Три різних підходи для очищення рекомбінантних білків, отриманих методом транз'єнтної експресії в рослинах, було успішно застосовано з використанням GFP як репортера. Схему очищення, яка включала преципітацію сульфатом амонію і аніонообмінну хроматографію, порівнювали з протоколами тегового очищення з використанням 6xHis-тега та хітин-інтеїн-опосередкованого очищення.

АНАЛІЗ І ОЦІНКА ГЕНЕТИЧНИХ РЕСУРСІВ

АДАМОВСКАЯ В.Г., МОЛОДЧЕНКОВА О.О., САГАЙДАК Т.В., ВОЛЧЕВСКАЯ А.В., ТИХОНОВА О.В. НЕКОТОРЫЕ БИОХИМИЧЕСКИЕ КОМПОНЕНТЫ ФОРМИРОВАНИЯ ПРИОБРЕТЕННОГО ИММУНИТЕТА В ОТВЕТЕ ЗЛАКОВЫХ КУЛЬТУР ПРИ ГРИБНЫХ БОЛЕЗНЯХ	3
АЛЕКСЕЙЧЕНКО Н. А. ПОЛИМОРФИЗМ ГРУШИ ЛОХОЛИСТНОЙ В РАЗЛИЧНЫХ ЧАСТЯХ ЕСТЕСТВЕННОГО АРЕАЛА	6
АНТОНОВА С.П., КІРКОВСЬКА О.П., КОРНЄЄВА М.О., ФАЛАТЮК Л.В. КОМБІНАЦІЙНА ЗДАТНІСТЬ СЕЛЕКЦІЙНИХ МАТЕРІАЛІВ ЦУКРОВИХ БУРЯКІВ ЗА ТЕХНОЛОГІЧНИМИ ЯКОСТЯМИ	9
БАЗАЛІЙ В.В., БАЗАЛІЙ Г.Г., ЛАРЧЕНКО О.В. ЕКОЛОГІЧНА ПЛАСТИЧНІСТЬ І СТАБІЛЬНІСТЬ УРОЖАЙНОСТІ СОРТІВ ПШЕНИЦІ З РІЗНИМ ТИПОМ РОЗВИТКУ	14
ВАКУЛЕНКО П.І., КОРНЄЄВА М.О. ХАРАКТЕРИСТИКА КРАЩИХ МАТЕРИНСЬКИХ КОМПОНЕНТІВ ЦУКРОВИХ БУРЯКІВ ЗА КОМПЛЕКСОМ ГОСПОДАРСЬКО-ЦІННИХ ОЗНАК	18
ВЛАСЕНКО В.А., КОЧМАРСЬКИЙ В.С., КОЛОМІЄЦЬ Л.А., МАРИНКА С.М. ПІДВИЩЕННЯ ПРОДУКТИВНОГО І АДАПТИВНОГО ПОТЕНЦІАЛІВ ПШЕНИЦІ М'ЯКОЇ ОЗИМОЇ	21
ГОЛИК Л.М. ВИСОКОАДАПТИВНІ СОРТИ ОЗИМОЇ ПШЕНИЦІ, СТВОРЕНІ З ВИКОРИСТАННЯМ ТЕРМІЧНОГО МУТАГЕНЕЗУ	25
ГОЛУБ Ю.В., СЕЧНЯК А.Л., ВАСИЛЬЄВ А.А. РЕАКЦІЯ НА МУЧНИСТУЮ РОСУ І БУРУЮ РЖАВЧИНУ У ГІБРИДОВ АЛЛОПЛАЗМАТИЧЕСКИХ ПШЕНИЦ	28
ГОРОВА Т.К., СЕРГІЄНКО О.Ф., БАРСУКОВА В.Є. СТЕРИЛЬНІ ЛІНІЇ – ДЖЕРЕЛА ДЛЯ СОРТОВОЇ СЕЛЕКЦІЇ МОРКВИ	32
ЗВЯГІН А.Ф., ЄЛЬНІКОВ М.І., ГРІДІН М.М. СЕЛЕКЦІЙНА ЦІННІСТЬ ВИХІДНОГО МАТЕРІАЛУ М'ЯКОЇ ОЗИМОЇ ПШЕНИЦІ ВІД СХРЕЩУВАННЯ СОРТІВ РІЗНОГО АДАПТИВНОГО ПОТЕНЦІАЛУ	36
КВИТКО О.В., МУРАТОВА Е.Н., БАЖИНА Е.В. КАРИОТИПИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ПИХТЫ СИБИРСКОЙ В СРЕДНЕЙ СИБИРИ	39
КИРИЛЕНКО В.В., ГУМЕНЮК О.В., БАСАНЕЦЬ Г.С., КУПЦОВ С.В., ХОМЕНКО С.О. ХАРАКТЕРИСТИКА НОВОСТВОРОНОГО МАТЕРІАЛУ ПШЕНИЦІ М'ЯКОЇ ОЗИМОЇ НА ПОЛПШЕННЯ ПОКАЗНИКІВ АДАПТИВНОСТІ У ЛІСОСТЕПУ	43
КИСЛОВА Е.А. РАДИОБИОЛОГИЧЕСКАЯ РЕАКЦИЯ ПРОРОСТКОВ ОЗИМОГО РАПСА	47
КОНДРАЦКАЯ И.П., СТОЛЕПЧЕНКО В.А., ФОМЕНКО И.И., ШИШЛОВА А.М. БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ПОЛИМОРФИЗМА ЛЕГКОРАСТВОРИМЫХ БЕЛКОВ ПРИ МАРКИРОВАНИИ ХОЗЯЙСТВЕННО-ЦЕННЫХ ПРИЗНАКОВ МЕЖРОДОВЫХ ГИБРИДОВ ОВСЯНИЦЫ ЛУГОВОЙ И ОВСЯНИЦЫ ТРОСТНИКОВОЙ	49
КОРЗИН В.В. СТЕПЕНЬ САМОФЕРТИЛЬНОСТИ ИНТРОДУЦИРОВАННЫХ НА ЮЖНЫЙ БЕРЕГ КРЫМА СОРТОВ И ФОРМ АБРИКОСА	53
КОРНЄЄВА М.О., МАЗУР З.О., РАДЧЕНКО В.П. АДАПТАЦІЙНА ЗДАТНІСТЬ ГІБРИДІВ ОЗИМОГО ЖИТА, СТВОРЕНИХ НА ОСНОВІ ЦИТОПЛАЗМАТИЧНОЇ ЧОЛОВІЧОЇ СТЕРИЛЬНОСТІ	57
КОСЕНКО І.С., ОПАЛКО О.А., ГОРОБЕЦЬ Н.В.	

НЕМОРФОГЕННА РЕГЕНЕРАЦІЙНА ЗДАТНІСТЬ ПРЕДСТАВНИКІВ РОДУ <i>CORYLUS</i> L	61
КРЕМЕНЧУЦКИЙ Г.Н., ШАРУН О.В., ЮРГЕЛЬ Л.Г., КОНДРАТЬЕВ Ю.А., СТЕПАНСКИЙ Д.А., БОНДАРЬ В.А., СЕМЕНОВА С.Н., КОШЕВАЯ И.П. МОРФО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ H ₂ O ₂ - ОТРИЦАТЕЛЬНЫХ АЭРОКОККОВ	64
КРИВОШЕЄВА Л.М., ЛОГІНОВ М.І. ГЕНЕТИЧНІ РЕСУРСИ РОСЛИН ЛЬОНУ ІНСТИТУТУ ЛУБ'ЯНИХ КУЛЬТУР УААН	68
КУЗЬМИН С.Р., КУЗЬМИНА Н.А. ПЛОТНОСТЬ УСТЬИЦ У СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ РАЗНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ В ГЕОГРАФИЧЕСКИХ КУЛЬТУРАХ ПРИАНГАРЬЯ	72
КУРЧИЙ В.М., САКАЛО В.Д., ТОПЧИЙ Н.Н., ТИЩЕНКО Е.Н. ВЛИЯНИЕ 6-БЕНЗИЛАМИНОПУРИНА И ЗЕАТИНА НА МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ В СТАРЕЮЩИХ ЛИСТЬЯХ САХАРНОЙ СВЕКЛЫ	76
ЛАВРИНЕНКО Ю.О. ОЦІНКА СЕРЕДОВИЩА, ЯК ФОНУ ДЛЯ ДОБОРУ ГІБРИДІВ КУКУРУДЗИ	80
МАЙОР П.С., ЗАХАРОВА В.П., ВЕЛИКОЖОН Л.Г. ЗМІНА ВМІСТУ ПЕРОКСИДУ ВОДНЮ ТА АКТИВНОСТІ СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗИ І КАТАЛАЗИ У РОСЛИНАХ РІЗНИХ СОРТІВ ОЗИМОЇ ПШЕНИЦІ ПРИ ЗАГАРТУВАННІ	83
МАМЕДОВА А.Д., МАМЕДОВА Н.Х., ГАСАНОВА Г.И. РЕЗУЛЬТАТЫ ИЗУЧЕНИЯ СТЕПЕНИ УСТОЙЧИВОСТИ СОРТОВ ХЛОПЧАТНИКА ВИДА <i>G.hirsutum</i> l. К БИОТИЧЕСКИМ И АБИОТИЧЕСКИМ ФАКТОРАМ СРЕДЫ	88
МАРКОВА О.А. РЕПРОДУКТИВНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ ВОЛНИСТЫХ ПОПУГАЙЧИКОВ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ДЛЯ РАЗМНОЖЕНИЯ ОСОБЕЙ, МУТАНТНЫХ ПО РЕДКИМ ГЕНАМ ОКРАСКИ ОПЕРЕНИЯ	90
МЩЕНКО С.В., ВИРОВЕЦЬ В.Г., ЛАЙКО І.М., КИРИЧЕНКО Г.І., ОНУПРІЄНКО Л.Г. ОЦІНКА ПЕРСПЕКТИВНИХ СОРТІВ КОНОПЕЛЬ ЗА ОСОБЛИВОСТЯМИ ЦВІТІННЯ.....	94
МОЛОДЧЕНКОВА О.О., АДАМОВСЬКА В.Г., ЛИТВИНЕНКО М.А., ЦІСЕЛЬСЬКА Л.Й., СОЛОМОНОВ Р.В., БЕЗКРОВНА Л.Я. ВЗАЄМОЗВ'ЯЗОК МІЖ БІЛКОВО-ФЕРМЕНТНИМ КОМПЛЕКСОМ ОЗИМОЇ ПШЕНИЦІ ТА СТІЙКІСТЮ ДО ФУЗАРІОЗУ	98
МОРГУН В.В., ШАДЧИНА Т.М., ДМИТРИЕВА В.В., ПРЯДКИНА Г.А. ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПОГЛОЩЕНИЯ И УТИЛИЗАЦИИ АЗОТА У ВЫСОКОУРОЖАЙНЫХ СОРТОВ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ УКРАИНСКОЙ СЕЛЕКЦИИ... 102	102
ПАЛАЧОВ С.В., ПРОСКУРНІН М.В. ВИКОРИСТАННЯ ГАММА-ПРОМЕНІВ ПРИ СТВОРЕННІ ЛІНІЙ ЯРОГО ЯЧМЕНЮ З ПІДВИЩЕНИМ РІВНЕМ ЗАГАЛЬНОЇ АДАПТИВНОСТІ	107
ПОЛЬСКАЯ П.И. МЕТОДОЛОГИЯ ВЫВЕДЕНИЯ АСКАНИЙСКОЙ МЯСО-ШЕРСТНОЙ ПОРОДЫ ОВЕЦ С КРОССБРЕДНОЙ ШЕРСТЬЮ	111
ПОЛЯКОВА Л.В., ЖУРОВА П.Т. ФЕНОТИПИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ДУБА ЧЕРЕШЧАТОГО ПО ВТОРИЧНОМУ БИОХИМИЧЕСКОМУ ПРИЗНАКУ В НАСАЖДЕНИЯХ, ИМЕЮЩИХ РЕКРЕАЦИОННОЕ НАЗНАЧЕНИЕ	116
ПОЛЯКОВА И.А., ЛЯХ В.А. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ИНДУЦИРОВАННОГО МУТАГЕНЕЗА ДЛЯ РАСШИРЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ РЕСУРСОВ ЛЬНА	120
ПРИБЛУДА І.В., ЧУГУНКОВА Т.В.	

ОСОБЛИВОСТІ ВПЛИВУ НИЗЬКИХ ДОЗ МУТАГЕНІВ НА ПЕРЕЗИМІВЛЮ ГІБРИДІВ ОЗИМОЇ ПШЕНИЦІ	123
РЕШЕТНИКОВ В.Н., СПИРИДОВИЧ Е.В., МАКЕДОНСКАЯ Н.В., ЧИЖИК О.В., АНТИПОВА Т.В., БРЕЛЬ Н.Г	
ИЗУЧЕНИЕ ГЕНОФОНДА СИРЕНИ В ЦБС НАН БЕЛАРУСИ	125
РЯБЧУН В.К., КРИВОШЕЄВА О.В., ВЕДМЕДЕВА К.В.	
ФОРМУВАННЯ ТА ВЕДЕННЯ НАЦІОНАЛЬНОЇ БАЗОВОЇ КОЛЕКЦІЇ СОНЯШНИКУ В УКРАЇНІ	129
САБАДИН В.Я., КОЧМАРСЬКИЙ В.С., ГУДЗЕНКО В.М.	
ВИКОРИСТАННЯ ГЕНЕТИЧНИХ РЕСУРСІВ ДЛЯ СЕЛЕКЦІЇ ЯЧМЕНЮ ЯРОГО В ПРАВОБЕРЕЖНОМУ ЛІСОСТЕПУ УКРАЇНИ	133
САГАЙДАК С.І.	
ОСОБЛИВОСТІ ЖИТТЄЗДАТНОСТІ СОСНИ ЗВИЧАЙНОЇ У ЕКОЛОГО- ГЕОГРАФІЧНИХ КУЛЬТУРАХ КИЇВСЬКОГО ПОЛІССЯ	137
САМЧУК В.А., СТЕКЛЕНЬОВ Є.П., СКРИПНИК Н.М.	
ОСОБЛИВОСТІ БУДОВИ ДВНАДЦЯТИПАЛОЇ КИШКИ У БІЗОНІВ І БАНТЕНГІВ ТА ЇХ ГІБРИДІВ ІЗ СВІЙСЬКИМИ БИКАМИ	140
СИДОРЧУК В.І., СИНЬОГУБ С.В., ПЕТРИЧЕНКО С.М.	
МЕТОДИКА КОНТРОЛЮ ОДНОРІДНОСТІ ТА СТАБІЛЬНОСТІ ВИСОКОПРОДУКТИВНИХ СЕЛЕКЦІЙНИХ ЛІНІЙ ЗА ОЗНАКОЮ ЗАБАРВЛЕННЯ НАСІННЯ В СЕЛЕКЦІЇ ГОРОШКУ ВИКИ ЯРОЇ	143
СИЗЫХ О.А., МУРАТОВА Е.Н.	
ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ЛИСТВЕННИЦЫ СИБИРСКОЙ (<i>LARIX SIBIRICA</i> LEDEB.) НА ЮГЕ СИБИРИ	146
СИТНИК І. Д., ЯРЕШКО В. І.	
ДИНАМІКА ВМІСТУ ГЛЮКОЗИНОЛАТІВ У ВЕГЕТАТИВНИХ ТА ГЕНЕРАТИВНИХ ОРГАНАХ РІПАКУ В ПРОЦЕСІ ОНТОГЕНЕЗУ	149
ТРОЧИНСЬКА Т. Г.	
МІНЛИВІСТЬ ТА ХАРАКТЕР УСПАДКОВУВАННЯ КАРІОМЕТРИЧНИХ ОЗНАК КЛІТИН ГЕНЕРАТИВНИХ СТРУКТУР В ПРОЦЕСІ МІКРОСПОРОГЕНЕЗУ ДЕЯКИХ ЗЛАКІВ	153
УЛЮКИНА М.К., ЕЩЕНКО А.Г.	
ОЦЕНКА ГИБРИДОВ ОРЕХА ГРЕЦЬКОГО F ₁ (<i>JUGLANS REGIA L. X JUGLANS</i> <i>MANSHURICA MAXIM</i>) ПО СТЕПЕНІ ДОМИНИРОВАНИЯ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ПРИЗНАКОВ ЛИСТЬЕВ И ПЛОДОВ	157
ФАЙТ В.І., МОКАНУ Н.В.	
ОЦЕНКА ВОЗМОЖНОСТЕЙ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ЗАПАСНЫХ БЕЛКОВ В КАЧЕСТВЕ МАРКЕРОВ КОЛИЧЕСТВЕННЫХ ПРИЗНАКОВ ПШЕНИЦЫ	162
ФАРТУШНЯК А.Т.	
РЕЗУЛЬТАТИ СЕЛЕКЦІЙНОЇ РОБОТИ ПО БІЛОМУ КОРМОВОМУ ЛЮПИНУ	167
ЦЕРЕНЮК О.М.,	
КОМБІНАЦІЙНА ЗДАТНІСТЬ МАТОК ОСНОВНИХ РОДИН УЕЛЬСЬКОЇ ПОРОДИ СВИНЕЙ.....	168
ЧЕБОТАР С.В., ХОХЛОВ О.М., КУРАКИНА Е.О., СИВОЛАП Ю.М.	
АНАЛІЗ АЛЕЛЬНОГО СТАНУ ГЕНІВ <i>Pina-D1</i> і <i>Pinb-D1</i> В ГЕНОТИПАХ УКРАЇНСЬКИХ СОРТІВ ПШЕНИЦІ	172
ШАРИПІНА Я.Ю., ПОПОВ В.М., КИРИЧЕНКО В.В.	
ОСОБЛИВОСТІ МІНЛИВОСТІ ЯКІСНИХ ТА КІЛЬКІСНИХ ОЗНАК В ПОКОЛІННЯХ F ₂ СОНЯШНИКУ (<i>HELIANTHUS ANNUUS L.</i>)	177
ШЕСТОПАЛ О.Л., МАХНОВСЬКА М.Л., ІГНАТОВА С.О.	
ОСОБЛИВОСТІ УСПАДКУВАННЯ ОЗНАК ДИКОГО ЯЧМЕНЮ У ГІБРИДІВ <i>HORDEUM VULGARE X HORDEUM SPONTANEUM</i>	179
ШИМКО В.Е., ГОНЧАРОВА Л.В., ГОРДЕЙ И.А.	

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА ЗАПАСНЫХ БЕЛКОВ (СЕКАЛИНОВ) ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ САМОФЕРТИЛЬНЫХ ЛИНИЙ ОЗИМОЙ РЖИ (<i>SECALE CEREALE</i> L.)	183
ШИХЛИНСКИЙ Г.М., АКПЕРОВ А.И., ХИЯВИ К.Г. ОЦЕНКА И ПОДБОР ИСХОДНОГО МАТЕРИАЛА ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ НАСЛЕДОВАНИЯ ПРИЗНАКОВ УСТОЙЧИВОСТИ К МИЛДЬЮ	188
ЩИПАК Г.В., СУВОРОВА Е.Ю., ЩИПАК П.В., ЩИПАК В.Г., СОТНИКОВ Д.А., ГРИНЬ В.О. ВКЛАД СЕЛЕКЦИИ В ИЗМЕНЕНИЕ ОЗИМЫХ ГЕКСАПЛОИДНЫХ ТРИТИКАЛЕ	191
ЭЙГЕС Н.С., КУЗНЕЦОВА Н. Л., АРТАМОНОВ В.Д., ДОЛГОВА С.П., ВАЙСФЕЛЬД Л.И., ВОЛЧЕНКО Г.А., КОРНЕВА Г.Г., КОЛМЫКОВА Л.П. СОЗДАНИЕ ВНУТРИВИДОВОГО БИОРАЗНООБРАЗИЯ У ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ МЕТОДОМ ХИМИЧЕСКОГО МУТАГЕНЕЗА И ЕГО ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В СЕЛЕКЦИИ	195
ЮДАНОВА С.С., МАЛЕЦКАЯ Е.И. ОСОБЕННОСТИ ЦВЕТЕНИЯ И МИКРОСПОРОГЕНЕЗА ГАПЛОИДНЫХ РАСТЕНИЙ У САХАРНОЙ СВЕКЛЫ (<i>BETA VULGARIS</i> L.)	198

ТЕХНОЛОГІЇ *IN VITRO*: ПРОБЛЕМИ ТА ПЕРСПЕКТИВИ

АЛАТОРЦЕВА Т.А., ТЫРНОВ В.С. НОВООБРАЗОВАНИЯ И РЕГЕНЕРАЦИЯ В КУЛЬТУРЕ ЗРЕЛЫХ ЗАРОДЫШЕЙ КУКУРУЗЫ	203
БАВОЛ А.В., ДУБРОВНА О.В., ЛЯЛЬКО І.І. ВПЛИВ ХІТОЗАНУ НА РІСТ І РОЗВИТОК КАЛЮСНИХ КУЛЬТУР М'ЯКОЇ ПШЕНИЦІ	206
БЛИНСЬКА О.В. ПРОЯВ ГЕНОТИПНИХ ОСОБЛИВОСТЕЙ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО АНДРОГЕНЕЗУ <i>IN VITRO</i> У ЯЧМЕНЮ В ЗАЛЕЖНОСТІ ВІД ЕЛЕМЕНТІВ ТЕХНОЛОГІЇ ГАПЛОЇДНОЇ ІНДУКЦІЇ І УМОВ ВИРОЩУВАННЯ ДОНОРНИХ РОСЛИН	210
БЛАГОДАРОВА Т.А., СИВОЛАПОВ А.И., СИВОЛАПОВ В. А. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БИОТЕХНОЛОГИИ <i>IN VITRO</i> В ЛЕСОКУЛЬТУРНОЙ ПРАКТИКЕ БЫСТРОРАСТУЩИХ ДРЕВЕСНЫХ ПОРОД	214
БУГАРА А.М., ЮРКОВА И.Н., ТЕПЛИЦКАЯ Л.М., БУГАРА И.А., ПАНОВ Д.А. ПОЛУЧЕНИЕ КАЛЛУСНЫХ КУЛЬТУР ФАТСИИ ЯПОНСКОЙ (<i>FATSIA JAPONICA</i> DESCH. ET PLANCH) И АНАЛИЗ В НИХ ТРИТЕРПЕНОВЫХ ГЛИКОЗИДОВ.....	218
ГУЗЕНКО Е.В., ЛЕМЕШ В.А., ЕМЕЦ А.И., БЛЮМ Я.Б., КАРТЕЛЬ Н.А. ТРАНСФОРМАЦИЯ РАЗЛИЧНЫХ ГЕНОТИПОВ ЛЬНА-ДОЛГУНЦА С ПОМОЩЬЮ <i>Agrobacterium tumefaciens</i> : ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ	222
ЗАДОРЖНА О.А., ЮШКІНА Л.Л. ОСОБЛИВОСТІ МОРФОГЕНЕЗУ ГОРОХУ (<i>PISUM SATIVUM</i> L.) ПРИ КУЛЬТИВУВАННІ <i>IN VITRO</i>	226
КОМИСАРЕНКО А.Г., МАЛИНА А.Э., МИХАЛЬСКАЯ С.И., БРОННИКОВА Л.И., ТИЩЕНКО Е.Н. ВЛИЯНИЕ УЛЬТРАЗВУКА НА ИНДУКЦИЮ РЕГЕНЕРАЦИИ ИНБРЕДНЫХ ЛИНИЙ ПОДСОЛНЕЧНИКА	230
КОРМИЛЬЦЕВ Б.Ф. КУЛЬТУРА КАЛЛУСНЫХ ТКАНЕЙ ХМЕЛЯ (<i>HUMULUS LUPULUS</i> L)	233
КУЗНЕЦОВА Н.В., МИТРОФАНОВА О.В. ВЛИЯНИЕ РЕГУЛЯТОРОВ РОСТА НА РЕГЕНЕРАЦИОННУЮ СПОСОБНОСТЬ ЧЕТЫРЕХ СОРТОВ ЧЕРЕШНИ (<i>PRUNUS AVIUM</i> L.) В УСЛОВИЯХ <i>IN VITRO</i>	237
ЛОБАНОВА Е.И., ИГНАТОВА С.А., ШЕСТОПАЛ О.Л., НАРГАН Т.П.	

РЕГЕНЕРАЦИЯ В КУЛЬТУРЕ ПЫЛЬНИКОВ ОЗИМОЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ У ГЕНОТИПОВ С РАЗНОЙ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬЮ ПЕРИОДА «ВСХОДЫ-КОЛОШЕНИЕ»	241
МИТРОФАНОВА И.В., ЕЖОВ В.Н., ИВАНОВА Н.Н., ЧЕЛОМБИТ С.В. РАЗЛИЧНЫЕ ПУТИ МОРФОГЕНЕЗА <i>IN VITRO</i> КАЛАДИУМА (<i>CALADIUM HORTULANUM</i> BIRDSEY.) КАК СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ И СОХРАНЕНИЯ РАСТЕНИЙ	246
ОРЛОВСКАЯ О.А., САКОВИЧ В.И., ЛЕМЕШ В.А., ХОТЫЛЕВА Л.В. ВЛИЯНИЕ РАЗМЕРА ЭКСПЛАНТА НА РЕГЕНЕРАЦИЮ ПОБЕГОВ ИЗ ГИПОКОТИЛЬНЫХ СЕГМЕНТОВ РАСТЕНИЙ ЛЬНА	250
ОСТАПОВЕЦЬ Л.І. ПАРТЕНОГЕНЕТИЧНЕ АКТИВУВАННЯ <i>IN VITRO</i> ЯЙЦЕКЛІТИН СВИНЕЙ	253
ПИРАЛОВ Г.Р., АБРАИМОВА О.Е. КУЛЬТУРА ТКАНИ НЕКОТОРЫХ ГЕНОТИПОВ КУКУРУЗЫ ЗАРУБЕЖНОЙ СЕЛЕКЦИИ	256
ПОЛЯКОВА Л.В., ГУБИН Е.Н. БИОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СЕЯНЦЕВ ДУБА ЧЕРЕШЧАТОГО, ИСПОЛЪЗУЕМЫХ ДЛЯ РАЗМНОЖЕНИЯ <i>IN VITRO</i>	260
СОРОКА А.И. ВЛИЯНИЕ ВОЗРАСТА ЗАРОДЫШЕЙ ПОДСОЛНЕЧНИКА ПРИ ИХ КУЛЬТИВИРОВАНИИ <i>IN VITRO</i> НА ЧАСТОТУ И НЕКОТОРЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ НИХ РАСТЕНИЙ	263
ТРЕТЬЯКОВА И.Н., ИВАНИЦКАЯ А.С., БАРСУКОВА А.В., ИЖБОЛДИНА М.В., НОСКОВА Н.Е. БИОТЕХНОЛОГИИ ХВОЙНЫХ <i>IN VITRO</i> : ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ	267
ТРУХАНОВЕЦ Н. Л., МОЗГОВА Г. В. УЛЬТРАСТРУКТУРА КЛЕТОК МЕЗОФИЛЛА ЛИСТА АЛЬБИНОСНЫХ И ЗЕЛЕННЫХ РАСТЕНИЙ, ПОЛУЧЕННЫХ В КУЛЬТУРЕ ПЫЛЬНИКОВ ПШЕНИЦЫ	271
ЯРУЛЛИНА Л.Г., СУРИНА О.Б., МАКСИМОВ И.В. ТЕХНОЛОГИЯ <i>IN VITRO</i> В ИЗУЧЕНИИ МЕХАНИЗМОВ УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ К ПАТОГЕНАМ	275

БИОТЕХНОЛОГІЇ В МЕДИЦИНІ І СІЛЬСЬКОМУ ГОСПОДАРСТВІ

АЛЕКСЕЕВА Е.И., СМИРНОВ С.О. ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ ПИЩЕВЫХ ЭКСТРУДАТОВ НА ОСНОВЕ ПРОДУКТОВ РАЗМОЛА ЗЕРНА АМАРАНТА.....	280
БАЄР О.О., ЄМЕЦЬ А.І., РАДЧУК В.В., БЛЮМ Я.Б. ПЕРЕНЕСЕННЯ СТІЙКОСТІ ДО ДИНІТРОАНІЛІНОВИХ ГЕРБІЦИДІВ У РОСЛИНИ ЛЬОНУ-ДОВГУНЦЯ ЗА ДОПОМОГОЮ <i>AGROBACTERIUM TUMEFACIENS</i>	283
БАЕР Г.Я., БАЕР О.А., ШИША Е. Н., ЛЕМЕШ В.А., КАРТЕЛЬ Н.А., ЕМЕЦ А.И., БЛЮМ Я.Б. ВИЗУАЛІЗАЦІЯ МІКРОТРУБОЧЕК В КЛЕТКАХ ЛЬНА-ДОЛГУНЦА С ІСПОЛЪЗОВАНИЕМ ХИМЕРНОГО ГЕНА GFP- TUA6	288
ГОЛОВНЕВА Н.А., ЩЕТКО В.А., НАЙДЕНКО И.А., ДЕНИСЕНКО В.В., РЯБАЯ Н.Е., КРАСОЧКО П.А., ЛОМАКО Ю.В. ИЗУЧЕНИЕ АНТАГОНИСТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ БИФИДО- И МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ В ОТНОШЕНИИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЙ МОЛОДНЯКА СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ	292

ДЕНИСЕНКО В.В., НАЙДЕНКО И.А. ВЛИЯНИЕ ИСТОЧНИКА УГЛЕРОДА В СРЕДЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НА ПРОДУКЦИЮ ЭКЗОПОЛИСАХАРИДОВ <i>LACTOBACILLUS SP.</i>	295
ДМИТРУК О.В., ДМИТРУК К.В., ВОРОНОВСЬКИЙ А.Я., СИБІРНИЙ А.А. ЗМІНА КОФАКТОРНОЇ СПОРІДНЕНОСТІ КСИЛОЗОРЕДУКТАЗИ ТА ПОСИЛЕННЯ ЕКСПРЕСІЇ КСИЛТОЛДЕГІДРОГЕНАЗИ ПОКРАЩУЄ АЛКОГОЛЬНУ ФЕРМЕНТАЦІЮ КСИЛОЗИ У ТЕРМОТОЛЕРАНТНИХ ДРІЖДЖІВ <i>HANSENULA</i> <i>POLYMORPHA</i>	298
ЕГОРОВА А.В. БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПРИЕМЫ ПОЛУЧЕНИЯ БЕЗЛАКТОЗНОГО ЗЕРНОВОГО ПРОДУКТА	302
ЄМЕЦЬ А.І., ПАХОМОВ О.В., РАДЧУК В.В., БЛЮМ Я.Б. БІОЛІСТИЧНА ТРАНСФОРМАЦІЯ СОЇ <i>Glycine max</i> (L.) ГЕНОМ СТІЙКОСТІ ДО ДИНІТРОАНІЛІНОВИХ ГЕРБІЦИДІВ	304
ЗАБЕЛИНА В.Ю., ДОРОШЕНКО К.А., КЛИМЕНКО В.В. РАЗВИТИЕ В ЧУЖЕРОДНОЙ СОМЕ ТРАНСПЛАНТИРОВАННЫХ ЯИЧНИКОВ И СПОСОБНОСТЬ К ТЕРМИЧЕСКОМУ ПАРТЕНОГЕНЕЗУ СФОРМИРОВАВШИХСЯ В НИХ ЯИЦ У ТУТОВОГО ШЕЛКОПРЯДА <i>ВОМБУХ MORI L.</i>	308
ЗАГОРСКАЯ А.А., СИДОРЧУК Ю.В., ДЕЙНЕКО Е.В. МОРФОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ У ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ ТАБАКА ПРИ СПОНТАННОЙ ПОЛИПЛОИДИЗАЦИИ В КУЛЬТУРЕ <i>IN VITRO</i>	312
ИШМУРАТОВА Н.М., ИСМАГИЛОВА А.Ф., ЯКОВЛЕВА М.П., ТОЛСТИКОВ Г.А. НЕИЗВЕСТНОЕ О «МАТОЧНОМ ВЕЩЕСТВЕ» МЕДОНОСНЫХ ПЧЕЛ	316
КОЛОДЯЖНАЯ Я.С., КОЧЕТОВ А.В., КИРСАНОВА С.Н. ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫЕ РАСТЕНИЯ ТАБАКА (<i>Nicotiana tabacum</i> L.) И КАРТОФЕЛЯ (<i>Solanum tuberosum</i> L.), ХАРАКТЕРИЗУЮЩИЕСЯ ПОВЫШЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ К ЗАСОЛЕНИЮ	320
КОПИЛОВ К.В., КОПИЛОВА К.В., КОВТУН С.І. ВИКОРИСТАННЯ МЕТОДІВ ДНК-АНАЛІЗУ ПРИ ВИЗНАЧЕННІ СТАТІ ТА ГЕНОТИПУВАННІ ДОІМПЛАНТАЦІЙНИХ ЕМБРІОНІВ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ ..	324
КРУГЛОВА Н.Н., СЕЛЬДИМИРОВА О.А., КАТАСОНОВА А.А., ЗАЙЦЕВ Д.Ю., КРУГЛОВА А.Е. БИОТЕХНОЛОГИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ АНДРОКЛИННОЙ ГАПЛОИДИИ ЯРОВОЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ <i>IN VITRO</i> НА ОСНОВЕ КОМПЛЕКСА ЦИТОЭМБРИОЛОГИЧЕСКИХ И ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ДАННЫХ	328
КУЦЯБА В.І., ПИНЯГА Ю.В., БОРЕЦЬКИЙ Ю.Р., ГОНЧАР М.В., ФЕДОРОВИЧ Д.В., СИБІРНИЙ А.А. РОЗРОБКА СИСТЕМИ ГЕНЕТИЧНОЇ ТРАНСФОРМАЦІЇ ДЛЯ ІДЕНТИФІКАЦІЇ РЕГУЛЯТОРНИХ ГЕНІВ БІОСИНТЕЗУ РИБОФЛАВІНУ У ДРІЖДЖІВ <i>PICHIA</i> <i>GUILLIERMONDII</i>	331
ЛУК'ЯНЧУК В.В. КЛОНУВАННЯ ПЛР-АМПЛІКОНА ХРОМОСОМИ <i>Streptomyces coelicolor A3(2)</i>	335
МИТРОФАНОВА О.В., ЛЕСНИКОВА-СЕДОШЕНКО Н.П., ЧИРКОВ С.Н., СМЫКОВ А.В. БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ СИСТЕМЫ ОЗДОРОВЛЕНИЯ КОСТОЧКОВЫХ ПЛОДОВЫХ КУЛЬТУР И ПОЛУЧЕНИЯ БЕЗВИРУСНОГО ПОСАДОЧНОГО МАТЕРИАЛА	338
НАМ И.Я., ЗАЯКИН В.В. СОЗДАНИЕ НОВЫХ ФОРМ РЕМОНТАНТНОЙ МАЛИНЫ МЕТОДАМИ БИОТЕХНОЛОГИИ	342
ПАРХОМЕНКО Ю.М., ДОНЧЕНКО Г.В., ПИЛИПЧУК С.Ю., ЧЕХОВСКАЯ Л.И., СТЕПАНЕНКО С.П.	

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПРЕПАРАТА МЕТОВИТАН ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ УСТОЙЧИВОСТИ ОРГАНИЗМА К ВОЗДЕЙСТВИЮ НЕБЛАГОПРИЯТНЫХ ФАКТОРОВ	346
ПОГОРЕЛКО Г.В., ФУРСОВА О.В., ОГАРКОВА О.А., ТАРАСОВ В.А. НОВЫЙ ПОДХОД В ИЗУЧЕНИИ СУПЕРЭКСПРЕССИРУЮЩИХ МУТАНТОВ <i>A.thaliana</i>	350
РАХМЕТОВ Д.Б., БАЄР Г.Я., СТАДНІЧУК Н.О., ЄМЕЦЬ А.І., БЛЮМ Я.Б. ВИВЧЕННЯ БІОХІМІЧНИХ ХАРАКТЕРИСТИК СОМАКЛОНАЛЬНИХ ВАРІАНТІВ ПАЛЬЧАСТОГО ПРОСА	354
СОРОЧИНСЬКИЙ Б.В., БЛЮМ Я.Б. ПРИНЦИПИ РЕГУЛЮВАННЯ ДІЯЛЬНОСТІ, ЩО СТОСУЄТЬСЯ ГМ ОРГАНІЗМІВ, ТА ДЕЯКІ ПРОБЛЕМИ БІОБЕЗПЕКИ В УКРАЇНІ	358
СТРУНИН Д.Е., АБРАИМОВА О.Б., ПЭРИ Л, ХРИСТАН О.О, ТИЩЕНКО Е.Н. СКРИНИНГ НА КОМПЕТЕНТНОСТЬ К АГРОБАКТЕРИАЛЬНОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ КАЛЛУСНЫХ КУЛЬТУР, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ НЕЗРЕЛЫХ ЗАРОДЫШЕЙ ИНБРЕДНЫХ ЛИНИЙ КУКУРУЗЫ (<i>Zea mays</i> L.).....	361
СУПРУН С.М., ДОНЧЕНКО Г.В., КУЧМЕРОВСКАЯ Т.М., ПАРХОМЕНКО Ю.М., ИСАЕВА Н.М. БИОТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ГРИБНОГО ПРЕПАРАТА	365
ФУРСОВА О.В., ОГАРКОВА О.А., ТАРАСОВ В.А. ИДЕНТИФИКАЦИЯ ФУНКЦИИ ДВУХ ГЕНОВ <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> , КАК НОВЫХ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ РЕГУЛЯТОРОВ ОТВЕТА НА ХОЛОДОВОЙ СТРЕСС У РАСТЕНИЙ	368
ШЕМЕТУН О.В., ТАЛАН О.О. МОДЕЛЮВАННЯ РАДІАЦІЙНО ІНДУКОВАНОГО ЕФЕКТУ СВДКА В УМОВАХ <i>IN VITRO</i>	370
ШЕРЕМЕТ Я.О., ЄМЕЦЬ А.І., БЛЮМ Я. Б З'ЯСУВАННЯ РОЛІ ФОСФОРИЛЮВАННЯ ТУБУЛІНУ ПО ЗАЛИШКАМ ТИРОЗИНУ У ФОРМУВАННІ МЕХАНІЗМІВ ХОЛОДОСТІЙКОСТІ РОСЛИННИХ КЛІТИН	374
ШЛЯХОТКО Е.А., САПУНОВА Л.И., ЛОБАНОК А.Г., ЕВТУШЕНКОВ А.Н., ВЫГОВСКАЯ О.Н. КОНСТРУИРОВАНИЕ ГИБРИДНОГО ВЕКТОРА ДЛЯ КЛОНИРОВАНИЯ ГЕНА <i>XYL A</i> В БАКТЕРИЯХ РОДА <i>ARTHROBACTER</i>	378
ЩЕРБАК О.В., ТРОЦЬКИЙ П.А., ЗЮЗІОН А.Б. БІОТЕХНОЛОГІЧНІ МЕТОДИ ОДЕРЖАННЯ І ЗБЕРІГАННЯ ГАМЕТ СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКИХ ТВАРИН	382
ЭЛЬКОНИН Л.А., КОЖЕМЯКИН В.В., ЦВЕТОВА М.И. НАСЛЕДУЕМАЯ АКТИВАЦИЯ ГЕНОВ-ВОССТАНОВИТЕЛЕЙ УСЛОВИЯМИ ВЫРАЩИВАНИЯ РАСТЕНИЙ КАК МЕХАНИЗМ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ФЕРТИЛЬНОСТИ В ЦМС-ИНДУЦИРУЮЩЕЙ ЦИТОПЛАЗМЕ ТИПА «9E» У СОРГО	385
ЯМСКОВА В.П., СКРИПНИКОВА В.С., КРАСНОВ М.С., БИТКО С.А., БЕРЕЗИН Б.Б., ЯМСКОВ И.А. МОДУЛЯТОРЫ АКТИВНОСТИ РЕГУЛЯТОРНЫХ БЕЛКОВ, ДЕЙСТВУЮЩИХ В МИКРОДОЗАХ	389
ЯЦИШИН В. Ю., ПЩУК О. П., ВОРОНОВСЬКИЙ А. Я., ФЕДОРОВИЧ Д. В., СИБІРНИЙ А. А. УТВОРЕННЯ ФЛАВІНМОНОНУКЛЕОТИДУ РЕКОМБІНАНТНИМИ ШТАМАМИ ДРІЖДЖІВ <i>CANDIDA FAMATA</i> , ЩО МІСТЯТЬ ГЕН <i>FMN1</i> ПІД ПРОМОТОРОМ <i>TEF1</i>	393
LYROVA N.M., SINDAROVSKA Y.R, GERASYMENKO I.M., SHELUDKO Y.V., BANNIKOVA M.A., KUCHUK N.V. COMPARISON OF DIFFERENT SYSTEMS FOR PURIFICATION OF RECOMBINANT PROTEINS PRODUCED BY TRANSIENT EXPRESSION IN PLANTS	397