

УКРАЇНСЬКА
АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ НАУК

УКРАИНСКАЯ
АКАДЕМИЯ АГРАРНЫХ НАУК

ДЕРЖАВНИЙ
НИКІТСЬКИЙ БОТАНІЧНИЙ САД

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
НИКИТСКИЙ БОТАНИЧЕСКИЙ САД

**АКТУАЛЬНІ ПРОБЛЕМИ ПРИКЛАДНОЇ ГЕНЕТИКИ,
СЕЛЕКЦІЇ ТА БІОТЕХНОЛОГІЇ РОСЛИНИ**
Збірник наукових праць
Том 131

**АКТУАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ ПРИКЛАДНОЙ
ГЕНЕТИКИ, СЕЛЕКЦИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ
РАСТЕНИЙ**
Сборник научных трудов
Том 131

Ялта 2009

УДК 504.73:631.52:58.085

У збірнику наведено результати досліджень різних наукових шкіл з генетики, селекції та біотехнології рослин, подані на міжнародну конференцію «Актуальні проблеми прикладної генетики, селекції та біотехнології рослин», присвячену 200-річчю Ч. Дарвина та 200-річчю Нікітського ботанічного саду, що відбувалася 3-6 листопада 2009 р. на базі Нікітського ботанічного саду – Національного наукового центру та Національного інституту винограду й вина «Магарач» (Ялта, АР Крим, Україна). Збірник становить інтерес для фахівців у галузі біотехнології, ботаніки, генетики, селекції, екології та студентів біологічних факультетів вузів.

В сборнике приведены результаты исследований различных научных школ по генетике, селекции и биотехнологии растений, представленные на международной конференции «Актуальные проблемы прикладной генетики, селекции и биотехнологии растений», посвященной 200-летию Ч. Дарвина и 200-летию Никитского ботанического сада и проводимой 3-6 ноября 2009 г. на базе Никитского ботанического сада – Национального научного центра и Национального института винограда и вина «Магарач» (Ялта, АР Крым, Украина). Сборник представляет интерес для специалистов в области биотехнологии, ботаники, генетики, селекции, экологии и студентов биологических факультетов вузов.

Редакційно–видавнича рада:

В.М. Єжов (голова), А.М. Авідзба, О.О. Бордунова (редактор), Т.Б. Губанова, Г.С. Захаренко, В.П. Ісіков, З.К. Клименко, В.П. Коба, В.І. Копилов, І.В. Костенко, В.В. Корженевський, М.М. Кузнецов, М.П.Литвинов (заступник голови), І.І. Маслов, І.В. Митрофанова, О.В. Митрофанова, М.Є. Опанасенко, О.Ф. Поляков, В.Д. Работягов, С.Ю. Садогурський, А.В.Смиков, В.К.Смиков, С.О. Шаригін, С.В. Шевченко, В.А. Шишкін (заступник голови), О.М. Ярош.

Редакционно–издательский совет:

В.Н. Ежов (председатель), А.М. Авидзба, Е.А. Бордунова (редактор), Т.Б. Губанова, Г.С. Захаренко, В.П. Исиков, З.К. Клименко, В.П. Коба, В.И. Копылов, И.В. Костенко, В.В. Корженевский, Н.Н. Кузнецов, Н.П. Литвинов (зам. председателя), И.И. Маслов, И.В. Митрофанова, О.В. Митрофанова, Н.Е. Опанасенко, А.Ф. Поляков, В.Д. Работягов, С.Е. Садогурский, А.В. Смыков, В.К. Смыков, С.А. Шарыгин, С.В. Шевченко, В.А. Шишкин (зам. председателя), А.М. Ярош

THE UKRAINIAN ACADEMY OF AGRARIAN SCIENCES

THE STATE NIKITSKY BOTANICAL GARDENS

**ACTUAL PROBLEMS OF APPLIED GENETICS,
BREEDING AND BIOTECHNOLOGY OF PLANTS**

**Collected scientific works
Volume 131**

**Edited by Doctor of Technical Science V.N. Ezhov
and Doctor of Biology Science I.V. Mitrofanova**

Yalta 2009

The investigation results of different research schools in genetic, breeding and biotechnology of plants have been introduced at the International Conference «Actual Problems of Applied Genetics, Breeding and Biotechnology of Plants» in commemoration of the 200th anniversary of Charles Darwin and the 200th anniversary of Nikitsky Botanical Gardens during November 3-6, 2009 on the base of the Nikitsky Botanical Gardens – National Scientific Center and the National Institute for Vine and Wine «Magarach» (Yalta, Crimea, Ukraine). It is destined for specialists in the fields of biotechnology, botany, breeding, ecology, genetics and students of biological faculty.

Editorial–Publishing Board:

V.N. Ezhov (Chairman), A.M. Avidzba, E.A. Bordunova (Editor), T.B. Gubanova, V.P. Isikov, Z.K. Klimenko, V.P. Koba, V.I. Kopylov, I.V. Kostenko, V.V. Korzhenevsky, N.N. Kuznetsov, N.P. Litvinov (Vice–Chairman), I.I. Maslov, I.V. Mitrofanova, O.V. Mitrofanova, N.E. Opanasenko, A.F. Polyakov, V.D. Rabotyagov, S.E. Sadogursky, S.A. Sharygin, S.V. Shevchenko, V.A. Shishkin (Vice–Chairman), A.V. Smykov, V.K. Smykov, A.M. Yarosh, G.S. Zakharenko

СОЧЕТАНИЕ КЛАССИЧЕСКОЙ СЕЛЕКЦИИ И ПРИМЕНЕНИЯ СОВРЕМЕННЫХ МЕТОДОВ БИОТЕХНОЛОГИИ ДЛЯ СОХРАНЕНИЯ ГЕНОФОНДА ХВОЙНЫХ ВИДОВ СИБИРИ

И.Н. ТРЕТЬЯКОВА, доктор биологических наук;
А.В. БАРСУКОВА; С.С. САВЕЛЬЕВ; А.С. СИРЕНКО
Институт леса им. В.Н. Сукачева СО РАН, Красноярск, Россия

Введение

Проблема сохранения генофонда основных лесообразующих видов России может быть решена при помощи сочетания классических методов селекции и современных методов биотехнологии, таких как соматический эмбриогенез, широко используемый в плантационном лесовыращивании за рубежом при реализации программы MVF (Multi variety forest). Соматический эмбриогенез имеет ряд преимуществ по сравнению с другими методами клонального размножения. Этот эффективный метод регенерации растений позволяет сохранять генетические ресурсы на протяжении длительного времени благодаря высокой продуктивности пролиферирующей эмбриональной массы (ЭМ) и ее способности подвергаться длительной криоконсервации [7]. С помощью соматического эмбриогенеза можно производить массовое тиражирование высокопродуктивных, устойчивых к патогенам чистых линий растений для создания лесосеменных плантаций [3-5].

Несмотря на быстрое развитие биотехнологии соматического эмбриогенеза хвойных, до сих пор не разработан комплексный селекционно-генетический подход и не полностью решены те аспекты фундаментальной проблемы морфогенеза (тотипотентность, детерминация и компетентность, дифференциация и дедифференциация), которые можно решить на примере именно соматического эмбриогенеза как модельной системы. Отсутствуют работы по сравнению цитогистологического статуса морфогенных (эмбриональной массы) и неморфогенных каллусов различного происхождения во всей динамике их развития. Технология соматического эмбриогенеза до сих пор остается не разработанной для ряда видов хвойных, в том числе и видов, произрастающих на территории России [1, 2]. Кроме того, критическим моментом является процесс вызревания соматических зародышей, поскольку он влияет на жизнеспособность полученных зародышей и их способность прорасти.

Сочетание селекционной стратегии размножения для улучшения хвойных видов – внутривидовой и межвидовой гибридизации – основано на использовании комплементарных признаков между родительскими генотипами, приводящими к гетерозису. При этом использование биотехнологии соматического эмбриогенеза будет способствовать массовому тиражированию гибридных и гомозиготных чистых линий хвойных видов, что внесет неоценимый вклад в генетическое улучшение лесов России.

Цель исследования – проведение работ по гибридизации основных лесообразующих видов Сибири с выявлением у них эффекта гетерозиса, а также разработка биотехнологии получения соматических зародышей и регенерантов у гибридных семян хвойных пород.

Объекты и методы исследования

Объектом исследований служили деревья сосны сибирской (кедр сибирский, *Pinus sibirica* Du Tour), произрастающие в естественном древостое Западного Саяна и на клоновых прививочных плантациях Западно-Саянского Опытного лесного хозяйства, а также лиственницы сибирской (*Larix sibirica* Ledeb.), произрастающей в естественных и искусственных насаждениях, а также клоновых плантациях (Красноярский край). На клонах кедра сибирского и лиственницы сибирской проводили опыты по контролируемому опылению с использованием в качестве опылителей плюсовых деревьев (№ 107, 108, 277,

357, 492) и уникальных гетерозисных форм с однолетним развитием женской шишки (106), а также деревьев лиственницы сибирской, устойчивых к лиственничной почковой галлице.

При проведении опытов по гибридизации (2005-2008 гг.) производилось опыление 6-12 клонов (каждый клон включал 12-15 деревьев) пыльцой деревьев-опылителей. С опыленных клонов производился сбор шишек потомства первого поколения, половина которых шла на определение семенной продуктивности и качества семян. Зародыши семян другой половины шишек вводили в культуру *in vitro*. В опытах по гибридизации проводили тестирование пыльцы на жизнеспособность.

При проведении работ по индукции соматического эмбриогенеза семена стерилизовали и из них извлекали зародыши, которые вводили в культуру *in vitro*. Для инициации образования эмбриогенного каллуса (ЭК) из зиготических зародышей использовали базовые среды $\frac{1}{2}$ MS, MS [6], $\frac{1}{2}$ LV, LV, MSG [8] и MA (неопубликованные данные) с добавлением мезоинозита, L-глутамина, регуляторов роста (2,4-Д и 6-БАП), сахарозы, а также агара или Gelrite. Для пролиферации ЭМ концентрация 6-БАП и сахарозы снижалась в 2-4 раза (у каждого вида по-разному). Эксперименты по индукции образования и пролиферации ЭК проводили в темноте при температуре $24 \pm 1^\circ\text{C}$. Для созревания соматических зародышей в среды добавляли АБК, ИМК, сахароза, а также Gelrite. Культивирование эксплантов проводили при 16-часовом фотопериоде и температуре $24 \pm 1^\circ\text{C}$.

Для цитологического анализа использовали давленные препараты. Окраску эксплантов проводили сафранином с добавлением капли метиленового синего. Статистическую обработку данных проводили по стандартным методикам при помощи Microsoft Excel. Морфологические изменения фиксировали цифровой фотокамерой Fudjifilm FinePix S7000.

Результаты и обсуждение

Результаты проведенных исследований показали, что женские шишки появились на клонах кедра сибирского уже в 10-летнем возрасте (2001 г.), мужские шишки в 13-летнем возрасте (2006 г.). В этот период клоны достигали высоты 1,5-1,6 м, $D_{1,3}$ (диаметр на высоте 1,3 м) составил 15-17 см. Прорастание *in vitro* пыльцы у плюсовых и гетерозисных деревьев, используемых в качестве опылителей, было достаточно высоким. У разных деревьев жизнеспособность пыльцы колебалась от 75,4 до 96,8%, средняя длина пыльцевых трубок – от 105 до 164,9 мкм, что свидетельствует о высоком качестве пыльцы.

Семенная продуктивность гибридных шишек клоновых деревьев сосны сибирской в разных вариантах контролируемого опыления колебалась от 47 до 98,7%. Полнозернистость семян составила 90-93%. Зародыши достигали длины 1/4-1/2 длины зародышевого канала. У клонов, обработанных пыльцой гетерозисного дерева с однолетним развитием женских шишек, 30% гибридных шишек развивались по однолетнему циклу. Однако размеры таких шишек оказались мельче (длина шишек составила 46 против 76 мм, ширина – 36 против 66 мм). Семенная продуктивность составила 57%. У однолетних шишек данного клона в семяпочках формировались архегонии.

Введение изолированных зародышей семян кедра сибирского и лиственницы сибирской в культуру *in vitro* показало, что процесс реализации соматического эмбриогенеза у данных видов состоит из индукции образования ЭК, пролиферации эмбрионально-суспензорной массы (ЭСМ), вызревания соматических зародышей и их прорастания. На индукционной среде под действием гормонов 6-БАП и 2,4-Д соматические клетки зиготических зародышей лиственницы сибирской и кедра сибирского на 5-10 сутки культивирования начинали интенсивно растягиваться в длину и превращаться в эмбриональные трубки размером 200-300 мкм (рис. 1 а). Эмбриональные трубки в результате неравного деления образовывали мелкие

эмбриональные клетки диаметром 39-47 мкм. В течение 1 месяца эмбриональные клетки активно делились и образовывали эмбриональные глобулы, которые окружались эмбриональными трубками (рис. 1 б). При пересадке ЭСМ на пролиферирующие среды с пониженным содержанием цитокининов и сахарозы, вызывающих интенсивную пролиферацию, шел активный кливаж. При субкультивировании ЭСМ на базовых средах, содержащих АБК и ИМК, соматические зародыши приобретали биполярную структуру: на одном из полюсов формировались примордии семядолей, на другом – зародышевый корешок (рис. 1 в, г).

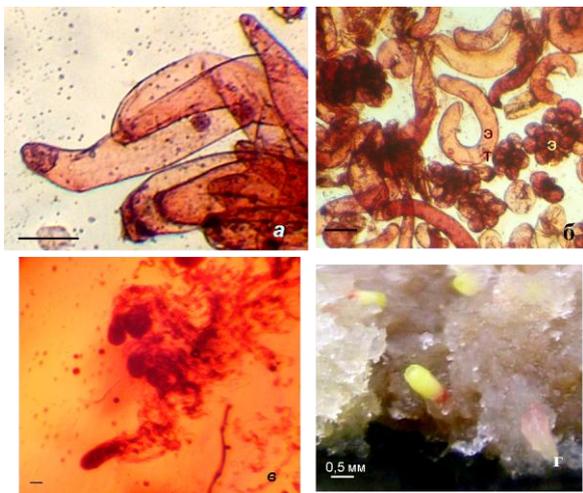


Рис. 1. Соматический эмбриогенез у лиственницы сибирской: а – индукция образования эмбриональной массы; б – пролиферация эмбриональной массы; в – соматические зародыши в эмбриональной массе; г – созревание соматических зародышей

Наблюдения за динамикой роста ЭК показали, что процессы инициации и пролиферации каллуса у разных генотипов идут с неодинаковой скоростью. Из 16 эксплантов плюсовых деревьев кедра сибирского выделен один индивидуум, у которого объем эмбриогенного каллуса в 2-3 раза превышал объем каллусов остальных плюсовых деревьев (рис. 2). Наиболее активное образование ЭК шло у клонов в вариантах опыления пыльцой гетерозисного дерева с однолетним формированием женских шишек (рис. 3). Динамика роста ЭК и образование соматических зародышей у лиственницы сибирской происходило аналогично кедру сибирскому.

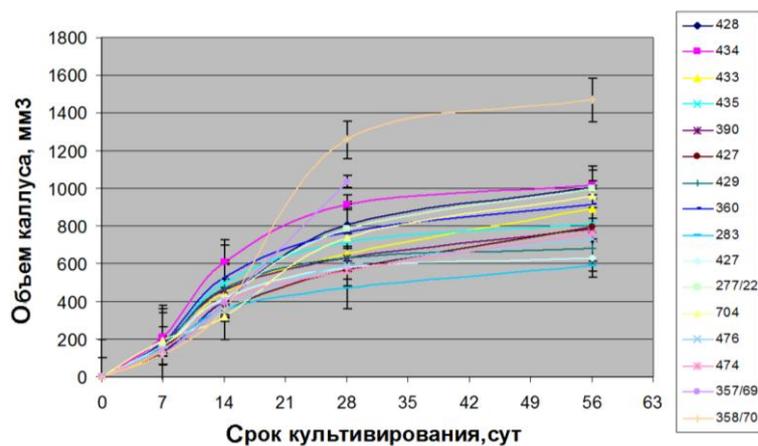


Рис. 2. Рост эмбриогенного каллуса у плюсовых деревьев кедр сибирского (цифрами обозначены номера деревьев)

Среди 30 генотипов лиственницы выделены 18% генотипов, у которых шло интенсивное образование эмбриогенного каллуса, у 57% генотипов образование эмбриогенного каллуса шло значительно слабее, а у 13% генотипов формирование эмбриогенного каллуса вообще не наблюдали. Особенно заслуживает внимания генотип донора лиственницы сибирской, который отличался устойчивостью к повреждению лиственничной почковой галлицей, и у которого шло активное формирование

эмбрионного каллуса. За 50 суток культивирования объем ЭК достигал 18990 мм^3 . На 1 мм^2 ЭСМ насчитывалось в среднем $75 \pm 4,6$ шт. эмбриональных глобул. У данного генотипа отмечали активное образование соматических зародышей. На среде для созревания насчитывалось до 380 шт. зародышей на 1 г эмбрионного каллуса. Происходило формирование чистой эмбрионной линии.

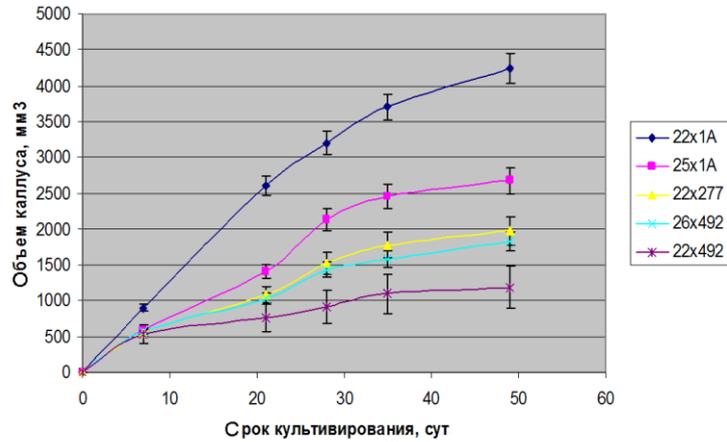


Рис. 3. Рост эмбрионного каллуса у гибридных зародышей семян, полученных в результате контролируемого опыления клонов пыльцой плюсовых деревьев (22x492, 22x277, 26x492) и гетерозисного дерева кедр сибирского (22x1A, 25x1A)

Образование ЭК, его пролиферация, формирование и вызревание соматических зародышей у лиственницы сибирской занимало 4-6 месяцев, у кедр сибирского – 7-10 месяцев. Аналогично зиготическим зародышам, морфогенез соматических зародышей включает последовательное прохождение стадий проэмбрио, кливажа, образование глобулярных и торпедообразных зародышей, после которых осуществляются процессы дифференцировки – формируются апексы побега и корня, гипокотиль и семядоли, и, наконец, происходит прорастание соматических зародышей. Реализация соматического процесса требует применения разных химических соединений, в том числе регуляторов роста и различных физических предобработок. Поэтому соматический эмбриогенез у хвойных видов можно использовать как модельную систему в эмбриологических исследованиях. С помощью эмбрионных культур были получены генетически улучшенные растения, которые будут подвергнуты криоконсервации, что позволит создать банк улучшенных генотипов.

Выводы

1. В результате опытов по гибридизации кедр сибирского на клоновой прививочной плантации были получены шишки первого поколения с высокой семенной продуктивностью.
2. Из введенных изолированных зародышей кедр сибирского и лиственницы сибирской путем подбора состава питательных сред формировались эмбрионально-суспензорная масса, соматические зародыши и регенеранты.
3. Наиболее активным ростом обладали эмбрионные каллусы кедр сибирского, полученные от гетерозисных деревьев-опылителей с однолетним циклом развития женских шишек и лиственницы сибирской, полученные от дерева, устойчивого к лиственничной почковой галлице. Определены генотипы донорных растений лиственницы сибирской и кедр сибирского, способные давать чистые эмбрионные линии, соматические зародыши и регенеранты.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ № 08-04-00107, № 09-04-10023к р-Сибирь-а № 09-04-98000 и № 09-04 98000 интеграционного гранта № 53.

Список литературы

1. Белоруссова А.С., Третьякова И.Н. Особенности формирования соматических зародышей у лиственницы сибирской: эмбриологические аспекты // Онтогенез. – 2008. – Т. 39, № 2. – С. 1-10.
2. Перспективы применения методов биотехнологии для размножения генетически ценных форм лесных древесных видов / Третьякова И.Н., Белоруссова А.С., Носкова Н.Е., Савельев С.С., Лукина А.В., Барсукова А.В., Ижболдина М.В., Череповский Ю.А. // Хвойные бореальной зоны. – 2007. – Т. 24, № 2-3. – С. 309-318.
3. Klimaszewska K., Cyr D.R. Conifer somatic embryogenesis: I. Development // Dendrobiology. – 2002. – V. 48. – P. 31-39.
4. An improved method for somatic plantlet production in hybrid larch (*Larix x leptoeuropaea*): Part 2. Control for germination and plantlet development / Lelu M.A., Bastien C., Klimaszewska K., Charest P.J. // Plant Cell Tiss. Organ. Cult. – 1994. – V. 36. – P. 117-127.
5. Lelu-Walter M-A., Bernier-Cardou M., Klimaszewska K. Clonal plant production from self- and cross-pollinated seed families of *Pinus sylvestris* (L.) through somatic embryogenesis // Plant Cell Tiss. Organ. Cult. – 2008. – V. 92. – P. 31-45.
6. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. – 1962. – V. 15, N 4. – P. 473-497.
7. Park Y-S. Implementation in conifers somatic embryogenesis in clonal forestry: technical requirement and development considerations // Ann. For. Sci. – 2002. – V. 59. – P. 651-656.
8. Plant cell, tissue and organ culture: fundamental methods / Eds. O.L. Gamborg, G.C. Phillips. – Berlin: Springer-Verlag, 1995. – 358 p.

СОМАТИЧЕСКИЙ ЭМБРИОГЕНЕЗ И ОРГАНОГЕНЕЗ КАК ОСНОВА БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМ ПОЛУЧЕНИЯ И СОХРАНЕНИЯ ДЕКОРАТИВНЫХ И ПЛОДОВЫХ КУЛЬТУР

И.В. МИТРОФАНОВА, доктор биологических наук
Никитский ботанический сад – Национальный научный центр

Введение

Биотехнологические подходы, основанные на культивировании органов и тканей многолетних садовых растений вне организма, на искусственных питательных средах в регулируемых асептических условиях, открывают принципиально новые возможности для фундаментальных и прикладных исследований. Растительные системы *in vitro* являются удобными моделями для исследования сложных механизмов, лежащих в основе пролиферации, клеточной дифференцировки, гистогенеза, органогенеза, соматического эмбриогенеза и регенерации целого организма из культивируемых клеток, обладающих тотипотентностью [1-3, 6, 7, 15, 16, 18, 22, 32]. В прикладном аспекте на основе знаний о биологии клетки *in vitro* разрабатываются меристемные технологии, эмбриокультура, гаплоидные технологии, клеточная селекция, генная и клеточная инженерия [4, 5, 8, 10, 20].

Экспериментально созданные системы *in vitro* весьма многообразны. Используя системы *in vitro*, реализацию тотипотентности клетки высшего растения можно направить как по пути соматического эмбриогенеза, так и органогенеза. Количество компетентных клеток зависит от вида, подвида, сорта и типа исходного экспланта. Сохранение проэмбриогенных клеток при субкультивировании находится также в зависимости от трофических и гормональных факторов среды [1, 3, 4, 7, 9, 20, 24].

Тотипотентность клеток растений является фундаментальной основой биологии высших растений. При этом соматический эмбриогенез – наиболее яркое свидетельство тотипотентности растительной клетки. В отличие от зиготического эмбриогенеза соматический можно разделить на две стадии: 1) начальная клеточная фаза; 2) переход к эмбриогенезу и развитию зародыша *in vitro* начиная с глобулярной стадии, через стадии сердечка и торпеды к семядольной фазе и развитию проростка. Изучение самых ранних этапов процесса эмбриогенеза *in vitro* является одним из важных моментов исследований в области соматического эмбриогенеза. Ученые могут выявить не только сигналы и индукторы этого процесса, но и механизмы переключения дедифференцированной клетки на другой путь развития.

Первые результаты по индукции соматического эмбриогенеза были получены в суспензионной культуре моркови [29, 31]. В 1980 г. были описаны два пути соматического эмбриогенеза [30]. Первый путь – прямой соматический эмбриогенез, когда зародыши образуются непосредственно из клеток экспланта без этапа каллусообразования. В этом случае соматические зародыши формируются из «проэмбриогенных детерминированных клеток», которые уже работают на развитие эмбриоида и нуждаются только в освобождении. Второй – непрямой или косвенный эмбриогенез, когда пролиферация каллуса является необходимым этапом. В непрямом соматическом эмбриогенезе задействованы «индуцированные эмбриогенные детерминированные клетки». Наряду с первичным соматическим эмбриогенезом встречается вторичный эмбриогенез, когда на поверхности сформировавшихся соматических зародышей образуются добавочные эмбриоиды.

Т.Б. Батыгиной в 1978 г. в качестве новой категории вегетативного размножения было введено понятие «эмбриоидогения» [1]. Ею при выделении эмбриоидогении в особый тип репродукции и размножения были использованы два критерия: онтогенетический и морфологический. Кроме того, в зависимости от происхождения и положения соматических зародышей на материнском растении были выделены две основные формы «эмбриоидогении»: репродуктивная или флоральная (образование проэмбрио в цветке и семени) и вегетативная (формирование адвентивных зародышей на листьях, побегах и корнях).

В настоящее время известно, что соматические зародыши образуются у растений, относящихся к разным таксонам и произрастающих в разных экологических зонах. За последние десятилетия у ряда древесных растений, таких как *Acacia koa* Gray, *Aesculus hippocastanum* L., *Albizia richardiana* King., *Camellia japonica* L., *Camellia sinensis* L., *Castanea sativa* Mill., *Citrus* sp., *Cocos nucifera* L., *Coffea arabica*, *Eucalyptus* sp., *Feijoa sellowiana* Berg., *Hevea brasiliensis* (Willd. ex A. Juss.) Müll. Agr., *Juglans cinerea* L., *Juglans regia* L., *Liriodendron tulipifera* L., *Pistacia vera* L., *Prunus subhirtella* Miq., *Robinia pseudoacacia* L., *Theobroma cacao*, *Zizyphus jujuba* Mill. разработаны способы регенерации растений *in vitro* через соматический эмбриогенез.

Развитие соматических зародышей очень пластично и подвержено влиянию таких факторов, как генотип растения-донора и его физиологическое состояние, тип исходного экспланта, степень его целостности и время отбора. Различные культуры и генотипы исследуемых видов имеют очень широкий спектр морфогенетических реакций по отношению к условиям культивирования. Основными индукторами дифференциации соматических эмбриоидов и дальнейшей регенерации растений из них являются специфически необходимые регуляторы роста растений, осмотики, консистенция и pH среды, интенсивность освещения, фотопериод, температура и влажность [9, 17, 19, 21, 27].

Объекты и методы исследования

Несмотря на многосторонние биотехнологические исследования, проведенные на многолетних культурах, главным образом соматические эмбриоиды были получены из

незрелых зиготических зародышей и инициация образования эмбрионных культур из неэмбрионных тканей еще не разработана у многих экономически важных растений. До сих пор практически не изучены вопросы индукции и прохождения этапов соматического эмбриогенеза, не определены подходы к выбору эффективных индукторов включения разных путей морфогенеза и недостаточно исследованы механизмы, ответственные за эффективную регенерацию у отдельных декоративных, субтропических и плодовых культур. Отсутствие достаточных знаний об этом также во многом сдерживает и появление новых эффективных биотехнологий, направленных на развитие систем получения, размножения и сохранения важных садовых растений.

Коллекционный генофонд Никитского ботанического сада – Национального научного центра включает в себя разнообразные виды и сорта декоративных, субтропических и косточковых плодовых, эфиромасличных растений, имеющие как эстетическое, так и народнохозяйственное значение. Вместе с тем, возникающие трудности при традиционном размножении, в процессе селекции и сохранения многолетних садовых культур, заставляют ученых обращаться к современным методам биотехнологии растений.

Поэтому целью наших исследований было выявление особенностей соматического эмбриогенеза и органогенеза в условиях *in vitro*, позволяющее не только пополнить знания о морфогенезе растений в целом, но и разработать биотехнологическую методологию получения и сохранения ценных видов и сортов декоративных, субтропических и косточковых плодовых культур.

Результаты и обсуждение

Клематис. При разработке системы прямого и непрямого соматического эмбриогенеза клематиса было выявлено, что инициация развития экспланта (вегетативной почки) зависела от сроков отбора растительного материала. Так, 90-100% вегетативных почек образовывали микропобеги и соматические зародыши в период с февраля по апрель [12].

Проведено изучение компонентного состава индукционной питательной среды как фактора, не только выявляющего, но и поддерживающего качественные характеристики морфогенетических событий, происходящих в развивающихся вегетативных почках клематиса в процессе культивирования *in vitro*. Для эксплантов клематиса экспериментально подобрана солевая основа среды МС и определена необходимость присутствия в ней для индукции процесса непрямого соматического эмбриогенеза зеатина в концентрации 1,8 мкМ [14, 23, 26]. Установлено, что в течение 30 суток культивирования каллуса отмечали появление эмбрионных зон, меристематических бугорков и эмбриоидов. Гистологический анализ показал, что в эмбрионной массе имеются как эмбрионные, так и неэмбрионные клетки. Выявлено, что на 3 сутки культивирования активизировались процессы митотической и меристематической активности в эмбрионной массе клеток. Прозембрио начинал формироваться в результате асимметричных делений, чаще всего непосредственно внутри каллуса (рис. 1 а). Соматические зародыши появлялись на поверхности каллуса только на 35-40 сутки культивирования (рис. 1 б). В условиях *in vitro* отмечали образование глобулярных, сердцевидных и торпедовидных эмбриоидов клематиса подобно развитию зиготических зародышей. Из выявленных 7 морфологических типов соматических зародышей только 4 обладали регенерационным потенциалом: 1 – односемядольный, 2 – двусемядольный, 3 – полисемядольный, 4 – трубоподобный.

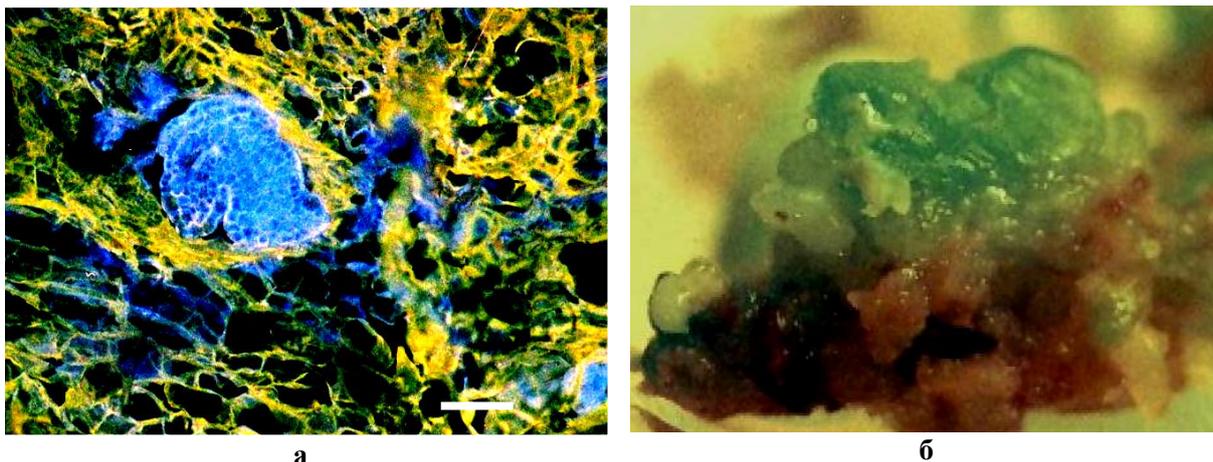


Рис. 1. Формирование соматических зародышей в каллусе клематиса (а) и последующее образование эмбрионов на поверхности каллуса (б) сорта Серенада Крыма

Прорастание соматических зародышей происходило в течение 30-40 суток культивирования.

Использование в качестве эффекторов соматического эмбриогенеза физических факторов позволило установить оптимальные значения температуры (26°C) и интенсивности освещения ($40 \text{ мкМ м}^{-2} \text{ с}^{-1}$), при которых количество развившихся эмбрионов достигало 25-30 штук на эксплант.

Наряду с этим изучены особенности образования микропобегов из каллуса клематиса. Показано, что каллус листового происхождения диаметром 7-10 мм является компетентным эксплантом, способным формировать максимальное количество адвентивных почек на питательной среде МС, содержащей 2,3 мкМ зеатина (рис. 2).

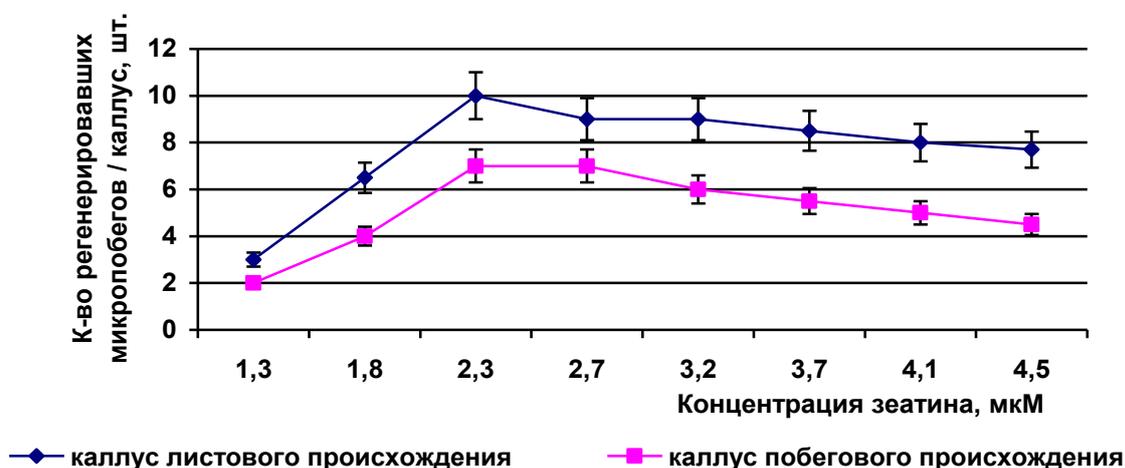


Рис. 2. Зависимость регенерации микропобегов клематиса из каллуса разного происхождения от концентрации зеатина в питательной среде

Проведен молекулярно-генетический анализ донорного растения и соматических клонов клематиса сорта Серенада Крыма, полученных путем органогенеза и соматического эмбриогенеза. Установлены особенности изменчивости генома при различных способах регенерации *in vitro*. С помощью ISSR-праймеров обнаружено 105 ампликонов, из которых полиморфными оказались шесть. Средний показатель гетерогенности растений клематиса составил 5,7% [11]. Наиболее генетически дифференцированным от остальных оказался контроль (материнское растение, не вошедшее не в один из двух

кластеров). Вместе с тем все растения, полученные из соматических зародышей и доведенные до цветения, не отличались по фенотипу от исходного. Таким образом, результаты анализа еще раз показали, что для получения точной генетической картины необходим тщательный подбор или синтез видоспецифичных праймеров.

На основе сравнительного изучения морфогенетических потенций вегетативных почек 8 сортов клематиса (Серенада Крыма, Юность, Невеста, Crimson Star, Космическая Мелодия, Вечный Зов, Ай-Нор, Лесная Опера) разработана система прямого соматического эмбриогенеза. Установлена зависимость формирования соматических зародышей от генотипа и концентрации БАП в питательной среде МС. Вместе с тем система прямого соматического эмбриогенеза работала эффективней за счет индукции вторичного эмбриогенеза (рис. 3). Отмечено, что как в случае первичного, так и вторичного эмбриогенеза более высоким эмбриогенным потенциалом обладали почки сортов клематиса, относящихся к группам Ланугиноза и Жакмана.

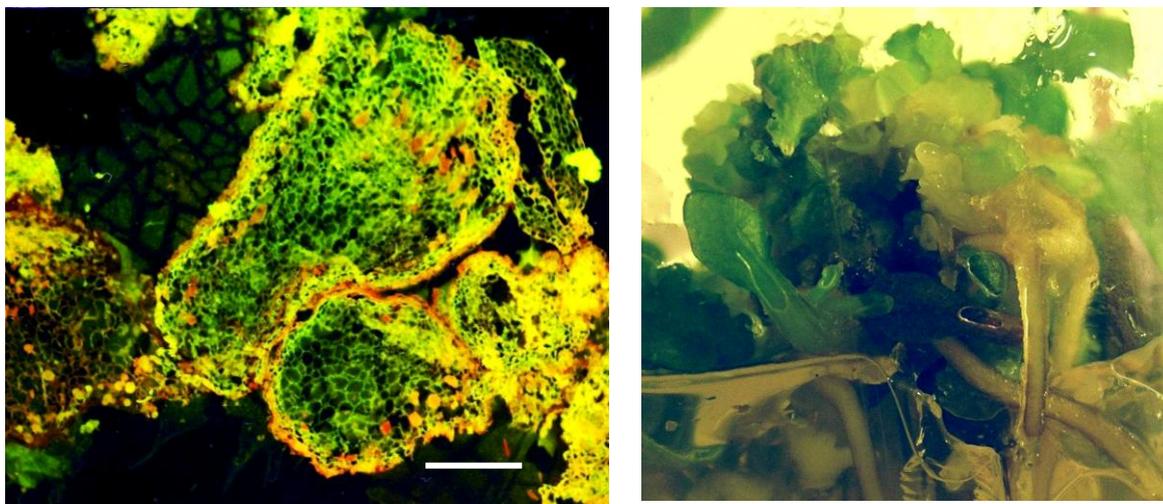


Рис. 3. Образование вторичных эмбриоидов на поверхности первичных соматических зародышей клематиса сорта Юность

В процессе исследований впервые было выявлено, что существовала зона активизации образования соматических зародышей клематиса, то есть существовали эмбриоид или группа эмбриоидов, которые были способны индуцировать соматический эмбриогенез как первичный, так и вторичный. Этот эксплант был назван «индуктором». Воздействие «индуктора» на соматический эмбриогенез проявлялось в активном образовании дополнительных зародышей на эксплантах, помещенных на питательную среду и это отмечали у всех сортов клематиса, за исключением сорта Космическая Мелодия. Наша гипотеза относительно воздействия «индуктора» на соседние экспланты клематиса через питательную среду, в которую выделялись индуцирующие вещества (метаболиты, гормоны и др.), не подтвердилась. Наряду с этим было установлено, что «индуктор» мог работать достаточно продолжительный отрезок времени (до 2-3 лет). Положительной стороной приостановления процесса соматического эмбриогенеза за счет удаления «индуктора» была возможность разделения соматических зародышей на отдельные фракции, сгруппировав их по размеру и стадии развития.

На основании проведенных исследований определены основные факторы, работающие в биотехнологической системе прямого соматического эмбриогенеза клематиса: концентрация экзогенного цитокинина БАП, температура, интенсивность освещения, «индуктор» соматического эмбриогенеза и генотип. При этом доля влияния «индуктора» в среднем составила 50%.

Таким образом, нами впервые разработаны способы непрямого и прямого соматического эмбриогенеза клематиса и предложена биотехнологическая система размножения растений *in vitro* (рис. 4).

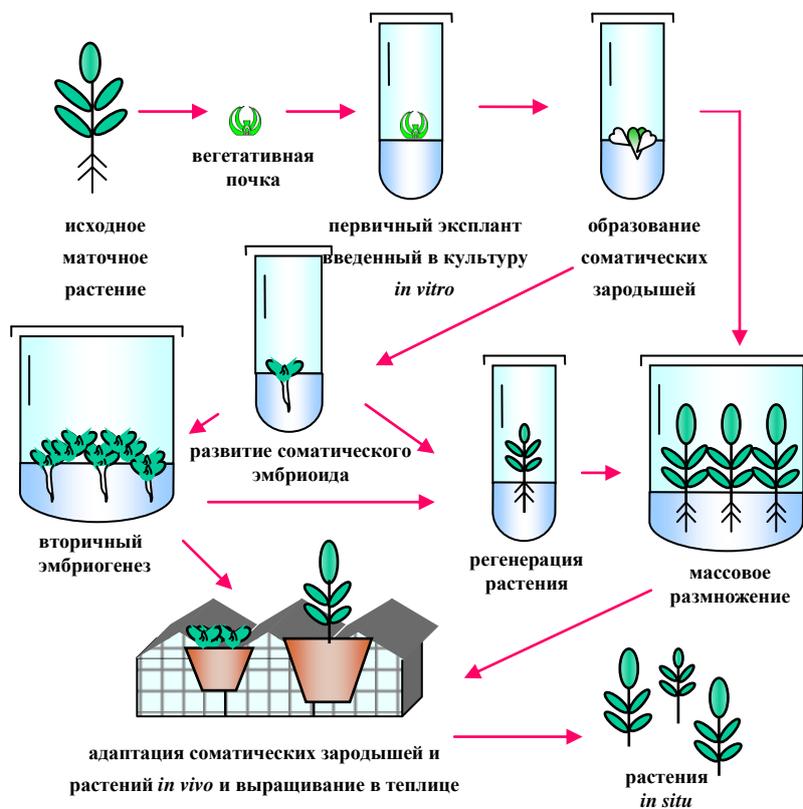


Рис. 4. Биотехнологическая схема получения растений клематиса через прямой соматический эмбриогенез

Все полученные в условиях *in vitro* растения клематиса адаптированы *in vivo* и высажены *in situ*.

В отличие от клематиса, у каладиума и фикуса лировидного именно лист оказался компетентным эксплантом, способным к образованию как соматических зародышей, так и микропобегов.

Каладиум. В процессе исследования был модифицирован состав питательной среды МС (С1) и подобраны оптимальные концентрации цитокинина для индукции морфогенетических процессов в тканях листа двух сортов каладиума, приводящих к соматическому эмбриогенезу. Наряду с этим удалось определить наиболее морфогенные зоны, способные к прямому и непрямоу соматическому эмбриогенезу. Такими оказались зона соединения листовой пластинки с черешком и край высечки листа. Период развития от введения первичных эксплантов каладиума в культуру до появления глобулярных структур по краю высечки листа без этапа каллусообразования составил 30 суток.

Пути реализации морфогенетического потенциала эксплантов каладиума зависели от условий культивирования. В отсутствие освещения формировались только соматические зародыши. На свету происходило три морфогенетических процесса: органогенез в морфогенном каллусе, не прямой 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. Последующие пассажи соматических зародышей на питательную среду С1

индуцировали вторичный эмбриогенез. Весь процесс от введения эксплантов до регенерации растений составил 3 месяца (рис. 5 а, б). Присутствие в среде 2,22 мкМ БАП и 2,69 мкМ НУК индуцировало образование максимального количества микропобегов и эмбриоидов через непрямо соматический эмбриогенез и прямую регенерацию микропобегов из высечек листа каладиума [15].

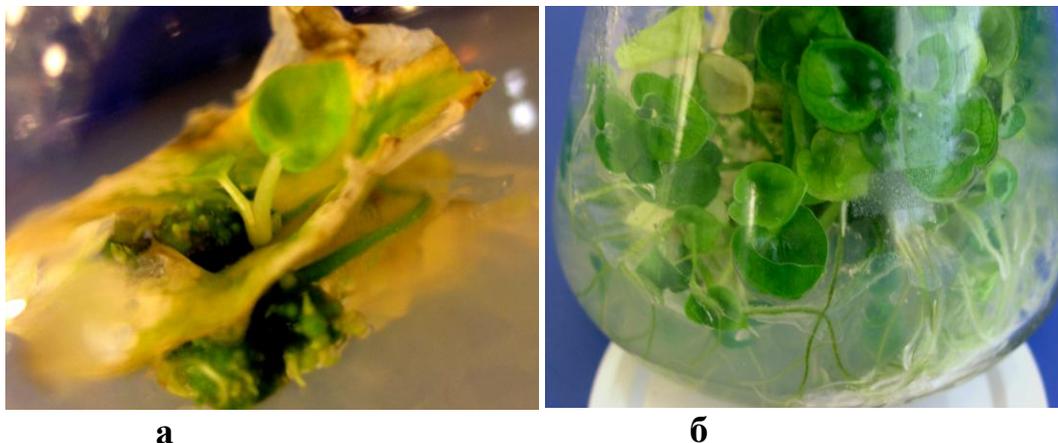


Рис. 5. Развитие соматических зародышей каладиума (а) и их прорастание (б) на питательной среде С1

В результате непрямо регенерации микропобегов и непрямо соматического эмбриогенеза у сорта Pink Gem были получены новые формы с различными соматическими мутациями. У выделенных растений соматические мутации проявлялись в виде различных форм листовой пластинки, ее окраски и жилковании (рис. 6).



Рис. 6. Новые формы каладиума сорта Pink Gem, полученные в результате непрямо регенерации микропобегов и непрямо соматического эмбриогенеза: а) исходный сорт; справа и внизу – формы, отличающиеся по форме и окраске листовой пластинки

Фикус лировидный. Эффективность индукции соматического эмбриогенеза фикуса лировидного зависела от концентрации 6-бензиламинопурина (БАП) в питательной среде QL [28]. Изучение регенерационной способности зон листа фикуса лировидного показало, что все они имели высокий морфогенетический потенциал, который

реализовался через соматический эмбриогенез и прямую регенерацию микропобегов. Отмечено, что край листовой пластинки оказался наиболее компетентным к образованию соматических эмбриоидов. В зоне вдоль основной жилки и у черешка чаще всего индуцировали процесс прямой регенерации микропобегов. Соматические зародыши проходили все стадии развития и были уже четко видны на 30 сутки культивирования (рис. 7).



Рис. 7. Образование соматических зародышей по краю листовой пластинки фикуса лировидного на среде КЛ с 0,89 мкМ БАП и 0,05 мкМ НУК



Рис. 8. Прямая регенерация микропобегов фикуса лировидного на среде КЛ с 1,78 мкМ БАП и 0,05 мкМ НУК

Как и в случае с культурами клематиса и каладиума, вторичный соматический эмбриогенез фикуса лировидного происходил на индукционной питательной среде. Увеличение количества субкультивирований значительно повышало частоту вторичного соматического эмбриогенеза. Непрерывный процесс соматического эмбриогенеза фикуса лировидного происходил в течение 2 лет, при этом частота эмбриогенеза оставалась на одном уровне и достигала 95-100%. Полноценные растеньица из эмбриоидов фикуса формировались на 40-60 сутки от начала индукции формирования соматических зародышей.

Повышение концентрации БАП до 1,78 мкМ индуцировало процесс прямой регенерации адвентивных микропобегов из листовых эксплантов фикуса лировидного (рис. 8). Максимальное количество корней ($5,8 \pm 0,1$ штук на микропобег) образовалось на $\frac{1}{4}$ нормы среды МС, дополненной 0,98 мкМ ИМК [13].

Изучены условия адаптации *in vivo* укорененных микропобегов и проростков каладиума и фикуса лировидного.

На представленной биотехнологической схеме показано получение растений фикуса через соматический эмбриогенез и органогенез (рис. 9). Разработанные биотехнологические системы размножения растений дают возможность получать до 40.000000 регенерантов каладиума и 4.000000 регенерантов фикуса лировидного в год.

Субтропические плодовые культуры. Другая биотехнологическая система создавалась на основе сравнительного изучения прямой регенерации растений из зиготических зародышей и листовых эксплантов зизифуса, киви, фейхоа и хурмы и была направлена на разработку реципиентной системы этих культур в условиях *in vitro*.

На этапе введения первичных эксплантов в условия *in vitro* было выявлено, что способность изолированных почек фейхоа, киви, хурмы и зизифуса регенерировать микропобеги зависела от генотипа и концентрации цитокининов в питательной среде [24].



Рис. 9. Биотехнологическая схема микроразмножения фикуса лировидного (температура $24\pm 1^\circ\text{C}$, интенсивность освещения $40\text{ мкМ м}^{-2}\text{ с}^{-1}$, 16-часовой фотопериод)

Наряду с этим в процессе исследований установлены оптимальные сроки предобработки зиготических зародышей зизифуса, киви, фейхоа и хурмы, введенных в культуру *in vitro*. Проведенное сравнительное изучение компетентности зиготических зародышей 4 субтропических культур к прорастанию под воздействием низких положительных температур показало, что частота прорастания зародышей достигала 100% при предобработке фейхоа и киви в течение 15 суток. Однако для развития зародышей хурмы и зизифуса продолжительность предобработки увеличивали до 30 суток.

При изучении морфогенетических потенций семядолей, листьев и сегментов микропобегов киви, зизифуса, фейхоа и хурмы было установлено, что регенерационный потенциал зависел от генотипа, типа экспланта и концентрации ТДЗ. В дальнейшем, индуцируя процесс ризогенеза микропобегов зизифуса, киви, фейхоа и хурмы, их помещали на питательные среды с половинным набором макро- и микросолей по МС, дополненные ИМК и НУК (рис. 10). Активный ризогенез у всех субтропических культур удалось индуцировать только после 7-8 пассажей. Полноценные растения киви, фейхоа, зизифуса и хурмы для последующей высадки на адаптацию были получены через 2, 3, 4 и 5 месяцев культивирования, соответственно.

На рис. 11 представлена биотехнологическая система получения растений киви, зизифуса, фейхоа и хурмы через прямую регенерацию микропобегов из вегетативных почек, семядолей и листьев, прямой соматический эмбриогенез из семядолей, органогенез и непрямой соматический эмбриогенез в морфогенном каллусе. По результатам исследований получен патент Украины на способ прямой регенерации микропобегов *Actinidia deliciosa* (Chev.) Liang, Fergusson в культуре *in vitro*.

Генобанк *in vitro*. Наряду с изучением особенностей соматического эмбриогенеза, органогенеза и разработкой реципиентных систем декоративных и субтропических плодовых культур, одним из важных направлений в биотехнологии растений является сохранение растительных объектов в условиях *in vitro*, которое позволяет создать резервный банк генетической плазмы ценных, редких, исчезающих, новых видов и сортов.

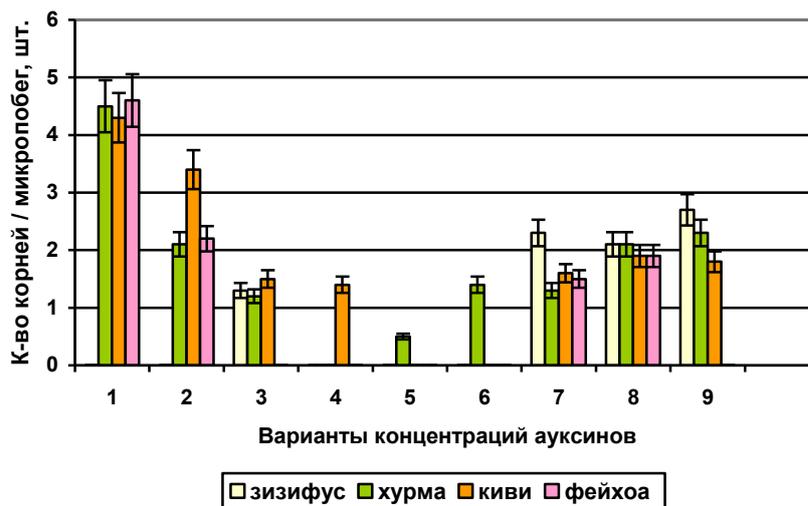


Рис. 10. Влияние концентраций и комбинаций ИМК и НУК в питательной среде $\frac{1}{2}$ МС на образование корней в основании микропобегов зизифуса, киви, фейхоа и хурмы: 1 – 0,98 мкМ ИМК; 2 – 1,97 мкМ ИМК; 3 – 4,90 мкМ ИМК; 4 – 1,07 мкМ НУК; 5 – 2,15 мкМ НУК; 6 – 5,37 мкМ НУК; 7 – 4,90 мкМ ИМК + 1,07 мкМ НУК; 8 – 4,90 мкМ ИМК + 2,15 мкМ НУК; 9 – 4,90 мкМ ИМК + 5,37 мкМ НУК (после 7-8 субкультивирований)

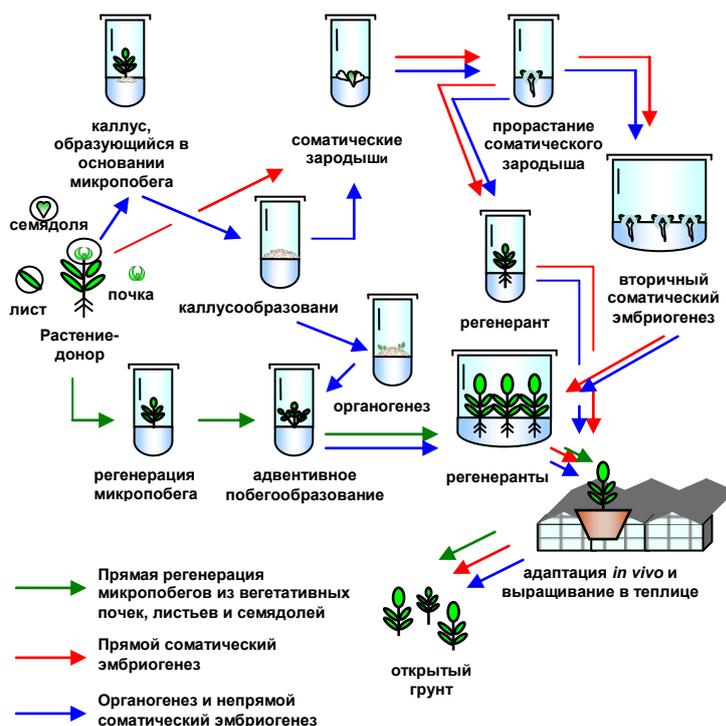


Рис. 11. Биотехнологическая схема размножения и получения растений субтропических плодовых культур

Впервые определены оптимальные экспланты декоративных, субтропических и косточковых плодовых культур для депонирования в условиях *in vitro* на основе ростового индекса, частоты регенерации и органогенетического индекса [25].

Предварительные результаты наших исследований по депонированию *in vitro* ряда садовых культур показали, что воздействие только двух факторов – низкой положительной температуры и интенсивности освещения, позволяет сохранять отдельные экспланты до 3 лет, однако их дальнейшая регенерация не была столь активна и большая часть эксплантов погибала при переводе в стандартные условия

культивирования. Поэтому было изучено влияние каждого из эффекторов и сопоставлены полученные оптимальные показатели, что позволило выработать правильную стратегию в сохранении *in vitro* эксплантов роз, клематиса, юкки, орхидей, фейхоа, киви, алычи, сливы и абрикоса. На питательных средах, содержащих 90 г/л сахарозы, жизнеспособность эксплантов роз, орхидей, клематиса, юкки, фейхоа и киви достигала 50-90%. Среди исследуемых культур высокой жизнеспособностью обладали протокормы цимбидиума и соматические зародыши клематиса. Наряду с этим при добавлении в среды 90 г/л сахарозы кинетика роста эксплантов снижалась в 2-3 раза по сравнению с контролем в зависимости от вида и сорта растения. Снижение кинетики роста уменьшало количество пассажей и способствовало увеличению периода депонирования эксплантов.

Как показали дальнейшие исследования по разработке способа длительного сохранения растительных объектов в условиях *in vitro*, введение в питательную среду ретарданта – хлор холин хлорида (ССС) значительно повышало жизнеспособность эксплантов по сравнению с контролем. Проведенный скрининг исследуемых культур, подвергшихся воздействию низких положительных температур и ретарданта ССС в течение 12 месяцев, позволил выделить наиболее жизнеспособные культуры. Установлено, что при концентрации ССС 0,2-0,4 г/л количество жизнеспособных эксплантов у таких растений, как роза, клематис, орхидеи, юкка, алыча, слива, абрикос достигало 100%. Наряду с ингибированием роста эксплантов, ССС индуцировал рост корней у таких культур, как роза, клематис, юкка, фейхоа и слива. Частота укоренения микропобегов клематиса у таких сортов, как Серенада Крыма и Юность через 24 месяца депонирования достигала 100% (рис. 12 а).



а



б

Рис. 12. Экспланты клематиса сорта Серенада Крыма на средах с ССС (а) и микропобеги розы садовой, киви и сливы в генобанке *in vitro* (б)



Рис. 13. Биотехнологический процесс депонирования ценных видов и сортов декоративных, косточковых плодовых и субтропических плодовых культур

Совместное использование оптимальных концентраций ССС и сахарозы, показателей интенсивности освещения и температуры значительно увеличило как период сохранения в беспересадочной культуре, так и жизнеспособность эксплантов исследуемых культур (рис. 12 б). Это позволило впервые разработать способ минимизации роста декоративных, субтропических и косточковых плодовых культур в условиях *in vitro* и создать генобанк ценной растительной плазмы. Данная биотехнологическая система сохранения растений, состоящая из нескольких этапов, представлена на рис. 13.

Выводы

На основании комплексного изучения процессов соматического эмбриогенеза и органогенеза предложена биотехнологическая схема получения и сохранения ценных видов и сортов декоративных, субтропических, косточковых плодовых и эфиромасличных растений (рис. 14). Представленная на рисунке схема состоит из нескольких системных блоков, в которых удалось раскрыть регенерационный потенциал изученных культур и продемонстрировать основные факторы (индуктор, генотип, тип экспланта и его происхождение, питательная среда, фитогормоны и их концентрации, интенсивность освещения и температура), показать степень их влияния на процессы соматического эмбриогенеза и органогенеза и отразить конечный продукт – биотехнологические системы размножения, реципиентные системы и системы сохранения многолетних растений в условиях *in vitro*.

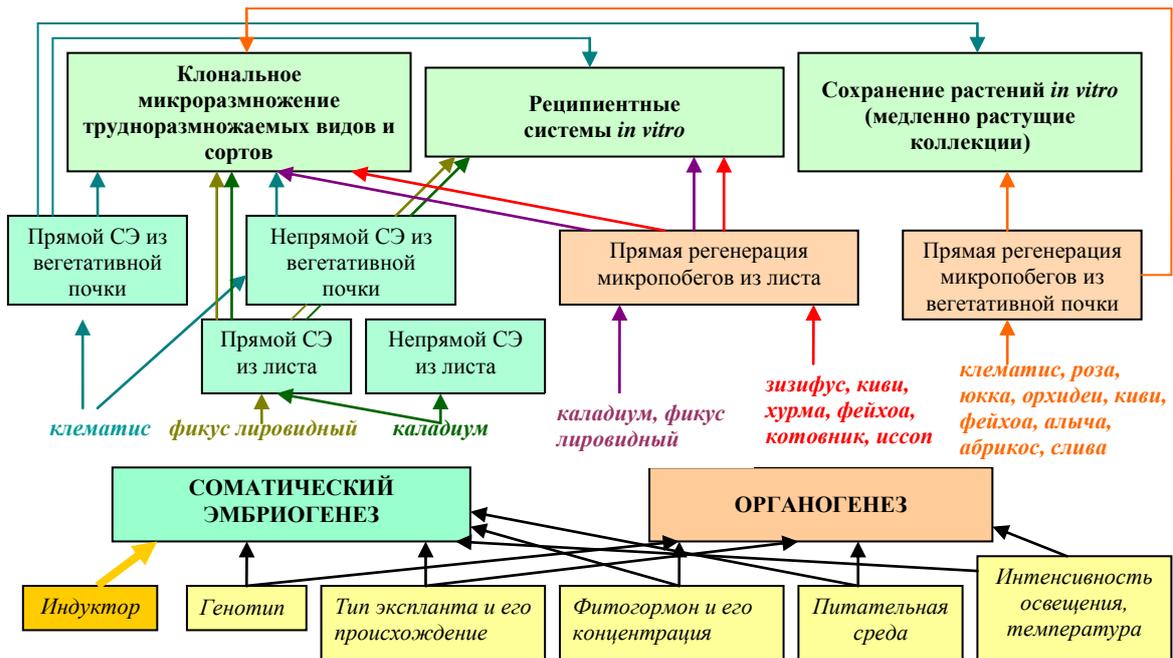


Рис. 14. Биотехнологическая схема получения и сохранения ценных видов и сортов декоративных, субтропических, косточковых плодовых и эфиромасличных растений (СЭ – соматический эмбриогенез)

Список литературы

1. Батыгина Т.Б., Васильева В.Е. Размножение растений: Учебник. – СПб.: Изд-во С.-Петербур. ун-та, 2002. – 232 с.
2. Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. – М.: Наука, 1964. – 272 с.
3. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе: Учебное пособие. – М.: ФГК-ПРЕСС, 1999. – 160 с.

4. Здруйковская-Рихтер А.И. Эмбриокультура изолированных зародышей, генеративных структур и получение новых форм растений. – Симферополь: Крым-Фарм-Трейдинг, 2003. – 368 с.
5. Ігнатова С.О. Реалізація тотипотентності мікроспор в культурі *in vitro* та її використання в селекційно-генетичних експериментах // Генетика і селекція в Україні на межі тисячоліть. – К.: Логос, 2001. – С. 562-572.
6. Кунах В.А. Геномная изменчивость соматических клеток растений. 2. Изменчивость в природе // Биополимеры и клетка. – 1995. – Т. 11, № 6. – С. 5-40.
7. Кунах В.А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. – К.: Логос, 2005. – 730 с.
8. Мельничук М.Д., Новак Т.В., Кунах В.А. Біотехнологія рослин: Підручник. – К.: ПоліграфКонсалдинг, 2003. – 250 с.
9. Митрофанова И.В. Микроклональное размножение субтропических и тропических плодовых культур (обзор литературы) // Труды Никит. ботан. сада. – 1997. – Т. 119. – С. 63-95.
10. Митрофанова И.В., Митрофанова О.В., Пандей Д.К. Соматический эмбриогенез и регенерация растений *Zizyphus jujuba* Mill. *in vitro* // Физиология растений. – 1997. – Т. 44, № 1. – С. 108-114.
11. Митрофанова И.В., Галаев А.В., Сиволап Ю.М. Исследование молекулярно-генетической гетерогенности растений клематиса (*Clematis* L.), полученных путем органогенеза и соматического эмбриогенеза *in vitro* // Цитология и генетика. – 2003. – № 6. – С. 12-16.
12. Митрофанова И.В., Зубкова Н.В., Соколова М.К. Сравнительное изучение особенностей прямого соматического эмбриогенеза 8 сортов клематиса (*Clematis* sp.) // Труды Никит. ботан. сада. – 2007. – Т. 128. – С. 12-24.
13. Митрофанова И.В., Митрофанова О.В., Челомбит С.В. Соматический эмбриогенез и органогенез фикуса лировидного (*Ficus lyrata* Warb.) в условиях *in vitro* как основа биотехнологической системы микроразмножения // Теоретические и прикладные аспекты биохимии и биотехнологии растений: Сб. науч. тр. III Междунар. науч. конф., 14-16 мая 2008 г., Минск. – Минск: Издательский центр БГУ, 2008. – С. 291-295.
14. Митрофанова И.В., Соколов О.И., Ежов В.Н. Непрямой соматический эмбриогенез клематиса (*Clematis* sp.) // Труды Никит. ботан. сада. – 2007. – Т. 127. – С. 9-20.
15. Биотехнологическая система получения растений каладиума (*Caladium hortulanum* Birdsley.) через соматический эмбриогенез и органогенез / Митрофанова И.В., Соколова М.К., Митрофанова О.В., Иванова Н.Н., Челомбит С.В. // Труды Никит. ботан. сада. – 2007. – Т. 127. – С. 50-60.
16. Deverno L.L. An evaluation of somaclonal variation during somatic embryogenesis // Somatic Embryogenesis in Woody Plants. Vol. 1. / Eds. S.M. Jain, P.K. Gupta, R.J. Newton. – Netherlands, Dordrecht: Kluwer Acad. Publ., 1995. – P. 361-377.
17. Dodeman V.L., Ducreux G., Kreis M. Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis // J. Exp. Bot. – 1997. – Vol. 48, N 313. – P. 1493-1509.
18. Engels J.M.M., Visser L. A guide to effective management of germplasm collections: IPGRI Handbooks for Genebanks. – Rome, Italy: IPGRI, 2003. – N 6. – 174 p.
19. Gray D.J. Nonzygotic embryogenesis // Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises / Eds. R.H. Trigiano, D.J. Gray. – Tokyo: CRC Press, 1996. – P. 133-147.
20. Jain S.M., Ishii K. Micropropagation of Woody Trees and Fruits. – Netherlands: Dordrecht: Kluwer Acad. Publishers, 2003. – 852 p.
21. Litz R.E. Somatic embryogenesis in tropical fruit trees // Tissue Culture in Forestry and Agriculture / Eds. R.R. Henke, K.W. Hughes, M.P. Constantin, A. Hollaender. – New York:

Plenium Press, 1985. – P. 179-193.

22. Merkle S.A. Somatic embryogenesis in ornamentals // *Biotechnology of Ornamental Plants* / Eds. R.L. Geneve, J.E. Preece, S.A. Merkle. – Wallingford: CAB International, 1997. – P. 13-33.

23. Mitrofanova I., Mitrofanova O. Special features of somatic embryogenesis and plant regeneration of *Clematis in vitro* // *Propagation of Ornamental Plants - IPPS* / Eds. Iv. Iliev, P. Zelev, I. Tzvetkov. – Sofia: SEEK & SHARE: Balkanpress. – 2000. – P. 70-75.

24. Mitrofanova I.V., Mitrofanova O.V. Development of recipient system of woody subtropical plants *in vitro* // *Acta Universitatis Latveiensis. Biology.* – 2004. – Vol. 676. – P. 189-196.

25. Gene-pool collection in Nikitsky Botanical Gardens – National Scientific Center / Mitrofanova I.V., Movchan O.P., Shishkin V.A., Mitrofanov V.I. // *Bull. State Nikitsky Bot. Gardens.* – 2002. – N 85. – P. 30-33.

26. Mitrofanova I.V., Yezhov V.N. Plant regeneration of *Clematis* L. through somatic embryogenesis *in vitro* // *Bull. State Nikitsky Bot. Gardens.* – 2002. – N 86. – P. 16-19.

27. Nomura K., Komamine A.I. Physiological and biochemical aspects of somatic embryogenesis // *In vitro Embryogenesis in Plants. Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture* / Ed. T.A. Thorpe. – Vol. 20. – Dordrecht: Boston: London: Kluwer Academic Publishers, 1995. – P. 417-470.

28. Quoirin M., Lepoivre P. Etude de milieux adaptes aux cultures *in vitro* de *Prunus* // *Acta Hort.* – 1977. – N 78. – P. 437-442.

29. Reinert J. Morphogenese und ihre Kontrolle and Gewenbekulturen aus Carotten // *Naturwissenschaften.* – 1958. – Bd. 45. – S. 344-345.

30. Sharp W.R., Sondahl M.R., Caldas L.S., Marraffa S.B. The physiology of *in vitro* asexual embryogenesis // *Hort. Rev.* – 1980. – Vol. 2. – P. 268-310.

31. Steward F.C. Growth and development of cultivated cells. III. Interpretations of the growth from free cell to carrot plant // *Amer. J. Bot.* – 1958. – Vol. 45. – P. 709-713.

32. Thorpe T.A., Harry I.S. Application of tissue culture to horticulture // *Acta Hort.* – 1997. – N 447. – P. 39-49.

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ БАНКИ РАСТЕНИЙ В БОТАНИЧЕСКИХ САДАХ РОССИИ

О.И. МОЛКАНОВА, кандидат сельскохозяйственных наук
Учреждение Российской академии наук Главный ботанический сад
им. Н.В. Цицина РАН, Москва, Россия

Введение

Основной задачей ботанических садов в сохранении биологического разнообразия является комплексное изучение и сохранение генетических ресурсов природной флоры путем пополнения и поддержания коллекций живых растений, а также разработка оптимальных режимов долговременного хранения семян и меристем, обеспечивающих их жизнеспособность и стабильность. Особый интерес представляет изучение возможностей сохранения в генетических банках видов, естественное возобновление которых в природе ослаблено или затруднено. Для таких видов от устойчивости воспроизводства *ex situ* зависит сохранность их генофонда в целом [1, 3].

Эффективность сохранения генофонда растений *ex situ* может быть резко повышена путем создания генетических банков. По классификации Международного центра генетических ресурсов различают следующие их виды: 1) генетические банки семян; 2) банки растительного материала, сохраняемого *in vitro* (культуры меристем,

тканей семян в условиях замедленного роста); 3) полевые генные банки (специальные, обычно клоновые посадки плодовых и лесных пород, корневых и клубневых культур).

Большинство существующих генетических коллекций растений специализируется на коммерчески важных культурах, таких как кукуруза, пшеница, клевер, какао, авокадо и т. д. Большая часть образцов, собранных в генетических банках, представляет очень ограниченное число видов. По некоторым оценкам, лишь около 15% из них – дикорастущие родственники культурных растений [3, 5].

Целью настоящих исследований являлось создание репрезентативных генетических коллекций семян и меристем ценных и редких видов для сохранения биоразнообразия растений.

Объекты и методы исследования

В настоящей работе представлена информация о банках семян и меристем *in vitro* ботанических учреждений России, в которых сохраняются представители как культурных, так и дикорастущих видов.

Объектами создаваемых коллекций являются ценные и полезные виды растений, а также редкие и исчезающие виды 1-3 категории редкости. Исходным материалом для включения таксонов в генетический банк служили семена и вегетативные фрагменты органов растений. Материал получали как непосредственно из экспедиций и ботанических учреждений, так и по обмену семенами через делектусы.

Долговременное хранение семян дикорастущих видов растений проводится при трех, принятых в мировой практике режимах: +5°C; -20°C; -196°C [7].

Методика биотехнологических исследований основывалась на общепринятых классических приемах работы с культурами изолированных тканей и органов растений [2].

В качестве материала для выделения тотальной ДНК использовали апикальные части молодых побегов в фазе активного роста. Выделение ДНК из растительной ткани осуществляли по стандартной методике [6]. Для верификации коллекции *in vitro* использовали молекулярно-генетический анализ, основанный на анализе относительных генетических расстояний между проверяемыми образцами (микрклонами) и известными таксонами [6].

Результаты и обсуждение

При создании генетических банков были поставлены следующие задачи: 1) сбор, идентификация, описание и номенклатура образцов; 2) комплексное изучение материала с использованием анатомо-морфологических, биотехнологических, биохимических и молекулярно-генетических методов; 3) оптимизация условий длительного сохранения образцов в банках семян и меристем *in vitro* с целью дальнейшего устойчивого воспроизводства; 4) создание базы данных, включающей информацию по каждому конкретному образцу, с возможностью удаленного доступа посредством сети Internet.

В режиме глубокого замораживания (-196°C) постоянно хранятся семена более 150 дикорастущих видов (охраняемых, лекарственных, декоративных и др.). Установлено, что криоустойчивость видоспецифична, данный метод наиболее перспективный для сохранения жизнеспособности семян микробиотиков [7].

Наиболее представительные коллекции меристем *in vitro* находятся в Главном ботаническом саду им. Н.В. Цицина РАН (около 1000 таксонов) и ГУ «Волгоградский региональный ботанический сад» (более 250 наименований). Банки *in vitro* других ботанических учреждений РФ содержат не более 50 таксонов (Центральный сибирский ботанический сад, БИН им. В.Л. Комарова РАН и Ботанический сад-институт Уфимского научного центра РАН). Особенностью данных коллекций является то, что они взаимно дополняют друг друга.

Виды растений природной флоры должны быть представлены образцами из как можно большего числа популяций естественных мест произрастания. Это позволяет обеспечивать наиболее полную репрезентативность их генофонда. Так, например, в нашей коллекции *Belamcanda chinensis* (L.) DS представлена популяциями из 11 точек ареала, *Syringa josikaea* Jacq. – из 7.

Схема создания и структура банка меристем растений *in vitro* представлена на рис. 1.



Рис. 1. Схема создания и структура банка меристем растений *in vitro* ГБС РАН

Основные приемы сохранения генофонда *in vitro*, на наш взгляд, рационально применять только к тем таксонам растений, для которых разработаны легко воспроизводимые методы размножения [2, 4].

Сравнительное изучение биологических особенностей видов растений в коллекциях ботанических садов и в природных условиях послужило основой для разработки биотехнологических приемов их культивирования с целью дальнейшего воспроизводства.

Основной метод, используемый нами при размножении большинства таксонов *in vitro* – это активация уже существующих в растениях пазушных меристем. По мнению большинства исследователей, он считается наиболее надежным с точки зрения генетической стабильности размножаемых форм [2].

Известно, что существует комплекс факторов, каждый из которых в отдельности и в сочетании с другими оказывает значительное влияние на развитие клеточных и тканевых систем *in vitro*. Среди них наиболее важными являются тип экспланта, физиологическое состояние донорных растений, условия культивирования растений *in vitro*, состав питательных сред и др. При этом степень влияния каждого из названных факторов зависит от генотипа [8].

В настоящий момент в банке стерильных культур ГБС содержатся 304 вида и 659 культиваров из 42 семейств (табл.).

Значительное таксономическое разнообразие свидетельствует об универсальности использованной нами модели клонального микроразмножения растений.

Для подтверждения генетической идентичности растений, размноженных в условиях *in vitro* (клонов), с исходными растениями нами используется молекулярно-генетическое маркирование.

В настоящее время актуальность содержания коллекций с использованием культуры изолированных тканей и органов не вызывает сомнений. В основу таких способов положена способность поддержания жизнеспособности растений или их отдельных органов [8]. Наиболее распространенным является хранение в условиях минимального роста. Этим способом хранятся практически все существующие коллекции растений *in vitro*.

Таблица

Таксономический состав банка *in vitro* ГБС РАН

Семейство	Число		Семейство	Число	
	видов	культурваров		видов	культурваров
Aceraceae	3	-	Geraniaceae	-	15
Actinidiaceae	5	25	Gesneriaceae	-	35
Agavaceae	3	20	Glossulariaceae	4	11
Alliaceae	3	-	Hydrangeaceae	2	-
Amaryllidaceae	7	-	Iridaceae	5	12
Araceae	12	15	Lamiaceae	2	5
Araliaceae	3	-	Liliaceae	12	62
Aristolochiaceae	2	-	Lobeliaceae	1	-
Aspidiaceae	5	16	Loganiaceae	-	4
Asteraceae	9	53	Magnoliaceae	1	-
Begoniaceae	-	15	Moraceae	12	15
Betulaceae	5	-	Oleaceae	20	75
Berberidaceae	6	-	Orchidaceae	43	15
Brassicaceae	5	-	Paeoniaceae	10	-
Caprifoliaceae	2	16	Papaveraceae	3	-
Caryophyllaceae	2	-	Poaceae	70	-
Celastraceae	1	-	Ranunculaceae	5	42
Davalliaceae	2	4	Rosaceae	17	157
Dioscoreaceae	2	-	Schizandraceae	1	1
Ericaceae	12	46	Solanaceae	1	-
Fabaceae	5	-	Thymelaeaceae	1	-

На ряде таксонов были разработаны способы хранения при замедленном росте с применением осмотиков и ретардантов. При разработке подходов и методов сохранения отдельных видов растений должен быть использован дифференцированный подход с учетом биологических особенностей растений в конкретных условиях. Так оптимальными условиями хранения для растений семейств Ericaceae, Rosaceae и Oleaceae оказались $\frac{1}{2}$ питательной среды MS с добавлением 40 г/л сахарозы + 8 г/л маннита, пониженная температура (2-4°C) и слабая освещенность. Это позволило успешно хранить материал данных таксонов без пересадок в течение 18 месяцев (рис. 2, 3), а для представителей семейства Liliaceae и Amaryllidaceae – до 24 месяцев без пересадок.

В последнее время особое внимание уделяется вопросам сохранения редких и исчезающих видов растений. Применение современных методов для сохранения таксонов в генетических банках семян и меристем дает возможность получить необходимый материал без разрушения природных популяций, что особенно актуально для данной категории растений. В настоящее время коллекция редких и исчезающих растений *in vitro* в ГБС РАН содержит более 70 видов, а в ГУ ВРБС – 33 вида.

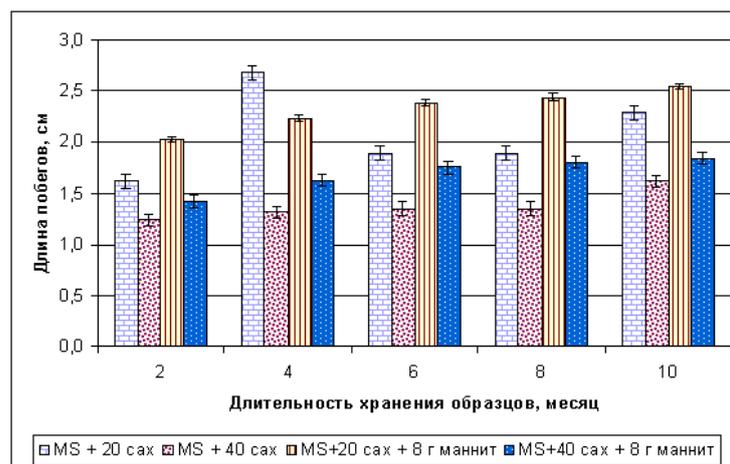


Рис. 2. Влияние состава питательной среды на длину побегов при длительном хранении сортов *Syringa vulgaris* L.

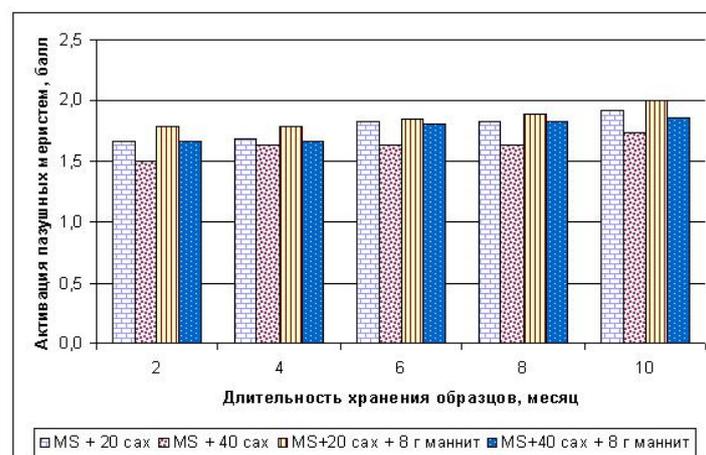


Рис. 3. Влияние состава питательной среды на активацию пазушных меристем при длительном хранении сортов *S. vulgaris* L.

За последнее время активность исследований, направленных на консервацию растительных ресурсов, возросла во всем мире. Создание банков семян и стерильных культур ценных и редких растений является одним из перспективных направлений сохранения биоразнообразия растений. Они служат страховым фондом и могут быть использованы для обмена между ботаническими учреждениями разных стран.

В дальнейшем на национальном и международном уровнях необходимо создание новых и укрепление существующих банков семян и меристем дикорастущих растений *in vitro*, а также расширение на их основе исследований в области оценки, изучения и сохранения растительных ресурсов.

Выводы

1. Отбор образцов и формирование *core* – коллекций в генетических банках следует проводить с использованием современных методов анализа генетического разнообразия.
2. При разработке приемов и методов сохранения отдельных таксонов растений должен быть использован дифференцированный подход с учетом биологических особенностей растений.
3. Особое внимание уделяется репрезентативности и поддержанию генетической чистоты таксонов, сохраняемых *in vitro*.

4. Наиболее перспективным являются сохранение асептических растений в режиме от 3 до 7°C, а семян – в режиме глубокого замораживания при –196°C.

Список литературы

1. Использование методов биотехнологии растений для сохранения и изучения биоразнообразия мировой флоры / Белокурова В.Б., Литвак Е.В., Майстров П.Д., Сикура Й.Й., Глеба Ю.Ю., Кучук Н.В. // Цитология и генетика. – 2005. – № 1. – С. 41-51.
2. Бутенко Р. Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнология на их основе. – М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. – 160 с.
3. Разработка принципов сохранения и воспроизводства генетических фиторесурсов / Виноградова Ю.К., Горбунов Ю.Н., Макридин А.И., Молканова О.И., Швецов А.Н. // Фундаментальные основы управления биологическими ресурсами. – М.: Товарищество научных изданий КМК, 2005. – С. 343-350.
4. Высоцкий В.А. Биотехнологические методы в системе производства оздоровленного посадочного материала плодово-ягодных культур: Автореф. дисс. ... докт. биол. наук: 06.01.07. – Москва, 1998. – 44 с.
5. Сохранение растений в генетических банках *in vitro*: преимущества и недостатки / Мамаева Н.А., Ветчинкина Е.М., Горбунов Ю.Н., Молканова О.И. // Бюллетень ГБС. – 2008. – Вып. 194. – С. 141-149.
6. Использование молекулярно-генетических маркеров для верификации коллекций *in vitro* сирени обыкновенной (*Syringa vulgaris* L.) / Мельникова Н.В., Борхерт Е.В., Мартынов С.П., Окунева И.Б., Молканова О.И., Упелниек В.П., Кудрявцев А.М. // Генетика. – 2009. – Т. 45, № 1. – С. 97-103.
7. Тихонова В.Л. Долговременное хранение семян // Физиология растений. – 1999. – Т. 46, № 3. – С. 467-476.
8. Morel L. Meristem culture techniques for the long storage of cultivated plants // International biological program 2: Crop genetic resources for today and tomorrow. – New York: Cambridge Univ. Press. – 1975. – P. 327-333.

ФИТОПАТОЛОГИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ ГЕНОФОНДА ДЕКОРАТИВНЫХ РАСТЕНИЙ В ЛИТВЕ

М. НАВАЛИНСКЕНЕ, *габилитированный доктор биомедицинских наук*;

М. САМУЙТЕНЕ, *доктор биомедицинских наук*;

Б. ГРИГАЛЮНАЙТЕ, *доктор биомедицинских наук*

Институт ботаники АН Литвы, Вильнюс, Литва

Р. ЮОДКАЙТЕ, *доктор биомедицинских наук*;

Г. ШТУКЕНЕНЕ, *доктор биомедицинских наук*

Ботанический сад Вильнюсского университета, Вильнюс, Литва

С. ДАПКУНЕНЕ, *доктор биомедицинских наук*

Генобанк растений и БСВУ, Вильнюс, Литва

Введение

В Литве, начиная с 1994 г., на государственном уровне была утверждена программа по исследованию генетических ресурсов культурных растений. В осуществлении данной программы приняли участие несколько исследовательских институтов и учреждений. С 1998 г. в рамки исследований были включены декоративные растения, и программа была переименована в «Генофонд». В ботаническом саду Вильнюсского университета (БСВУ) основной целью было сохранение уже существующих коллекций декоративных растений, а начиная с 1992 г. в коллекции включены сорта и гибриды, созданные

литовскими селекционерами. Коллекции формируются по систематическим, биологическим, экологическим и эстетическим принципам. Создание и сохранение национальных коллекций осуществляется по группам растений. При отборе растений большое внимание уделяется морфологическим и декоративным качествам, а также фитосанитарному состоянию индивидумов [7, 8]. Основное внимание было уделено сортам и гибридам литовской селекции, относящимся к родам *Dahlia* Cav. (георгин, 198 сортов и гибридов), *Gladiolus* L. (гладиолус, 110 с. и г.), *Iris* L. (ирис, 180 с. и г.), *Paeonia* L. (пион, 91 с. и г.) и *Tulipa* L. (тюльпан, 30 с.).

Целью данной работы было выявление и идентификация вирусов и фитопатогенных грибов, чаще всего встречающихся на перечисленных декоративных растениях.

Объекты и методы исследования

Материал для экспериментальных исследований был собран в коллекциях декоративных растений БСВУ. Обследования растений проводили два раза в течение вегетационного периода. Собранный для исследования материал анализировали в лабораторных и тепличных условиях.

Для идентификации вирусов применяли методы растений-индикаторов [4], электронной микроскопии (ЭМ) [9, 17], серологический – DAS-ELISA [6, 9]. Фитопатогенные грибы определяли, руководствуясь монографиями и справочниками [2, 3, 10, 11, 12, 16]. Были использованы следующие растения-индикаторы: *Amaranthus caudatus* L., *A. paniculatus* L., *Atriplex hortensis* L., *Celosia argentea* L., *Chenopodium amaranticolor* Coste et Reyn., *C. ambrosioides* L., *C. murale* L., *C. quinoa* Willd., *C. urbicum* L., *Cucumis sativus* L., *Gomphrena globosa* L., *Lycopersicon esculentum* Mill., *Nicotiana glutinosa* L., *N. rustica* L., *N. tabacum* L., *Petunia hybrida* Vilm., *Pisum sativum* L., *Phaseolus vulgaris* L., *Physalis floridana* Rybd., *Tetragonia expansa* Murr., *Verbesina encelioides* Benth et Hook. Для повышения эффекта механической передачи вирусной инфекции на растения-индикаторы инокулюм приготавливали, растирая листья исследуемых растений в 0,1 М фосфатном буфере pH 7,25 с вирусстабилизирующими добавками. Наличие вирусных частиц в препаратах, приготовленных из пораженных листьев исследуемых растений и заразившихся растений-индикаторов, выявляли методом ЭМ. Препараты просматривали в микроскопе JEM-100 S (Япония) при увеличении 25000.

Результаты и обсуждение

В результате наших исследований установлено, что в Литве георгины (*Dahlia pinnata* Cav.) были поражены 5 вирусами: огуречной мозаики (*Cucumber mosaic cucumovirus*, CMV), пятнистого увядания томатов (*Tomato spotted wilt tospovirus*, TSWV), кольцевой пятнистости томатов (*Tomato ringspot nepovirus*, ToRSV), некроза табака (*Tobacco necrosis necrovirus*, TNV) и мозаики георгин (*Dahlia mosaic caulimovirus*, DaMV) [15]. Основным вирусом, который был идентифицирован в коллекциях и наносит самый большой ущерб, является DaMV. Симптомы заболевания проявляются на всем растении. Сильно пораженные растения – карликовые, листья деформированные, с выпуклостями, на них светло-зеленые, хлоротичные различной формы пятна. У некоторых сортов проявляется пестролепестность цветков (рис. 1). Основным индикатором для DaMV является *Verbesina encelioides*, реагирующая системной реакцией. В ЭМ препаратах обнаружены изометрические вирусные частицы диаметром 50 нм, о чем свидетельствуют данные и других авторов [1]. Из грибных заболеваний установлены сапрофитные грибы родов: *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl., *A. tenuissima* (Kunze) Wiltshire, *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) G.A. de Vries.

Из растений гладиолусов (*Gladiolus communis* L.) были идентифицированы 5 вирусов: желтой мозаики фасоли (*Bean yellow mosaic potyvirus*, BYMV), CMV, TNV, погрелковости

табака (*Tobacco rattle tobnavirus*, TRV), кольцевой пятнистости табака (*Tobacco ringspot nepovirus*, TRSV) [14]. В коллекциях доминирующими вирусами оказались BYMV и CMV. Почти всегда отмечена смешанная инфекция вирусов. Симптомы поражения отмечены не только на листьях, но и на цветках (рис. 2). Основными индикаторами для BYMV являются *Phaseolus vulgaris* и *Pisum sativum*. В ЭМ препаратах обнаружены нитевидные частицы 720 нм длины, типичные для BYMV, и изометрические – диаметром 30 нм, характерные для CMV, что совпадает с данными других исследователей [18]. На листьях гладиолусов были обнаружены *Alternaria alternata*, *A. tenuissima*, *Cladosporium herbarum* (Pers.) Link, *C. cladosporioides*, *Fusarium culmorum* (W.G.Sm.) Sacc., *Botrytis gladiolorum* Timmerm. (*Botriotinia draytonii* (Buddin & Wakef.) Server), *Heterosporium echinulatum* Bewrk.



Рис. 1. Симптомы DaMV на георгине



Рис. 2. Гладиолус, пораженный вирусами

На ирисах в Литве идентифицированы 7 вирусов: мозаики ириса (*Iris mild mosaic potyvirus*, IMMV), ToRSV, BYMV, CMV, TRV, TRSV, мозаики табака (*Tobacco mosaic tobamovirus*, TMV) [15]. В коллекциях основным из них является IMMV, который поражает листья, а у некоторых сортов и гибридов и цветки (рис. 3). Вирус очень трудно передается на растения-индикаторы, что характерно для потивирусов [4]. Лишь *S. quinoa* реагировала местной реакцией в виде местных повреждений. В ЭМ препаратах определены нитевидные частицы 750 нм длины, типичные для IMMV [4]. Из грибных заболеваний на листьях всех сортов и гибридов были установлены *H. echinulatum*, *F. sambucinum* Fuckel var. *minus* Wollenw., *Fusarium* spp.



Рис. 3. Симптомы IMMV на ирисе



Рис. 4. Пион, пораженный TRV

На пионах (*Paeonia perigrina* Mill.) идентифицирован TRV, который вызывает очень яркие симптомы на листьях (рис. 4), интенсивность которых зависит от сорта пионов. В коллекции БСВУ TRV идентифицирован лишь на сорте Garbė Motinai и некоторых гибридах, хотя в частных насаждениях встречается очень часто. В ЭМ

препаратах обнаружены палочковидные частицы 45–115 и 200 нм длины, типичные для данного вируса [5]. На всех сортах цветков пионов после цветения выявлено грибное заболевание *Botrytis paeoniae* Oudem. Листья некоторых сортов были поражены *Alternaria alternata*, *Cronartium flaccidum* (Alb. et Schw.) Wint., *Ramularia* sp.



Рис. 5. Симптомы TBV на тюльпане

Из тюльпанов были идентифицированы 6 вирусов: пестролепестности тюльпанов (*Tulip breaking potyvirus*, TBV), TNV, TRV, CMV, TMV, TRSV, из которых основным и наиболее вредоносным является TBV [13]. Типичным симптомом является пестролепестность цветков, однако на листьях некоторых сортов (особенно с желтыми, красными и белыми цветками) обнаружены светло-зеленые штрихи и пятна ярко выделяющиеся ранней весной (рис. 5). Вирус обнаружен на всех обследуемых сортах тюльпанов.

В ЭМ препаратах обнаружены нитевидные частицы вируса длиной около 750 нм, что соответствует данным других авторов [4]. В зависимости от погодных условий, особенно в дождливые годы, на некоторых сортах обнаружен *Botrytis tulipae* Lind. Вирус обнаружен на всех обследуемых сортах тюльпанов. В ЭМ препаратах обнаружены нитевидные частицы вируса длиной около 750 нм, что соответствует данным других авторов [4]. В зависимости от погодных условий, особенно в дождливые годы, на некоторых сортах обнаружен *Botrytis tulipae* Lind.

Выводы

1. В Литве с 1992 г. в коллекции декоративных растений включены сорта и гибриды, созданные литовскими селекционерами, а с 1998 г. включены в программу «Генофонд», ведется постоянный фитопатологический контроль.

2. У растений георгин выделены и идентифицированы 5 вирусов, основным из которых является *Dahlia mosaic caulimovirus*. Из грибных заболеваний определены *Alternaria alternata*, *A. tenuissima*, *Cladosporium cladosporioides*.

3. Установлено, что гладиолусы были поражены 4 вирусами, чаще встречается *Bean yellow mosaic potyvirus*. Были определены как сапрофитные, так и патогенные грибы – *Fusarium culmorum*, *Botrytis gladiolorum*, *Heterosporium echinulatum*.

4. На ирисах идентифицированы 7 вирусов, основным из которых является *Iris mild mosaic potyvirus*. Из грибных заболеваний – *H. echinulatum*, *F. sambucinum*, *Fusarium* spp.

5. Из пораженных растений пионов идентифицирован *Tobacco rattle tobnavirus*, однако данный вирус в коллекции встречается редко. На цветках после цветения обнаружен *Botrytis paeoniae*, на отдельных листьях – *Alternaria alternata*, *Cronartium flaccidum*, *Ramularia* sp.

6. В коллекции на всех сортах тюльпанов определен *Tulip breaking potyvirus*. В зависимости от погодных условий на некоторых сортах обнаружен *Botrytis tulipae*.

Работа выполнена при поддержке Государственного Фонда по науке и просвещению Литвы, договор № V-25/2009. Авторы выражают благодарность.

Список литературы

1. Albouy J. *Dahlia // Virus and Virus-like Diseases of Bulb and Flower Crops / Eds. G. Loebenstein, R.H. Lawson, A.A. Brunt. – New York: Wiley, 1995. – P. 265-273.*
2. Arx J.A. *The genera of fungi sporulating in pure culture. – Hirschberg: Publisher Vaduz J. Cramer, 1981. – 410 p.*
3. Braun U., Melnik V.A. *Cercosporoid fungi from Russia and adjacent countries. – St.-Petersburg: Pensoft Publishers, 1997. – 112 p.*
4. *Viruses of Plants. Descriptions and Lists from the VIDE Database / Brunt A.A., Crabtree K., Dallwitz M.J., Gibbs A.J., Watson L. – Cambridge: University Press, 1996. – 1484 p.*
5. Chang M.U., Doi Y., Yora K. *A rod-shaped virus found in the peony ringspot // Ann. Phytopath. Soc. Japan. – 1976. – Vol. 42, N 3. – P. 325-328.*
6. 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. – Vol. 34. – P. 475-483.*
7. Dainauskaite D., Indrisiunaite G. *Genetic resources of field herb plants and their preservation problems in Lithuania // Baltic Botanic Gardens in 1996 Estonia, Latvia, Lithuania. – Ryga, 1997. – P. 54-57.*
8. *Lithuanian peonies for town parterres / Dapkūnienė S., Motiejūnaitė O., Varkulevičienė J., Pakulienė J., Guseva V., Mažeikienė I. // Formation of City Green Places'2008: flowers and flower gardens. – Klaipėda: Klaipėdos universiteto leidykla, 2008. – P. 24-25.*
9. Dijkstra J., de Jager C.P. *Practical Plant Virology. Protocols and Exercises. – Berlin: Springer, 1998. – 459 p.*
10. Ellis M.B. *More Dematiaceous Hyphomycetes. – Kew; Surrey; England: CMI, 1976. – 507 p.*
11. Gerlach W., Nirenberg H., Eckart I. *The genus Fusarium – a pictorial atlas. – Berlin: Institute für Microbiologie; 1982. – 40 p.*
12. Grigaliūnaitė B. *Lietuvos grybai III, Milteniečiai 1 (Erysiphales). – Vilnius: Mokslo ir Enciklopedijų leidybos institutas, 1997. – 197 p.*
13. *Selection and presentation of tulip (Tulipa L.) cultivars to Lithuanian Plant Genetic Resources / Juodkaitė R., Baliūnienė A., Naujalis J. R., Navalinskienė M., Samuitienė M. // Biologija. – 2008. – Vol. 54, N 2. – P. 139-146.*
14. Navalinskienė M., Samuitienė M. *Viral diseases of flower plants. 15. Identification of viruses affecting gladiolus (Gladiolus L.) // Biologija. – 2001, Vol. 47, N 2. – P. 31-35.*
15. Navalinskienė M., Samuitienė M. *Dekoratyvinių augalų virusinės ligos ir jų sukėlėjai Lietuvoje. – Kaunas: Lututė, 2006. – 256 p.*
16. Nelson P.E., Toussoun T.A., Marasas W.F.O. *Fusarium species: an illustrated manual for identification. – Pennsylvania: State University Press, 1983. – 193 p.*
17. *Methods of preparation for electron microscopy / Robinson D.G., Ehlers U., Herken R., Herrman B., Mayer F., Shurmann F.-W. – Berlin: Springer, 1987. – 190 p.*
18. Stein A. *Gladiolus // Virus and Virus-like Diseases of Bulb and Flower Crops / Eds. G. Loebenstein, R.H. Lawson, A.A. Brunt. – New York: Wiley, 1995. – P. 281-292.*

SAFFLOWER BREEDING, EVALUATION AND GENEPOOL MAINTENANCE IN THE CZECH REPUBLIC

JIŘÍ UHER, *Dr. Ing., Associate professor*

Mendel University of Agriculture and Forestry at Brno, Faculty of Horticulture, Lednice, the Czech Republic (EU)

Introduction

Safflower (*Carthamus tinctorius* L.) is an ancient crop, grown for more than 3000 years as dyeing, oilseed producing, and medical plant. In last decades, this plant also establishes as a cut flower – it ranked 50th position between the most grown cut flowers and contain more than 60 ornamental varieties [24]. A longtime cultivation across millenniums in different climates with purposive selections gave birth to enormous number of landraces that differs extremely in morphological and biological characteristics. Contrary to records of gene erosion in last few decades [2, 16], the diversification of regional landraces grown in regions of S. E. Asia and N. Africa is still very large, and in collection of world genebanks have take several thousands specimens.

Large evaluation of morphological data sets in the safflower world germplasm was initiated by Ashri [2, 3]. He was evaluating habitual characters, given by height of the plant, the length, angle, and localization of branching, the leaves shape and spininess, the size and number of the flower heads. He examined the flower colour, the size of outer involucral bracts (OIB) and their spininess, and some seeds characters (number, size and oil content). Later, on the basis of these records, Ashri & al. [4] elevate detailed classificator for safflower published in IBPGR (now Bioversity International), containing of phenological descriptors together with 54 morphological descriptors, and 38 descriptors for plants sensitivity against stress factors, insects, and diseases. Two years later, Vachruseva & Ivanenko [26] outgoing from valuating of middle Asia ecotypes of safflower make descriptor with 36 descriptors for morphological and yield characters, and 15 phenological descriptors. However, the practical use has shown such classificators somewhat complicated, and some later authors [6, 8, 11, 16, 18] have been working rather with their own more reduced classificators. However, simultaneously the more complex projects were proposed, mostly for phenological data [22, 25].

In the Czech Republic, ornamental and oilseed cultivars are maintained by National seed genebank at the Research Institute of Crop Production, Prague (in cooperation with MUAF Brno and RIFC Troubsko), and 37 safflower varieties or landraces have been registered by IS EVIGEZ (National programme for plant genetic resources conservation and utilization). However, the collection is ever evolved. RGZ (Czech National Board on Plant Genetic Resources) safflower classificator [10] consisting of 54 morphological, phenological, and biochemical descriptors, was proposed in the project that take in the account all publications mentioned above, and bring ability for safflower evaluation in the spectre which can be used for evaluation both ornamental and technical advantages of the safflower varieties.

Objects and methods of investigation

A germplasm collection of safflower, containing 48 ornamental and 20 oilseed varieties, and 72 landraces (Table 1) has been evaluated in the 1994-2006 for 30 morphological characters on the basis of RGZ safflower classificator [10] and, before composition of this, on the modified IPGRI descriptors. Seeds were sown on rows spaced 0.4 m into sandy-loam soil, in the 18th to 22th week, at Lednice (climatic conditions of the Pannonian thermophyticum). The seed quantity (6 g achenes for 2 square meters) agrees with 120 plants for this area, aproximately. Recorded data were tested for character correlations, and for selection of the plants for breeding.

Table 1

Commercial varieties, and denominated landraces under evaluation

Variety / landrace	Origin	Variety / landrace	Origin
AC Stirling	Canada	Orangeköpfchen	Germany
AC-1	Canada	Orange Grenade	Netherlands
Alarosa	Spain	Orange Pinsel	Switzerland
Alba	Netherlands	Oranjegeel	Netherlands
Alcaidia	Spain	Oranžový	Czech
Brněnka	Czech	Sabina	Czech
Cremewit	Netherlands	Saffola 317	Spain
C/W 74	U.S.A.	Sepassa P202	Spain
Červená SEVA	Czech	SM 8	Spain
Donkeroranje Select	Netherlands	SM 9	Spain
Draa Basse Tige	Morocco	Sophia	Netherlands
Draa Haute Tige	Morocco	Sironaria	U.S.A.
Duhuanghonghua	China	Selektion Gelb	Germany
ESPO S&G 101	Netherlands	Selektion Weiss	Germany
ESPO S&G 103	Netherlands	Summersun	Germany
Feuerschopf	Germany	S-8 Select R.A.	Morocco
Finch	U.S.A.	Tachenghonghua	China
Girard	Canada	Tanegashima	Japan
Gladki Borowski	Poland	Tangerine	Netherlands
Goldköpfchen	Germany	Taškentskij 51	Russia
Goldschopf	Germany	Toupet Jaune	Switzerland
Inerme du Draa	Morocco	Toupet Orange	Switzerland
Inerme du Marrakech	Morocco	Treibgelb	Germany
Inerme R.A.	Morocco	Treibgold	Germany
Ingrid	Netherlands	Treiborange	Germany
Kanagawa	Japan	Treibweiss	Germany
Kinko	Japan	Vierka	Czech
Lasting Orange	Netherlands	Vogro	Netherlands
Lasting White	Netherlands	Wakayama	Japan
Lasting Yellow	Netherlands	Weishanhonghua	China
Lesaf 34 C	Canada	Weisser Pinsel	Germany
Miljutinskij 114	Russia	White Grenade	Netherlands
Mlochowski	Poland	Xiapuhonghua	China
Montola 2000	Canada	Xinjianghonghua	China
Mogami	Japan	Yangbihonghua	China
Morlin	Canada	Yellow Grenade	Netherlands
Moyen du Draa	Morocco	Zanzibar	Netherlands
Nebraska 8	U.S.A.	Zitronenköpfchen	Germany
Orangefeuer	Germany	Žlutá SEVA	Czech

Results and discussion

Data for commercial varieties have been discussed earlier [23]: high-rated characters like spinnines absence, appressed branching or vermilion-red flower colour, are linked with the plant height, and the late flowering. Height of plants and branch number, even though genetically determined, was consistently with a number of records [1, 7, 9, 19, 20] affected with the plant density date of sowing, and number of factors climatic or edafic. The branch number fluctuated dependently on the environmental factors, but there was find correlations between plant height, branch length, spines colour, and earliness of flowering. However, Ashri [2] don't confirm the correlations between branch length, plant height and earliness of flowering, and other authors [16,

18] do not find any correlations between height of the plant and number of flowers; and even, Khidir [12] find a negative correlations. The appressed branching, highly rated by growers, was recorded in two samples. This character is unusual in safflower, and is associated with ideotype for areas where water deficit is no restrictive factor for increasing of plant density, as one of the determinative harvest component [15]. For greenhouse cut-flower culture, however, both of those samples were too late blooming, and again, no such early landraces have been found between hundreds of Iranian, and Chinese genotypes by other authors [16].

High genotypes either inclinate to other high-rate characters like large flower heads, round involucral bracts, and suppression of spininess. Excepting of spininess character, only Khidir [12] come to like results; Mehtre & al. [18] do not confirm such relationships, and Ashri & al. [5] find them in the Indian samples only. Leaf spininess seems to be linked with increasing bracts length. According to results published by Kupcov [14], Knowles [13], and Ahri [2], in early growth stages remain leaves spineless in all genotypes, whereas number and length of spines have increasing tendency toward the plant apex. Number and size of leaves were not exactly examined, but at soils on different water capacity, differences in leaf number and size were apparent. Salera [20] find leaf size increasing with extending the row spaces. Kupcov [14] and Li & al. [16] find the leaf size also of genetic dependence.

The flower colour seems to be closely associated with OIB morphology and plant spininess (Tabl. 2, Tabl. 3). Generally, strongly spiny varieties are having the florets yellow, on the inert lines was flowers orange or vermilion-red.

Table 2

Correlations of the OIB characters with other characters under evaluation

Characteristic	OIB morphology	OIB size	OIB spininess	Spines localization	Spines color
leaf shape	-0,392**	0,236*	0,460**	0,473**	0,337**
leaf margin	-0,441**	0,301**	0,808**	0,410**	0,165
leaf spininess	-0,619**	0,494**	0,926**	0,661**	0,390**
head shape	0,087	0,043	-0,136	-0,207*	-0,291*
head size	0,239*	-0,063	-0,395**	-0,297**	-0,055
OIB morphology		-0,626**	-0,639**	-0,497**	-0,406**
OIB size	-0,626**		0,513**	0,543**	0,470**
OIB spininess	-0,639**	0,513**		0,644**	0,354**
spines localization	-0,497**	0,543**	0,664**		0,651**
spines color	-0,406**	0,470**	0,354**	0,651**	
fresh flower color	0,407**	-0,297**	-0,373**	-0,355**	-0,315**
dried flower color	0,343**	-0,287**	-0,220*	-0,319**	-0,248*
pollen production	-0,041	0,057	0,076	-0,182	-0,061
flower tube length	0,030	-0,217*	0,228*	-0,393**	-0,435**
petal notching	0,398**	-0,358**	-0,230*	-0,394**	0,335**
plant height	0,493**	-0,473**	-0,323**	-0,632**	-0,669**
branching position	-0,089	0,135	0,103	-0,050	-0,118
branch angle	-0,254*	0,137	0,174	0,131	0,199
branch length	0,015	0,040	0,020	-0,115	-0,225*
branch number	0,248*	-0,256*	-0,049	-0,394**	-0,416**

There are not discovered the totally spineless yellow varieties in evaluation (one with notably suppressed spininess was selected for breeding of ornamental variety 'Brněnka', registered by MUAF in the 1998), whereas strongly spiny genotypes with the deep orange flowers are more usual, and also the earlier authors [13, 16, 21] mentioned them frequently. All the white flowered strains belongs to relatively uniform group of early, weakly spiny genotypes, although Kupcov [14] and Knowles [13] reported about strongly spiny and spineless white-flowered varieties as well, and

Li & al. [16] find out the most of white flowered landraces to showing a strongly spininess. The vermilion-red flowers have been found in two nearly spineless genotypes only. One of them, a highly heterogeneous Iranian race from IPK Gatersleben, was selected for bulk-method breeding of the medium-early variety 'Vierka' for dried flower production. The infrequent find red flowers also Ashri [3] in germplasm collection containing nearly 2000 lines originating from all the safflower growing areas in the world. However, high ratio of red flowering landraces was recorded by Li & al. [16] in their collections from Afghanistan, Iran, Israel, Egypt, Ethiopia and China.

Table 3

Correlations of the flower characters with other characters under evaluation

Characteristic	Fresh.flower color	Dried flower color	Pollen production	Flower tube length	Petal notching
leaf shape	-0,323**	-0,258*	0,034	-0,037	-0,236*
leaf margin	-0,210*	-0,050	0,022	0,290*	-0,099
leaf spininess	-0,364**	-0,195	0,042	0,182	-0,265*
head shape	0,268**	0,299**	-0,205*	0,187	0,292**
head size	0,285**	0,232*	0,016	-0,221*	0,129
OIB morphology	0,407**	0,343**	-0,041	0,030	0,398**
OIB size	-0,298**	-0,286**	0,057	-0,217*	-0,358**
OIB spininess	-0,373**	-0,220*	0,072	0,228*	-0,230*
spines localization	-0,355**	-0,319**	-0,181	-0,393**	-0,394**
spines color	-0,315**	-0,248*	-0,061	-0,435**	-0,335**
fresh flower color		0,811**	-0,252*	0,156	0,348**
dried flower color	0,811**		-0,102	0,237*	0,334**
pollen production	-0,252*	-0,102		-0,115	0,077
flower tube length	0,156	0,237*	-0,115		0,242*
petal notching	0,348**	0,334**	0,077	0,242*	
plant height	0,384**	0,383**	0,036	0,499**	0,545**
branching position	0,076	0,075	-0,022	0,333**	0,065
branch angle	-0,117	-0,194	-0,111	-0,010	-0,207*
branch length	0,145	0,118	-0,119	0,311**	0,057
branch number	0,197	0,195	-0,021	0,656**	0,286**

$\alpha = 0.01: 0.267^{**}; \alpha = 0.05: 0.205^{*}$

Acknowledgement

Seeds for evaluation were provided by seed companies Benary (Hannover-Münden, D), Walz Samen (Stuttgart, D), Hans Meisert Samenzucht (Hannover-Buchholz, D), Kieft Bloemzamen (Venhuizen, NL), Hammer Bloemzaden (Zwijndrecht, NL), Leen de Mos Bloemzaden (s'Gravensande, NL), Wyss Samen & Pflanzen (Zuchwil-Solothurn, H), Petunia Černý (Jaroměř, CZ), Seva Valtice (CZ), and by genebanks of VÚRV Piešťany (SK), Research St. Agriculture Canada (Lethbridge, Canada), and IPK Gatersleben (D). Other samples were given by Institute of Botany CAS (Beijing, China) and Medicinal Plant Research Station (Tsukuba, Japan). The evaluation proceed by support of Mze ČR E - 97/01 - 3160 - 0200 and MSM 435100002 MŠMT ČR projects.

References

1. Abel G.H. Effects of irrigation regimes, planting dates, nitrogen levels, and row spacing on safflower cultivars // *Agronomy Journal*. – 1976. – V. 68, N 3. – P. 448-452.
2. Ashri A. Divergence and evolution in the safflower genus, *Carthamus* L. // Final Research Report P.L. 480, U.S.D.A. Project No.A10-CR-18, Grant FG-IS-234. – The Hebrew University of Jerusalem, Rehovot, 1973. – 180 p.

3. Ashri A. Evaluation of the germplasm collection of safflower, *Carthamus tinctorius* L. 5. Distribution and regional divergence for morphological characters // *Euphytica*. – 1975. – V. 24, № 3. – P. 651-659.
4. Safflower descriptors / Ashri A., Anishetty N.M., Bozzini A., Davis A.M., Heaton T.C., Klisiewicz J.M., Knowles P.F., Rajan S., Singh R.B., Yu S.X. – IBPGR: Rome, 1983. – 22 p.
5. Ashri A., Urie A.L., Zimmer D.E. Evaluation of the germplasm collection of safflower, *Carthamus tinctorius* L. 7. Variability of capitulum width and outer involucre bracts dimensions // *Euphytica*. – 1976. – V. 25, № 1. – P. 225-229.
6. Evaluation of safflower germplasm for ornamental use / Bradley V.L., Guenther R.L., Johnson R.C., Hannan R.M. // *Perspectives on new crops and new uses*. Jannick J. (ed.) – ASHS Press: Alexandria: VA, 1999. – P. 433-435.
7. Esendal E. The effect of phosphorus, nitrogen, and row-spacing on the yield and some plant characters of the safflower (*Carthamus tinctorius* L.) // *Sesame and Safflower Newsletter*. – 1986. – V. 2. – P. 96-98.
8. Gutierrez-Más J.C., Visglerio G.G., Mérida-Silva J. Identification de cultivares de cartamo, *Carthamus tinctorius* L.: Importancia taxonomica de caracteres // *Information Tecnica Economica Agraria*. – 1987. – V. 69. – P. 76-85.
9. Hiremath S.M., Chittapur B.M., Hosmani N.M. Effect of population and planting geometry on the seed yield of late sown safflower under rainfed condition // *Karnataka Journal of Agricultural Sciences*. – 1993. – V. 6, № 3. – P. 294-296.
10. Hofbauer J., Uher J., Faberova I. Klasifikator (descriptor list) *Carthamus tinctorius* L. – *Geneticke zdroje 74: RGZ: VURV Praha*, 2001. – 8 p.
11. Jaradat A.A., Shahid M. Patterns of phenotypic variation in a germplasm collection of *Carthamus tinctorius* L. from the Middle East // *Genetic Resources and Crop Evolution*. – 2007. – V. 53. – P. 225-296.
12. Khidir M.O. Genetic variability and interrelationship of some quantitative characters in safflower // *Journal of Agricultural Sciences*. – 1974. – V. 83, № 3. – P. 197-202.
13. Knowles P.F. Centers of plant diversity and conservation of crop germplasm safflower // *Economic Botany*. – 1969. – V. 23, № 5. – P. 324-329.
14. Kupcov A.I. Geograficheskaya izmenchivost vida *Carthamus tinctorius* L. // *Trudy po priklad. botanike, genetike i selekcii*. – 1932. – V. 9, № 1. – P. 99-181. (in Russian)
15. Leon R., Knowles P.F. Inheritance of apressed branching in safflower // *Crop Science*. – 1964. – V. 4, № 3. – P. 441.
16. Li D.J., Zhou M.D., Ramanatha-Rao V. Characterization and evaluation of safflower germplasm – Geological Publishing House: Beijing, 1993. – 260 p.
17. Li D.J., Mündel H.H. Safflower. *Carthamus tinctorius* L. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. 7. – IPK Gatersleben: IPGRI Rome, 1996. – 83 p.
18. Evaluation of exotic safflower germplasm collected in China for agromorphological characters / Mehtre S.P., Akashe V.B., Koli B.D., Veer D.M., Patil M.V.V. // *Sesame and Safflower Newsletter*. – 1995. – V. 10. – P. 79-84.
19. Nasr G.D., Kathkuda N., Tannir L. Effects of N-fertilization and population rate-spacing on safflower yield and other characteristics // *Agronomy Journal*. – 1978. – V. 70, № 7-8. – P. 683-684.
20. Salera E. Influenza dell'epoca di semina e della densita d'investimento sulla produzione dell cartamo (*Carthamus tinctorius* L.) // *Agricoltura Ricerca*. – 1995. – V. 160, № 4. – P. 35-42.
21. Seeger C.J.P. Oil plants in Ethiopia, their taxonomy and agricultural significance – Central Agriculture Publishing Doc.: Wageningen, 1983. – 368 p.
22. Safflower plant development stages / Tanaka D.L., Riveland N.R., Bergman J.W., Schneiter A.A. // *Proc. 4th ISC – Safflower: a multipurpose species with unexploited potential and world adaptability*. Corleto A., Mündel H.-H. (eds.). – Adriatica Editrice: Bari, 1997. – P. 179-

180.

23. Uher J. Comparison of safflower varieties (*Carthamus tinctorius*) in view of floricultural utilization // *Zahradnictví*. – 1995. – V. 22, № 3. – P. 89-94.

24. Uher J. Safflower in world floriculture: a review // *Sesame and Safflower Newsletter*. – 2005. – V. 4, № 3. – P. 76-80.

25. Uslu N. Description of development stages in safflower plant // *Proc. 4th ISC: Safflower: a multipurpose sp. with unexploited potential and world adaptability*. Corleto A., Mündel H.-H. (eds.). – Adriatica Editrice: Bari, 1997. – P. 248-251.

26. Vakhrusheva T.E., Ivanenko E.N. Klassifikator vida *Carthamus tinctorius* L. (Safflower krasilnyj). – NIIR imeni N.I. Vavilova: Leningrad, 1985. – 16 p. (in Russian)

СПОНТАННАЯ МУТАЦИОННАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ КОЛИЧЕСТВЕННЫХ ПРИЗНАКОВ И ЕЁ ГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ НА ПРИМЕРЕ МАХРОВОСТИ ЦВЕТКОВ РОЗ

К.И. ЗЫКОВ, кандидат технических наук;

З.К. КЛИМЕНКО, доктор биологических наук

Никитский ботанический сад – Национальный научный центр

Введение

Махровость цветков роз, т.е. количество лепестков в них, является одним из важных декоративных признаков садовых роз, знание закономерностей мутационной изменчивости которых необходимо при их селекции. Ранее [2] на примере двух признаков (размера и интенсивности антоцианового окрашивания цветков) было установлено, что их мутационная изменчивость может быть преимущественно направленной в сторону повышения или понижения количественной выраженности этих признаков. Первое часто наблюдается у исходных сортов, генеалогически близких к мелкоцветковым дикорастущим видам или имеющим ациановые (не содержащие антоцианов) цветки, а также у сортов, трансгрессивно унаследовавших пониженную выраженность указанных признаков, второе – у современных, значительно удалённых от указанных видов («эволюционно продвинутых») крупноцветковых или интенсивно антоцианово окрашенных сортов, а также у трансгрессивно унаследовавших повышенную выраженность этих признаков. То, что касается трансгрессивного наследования, справедливо также и для признака “интенсивность аромата цветков”, исследовавшегося нами ранее [2].

Нами [2] на основании данных по трём указанным выше признакам предложена гипотеза, объясняющая изменение количественных признаков у естественных почковых мутантов (спортов) инактивированием или элиминированием вследствие мутаций доминантных аллелей двух систем аддитивных полимерных генов, первые из которых (ΣM_i) способствуют, а вторые (ΣE_i), наоборот, препятствуют фенотипическому проявлению количественных признаков. При повреждении первых из них (доминантных аллелей) выраженность признака снижается, а при повреждении вторых, наоборот, повышается.

Если k – количество активных генов M_i в генотипе исходной формы, а l – количество таких же генов E_i , то возможны три типа исходных сортов: k приблизительно равно l ($k \approx l$), k значительно больше l ($k \gg l$) и k значительно меньше l ($k \ll l$). Чем больше генов M_i и E_i в генотипе, тем больше вероятность того, что какой-либо из них будет инактивирован (частично или полностью) вследствие мутаций, поэтому количественная выраженность признаков у спортов по сравнению с исходной должна изменяться преимущественно в сторону ослабления (при $k \gg l$), усиления (при $k \ll l$) или с равной вероятностью в обоих направлениях (при $k \approx l$).

Целью настоящего исследования было выявление описанных выше закономерностей и в случае мутационной изменчивости «махровости цветков» садовых роз.

Объекты и методы исследования

В результате анализа мировой справочно-информационной литературы о розах [4, 5] были установлены 2 тыс. сортов, отобранных от 825 исходных сортов, каталоги которых нами опубликованы [3]. Эти же литературные источники использовались для составления родословных некоторых исходных сортов. Из указанных каталогов были выделены 115 сортов, продуцировавших 182 спорта с изменённой махровостью цветков.

Была проанализирована зависимость мутационной изменчивости количества лепестков (лп) в цветках сортов от степени махровости и происхождения исходных сортов, определяющего особенности их генотипа. Для удобства анализа все исходные сорта и спорты мы разделили по степени их махровости на 5 категорий, общепринятых в мировой селекционной практике: «нм» – не махровые, содержащие 5-7 лп в цветках; «пм» – полумахровые (8-20 лп), «м» – махровые (21-40 лп), «гм» – густомахровые (41-60 лп) и «огм» – очень густомахровые (больше 60 лп).

Степень отклонения махровости сортов от махровости исходных сортов мы в большинстве случаев могли оценить только полуколичественно-полукачественно в условных единицах (баллах): от 1 до 4. Если категории махровости спорта и исходного сорта соседние (смежные), например, «м» и «гм» (или «пм»), то считается, что они отличаются на 1 балл (+1 или -1). При больших отклонениях между указанными категориями махровости они могут быть в 2-4 балла. Реже различия махровости разных форм характеризовались нами более точно сравнением непосредственно количеств лепестков в их цветках.

Для выявления особенностей генотипа различных исходных сортов мы изучили происхождение 7 из них (табл. 1), от которых было отобрано 5 сортов. Была изучена также генеалогия ещё 12 сортов, продуцировавших спорты с наиболее радикально изменившимся количеством лепестков (на 2 и более баллов). Ими являются: немахровый сорт American Pillar; полумахровые сорта (8-20 лп) Mrs. Arthur Curtis James, Blaze, Trier и Tip Toes; махровые сорта Hallmark (25-30 лп), Général Jacqueminot (24-30 лп), Radiance (23 лп) и Vlatna (22-28 лп), густомахровый сорт Triomphe de l' Exposition (55 лп); очень густомахровые сорта The Alamo (100-125 лп) и Kordes Perfecta (65-70 лп).

Результаты и обсуждение

В результате изучения изменчивости махровости цветков у сортов, отобранных от различных исходных сортов, установлено, что мутируют они неодинаково (табл. 1). Сорта Joanna Hill (гм) и Columbia (огм) продуцировали только спорты с уменьшенным количеством лепестков, а сорт Mme. Edouard Herriot (пм), наоборот, только более махровые спорты.

Преимущественная направленность образования сортов в сторону увеличения махровости имела место и у исходных сортов Orléans Rose (пм) и Talisman (м). От исходных же сортов Ophelia (м) и Garnette (гм) получены спорты как с пониженной, так и с повышенной махровостью примерно в одинаковых количествах. Сравним для примера сорта Columbia и Orléans Rose, которые мутируют по-разному. Это различие существует с высокой вероятностью (P), большей или равной (\geq) 0,99.

Таблица 1

Изменчивость махровости цветков у сортов, отобранных от различных исходных сортов роз

Исходный сорт	Категория махровости исходного сорта	Количество и спектр сортов			
		общее, N, шт.	типа «<», N _{<} , %	типа «>», N _{>} , %	спектр*
Joanna Hill	гм	4	100	0	2 (-1), 2 (-2)
Columbia	огм	13	100	0	4 (-1), 1 (-1,5), 7 (-2), 1 (-4)
Ophelia	м	6	50	50	3 (-1), 3(1)
Garnette	гм	7	42,8	57,2	3 (-1), 4(1)
Orléans Rose	пм	9	22,2	77,8	2 (-1), 5 (1), 2 (2)
Talisman	м	7	14,3	85,7	1 (-1), 1 (0,5), 4 (1), 1 (2)
Mme. Edouard Herriot	пм	7	0	100	7 (1)

Примечание: * – Здесь и в других таблицах при описании спектров указано количество сортов (шт.), а в скобках – глубина мутирования в баллах.

В табл. 2 показана изменчивость махровости цветков у сортов в зависимости от категории исходных сортов. Некоторые характеристики спектров изменчивости представлены в табл. 3. Видно, что у густомахровых и особенно махровых сортов частота сортов, у которых количество лепестков увеличилось (N_>), не отличается достоверно от частоты противоположных сортов, у которых количество лепестков уменьшилось (N_<): $P \geq 0,30$ и $0,86$, соответственно. В этих категориях также мало радикально изменившихся сортов (макроспортов). Они составляют 15,0 и 5,8% соответственно.

В группах же полумахровых и очень густомахровых исходных сортов характер мутирования существенно иной. Среди сортов, полученных от полумахровых исходных сортов, с очень высокой достоверностью ($P \geq 0,999$) преобладают спорты типа “>”. При этом удивляет радикальность многих таких сортов. Процент их здесь выше, чем в случае густомахровых исходных сортов, а именно 19,0. Среди них особенно впечатляют спорты Texas Queen (огм, 100 лп) и Louise Hopkins (огм, 200-225 лп), количество лепестков у которых увеличилось по сравнению с исходными сортами Tip Toes и Trier в 5 и 10 раз. У полумахрового сорта Trier мы имеем самую выдающуюся из всех известных нам мутаций, повышающую махровость у его сорта Louise Hopkins до 225 лп (+3 балла).

У очень густомахровых исходных сортов появление сортов прямо противоположно, так как все 100% мутаций в этом случае уменьшили количество лепестков в цветках. Преобладание N_< над N_> при этом является высоко достоверным ($P \geq 0,999$). У этой группы исходных сортов получено особенно много радикальных сортов, а именно 75,0%. Отметим особо спорт Bride’s Blush (нм), отобранный от исходного сорта Columbia (огм) и имеющий простые немахровые цветки. Это наиболее выдающаяся мутация из известных нам, понижающая махровость, глубина которой составляет минус 4 балла (от 65 до 6 лп).

Что касается немахровых исходных сортов, то нам известен лишь один пример повышения у них махровости вследствие мутаций, а именно American Pillar (нм) → General Testard (пм). Исходная форма здесь – немахровый сорт, а не вид.

Таблица 2

Изменчивость махровости цветков у сортов садовых роз в зависимости от категории махровости исходных сортов

Категории исходных сортов	Количество исходных сортов	Количество и спектр спортов				
		общее количество, N, шт.	типа “<”, N<, %	спектр спортов типа “<”	типа “>”, N>, %	спектр спортов типа “>”
нм	1	1	0		100	1 (1)
пм	26	42	7,1	3(1)	92,9	31(1), 6(2), 2(3)
м	71	103	58,2	14(0,5), 43(1), 3(2)	41,8	8(0,5), 32(1), 2(2), 1(2,5)
гм	13	20	55	9(1), 2(2)	45	3(0,5), 6(1)
огм	4	16	100	4(1), 1(1,5), 10(2), 1(4)	0	
Все категории	115	182	49,5	14(0,5), 59(1), 1(1,5), 15(2), 1(4)	50,5	11(0,5), 70(1), 8(2), 1(2,5), 2(3)

Таблица 3

Характеристика спектра изменчивости махровости цветков у сортов роз в зависимости от категории махровости исходных сортов

Категория исходных сортов	Модуль глубины отклонения махровости спорта от махровости исходного сорта в баллах, (m)	Количество спортов с модулем отклонения махровости, указанным в колонке 2	Процент спортов с модулем отклонения махровости, указанным в колонке 2, от их общего количества
нм	$m \geq 1$	0	0
пм	$m \geq 1$	8	19
м	$m \geq 1$	6	5,8
гм	$m \geq 1$	3	15
огм	$m \geq 1$	12	75
Все категории	$m < 1$	154	84,6
	$1 < m \leq 2$	24	13,2
	$2 < m \leq 3$	3	1,65
	$3 < m \leq 4$	1	0,55

Представленные в табл. 1-3 данные свидетельствуют о том, что мутационная изменчивость махровости цветков аналогична таковой для признаков «размер» и «интенсивность антоцианового окрашивания» цветков. Преимущественное увеличение

количества лепестков у мутантов может иметь место у исходных сортов, наиболее близких по происхождению к немахровым дикорастущим видам, в то время как уменьшение количества лепестков часто преобладает у современных садовых роз. Полумахровые розы по своему происхождению обычно гораздо ближе к немахровым дикорастущим видам, чем густомахровые.

Так, сорта Mrs. Arthur Curtis James и Trier имеют среди предков немахровые виды уже во втором поколении.

R. wichuraiana Crépin (нм) ♀ → Mary Wallace (пм) ♀ → Mrs. Arthur Curtis James (пм, 15-20) ^{мутация} → White Cross (гм) (“глубина” мутации плюс 2 балла);

R. multiflora Thunberg (нм) ♀ → Aglaia (м) ♀ ♂ → Trier (пм) ^{мутация} → Louise Hopkins (огм, 200-225 лп) (+ 3 балла).

Среди известных нам предков первых 10 поколений очень густомахрового сорта Columbia нет немахрового дикорастущего вида.

Аналогично первым двум признакам, неодинаковый (иногда до прямо противоположного) характер мутационной изменчивости махровости сортов, далеко или близко отстоящих по происхождению от исходных немахровых дикорастущих видов, наблюдается не всегда. В пределах одной категории махровости различные исходные сорта могут также мутировать по-разному. В какой-то степени это видно уже в табл. 1, например, у густомахровых исходных сортов Joanna Hill ($N_{>} = 100\%$) и Garnette ($N_{>} = 42,8\%$). Естественно, возникает вопрос о более глубоких причинах указанных выше различий между сортами в этом отношении и их генетической подоплёке.

Вновь выявленные нами данные по спортивной изменчивости махровости цветков показывают, что исходные сорта трансгрессивно унаследовавшие повышенную или пониженную махровость чаще всего продуцируют преимущественно спорты с уменьшенным или увеличенным количеством лепестков соответственно, (назовём их для краткости «антипараллельными»), среди которых много радикальных. Так исходный сорт Columbia (огм, 65 лп), от которого отобран выдающийся немахровый спорт Bride's Blush, произошёл в результате скрещивания махровых сортов Ophelia и Mrs. George Shawyer, содержащих всего по 28 и 25 лепестков соответственно. Кстати из сортов, указанных в табл. 1 и продуцирующих преимущественно «антипараллельные» спорты, трансгрессивно унаследовали махровость цветков Talismn (м), Joanna Hill (гм) и Columbia (огм).

Всего мы выявили 31 исходный сорт, трансгрессивно унаследовавший повышенный или пониженный уровень махровости цветков, или таких, у которых хотя бы один из родителей имеет, соответственно, меньшее или большее количество лепестков, а махровость второго – того же уровня, что и у исходного сорта. Эти сорта продуцировали в общей сложности 62 спорты, среди которых 83,9% являются «антипараллельными» и только 16,1% – «параллельными». Многие из этих спортов являются радикальными. Самые выдающиеся мутации возникли у исходных сортов, одновременно трансгрессивно унаследовавших пониженную махровость и наиболее близких по происхождению к немахровым дикорастущим видам (Trier), или, наоборот, трансгрессивно унаследовавших повышенную махровость и относящихся к современным густомахровым розам (Columbia).

Приведенные выше факты хорошо согласуются с изложенной во введении гипотезой. Действительно, у дикорастущих видов естественный отбор приводил, видимо, к концентрированию в их генотипе высокоактивных генов E_i и вытеснению генов M_i , т.к. высокая махровость снижает плодовитость растений, уменьшая в их цветках количество тычинок и пестиков. Полагают, что лепестки венчика развиваются из потенциальных тычинок [1]. В связи с этим аллели M_i присутствуют в генотипе дикорастущих видов в малых количествах и слабо активны. При таких обстоятельствах, даже если и происходит инактивация какого-то гена E_i , то это мало повышает махровость цветков или вообще не повышает. По нашему мнению, именно поэтому

мутации очень редко увеличивают махровость цветков у немахровых видов и сортов.

Другое дело полумахровые сорта, которые произошли в основном в результате первоначальных скрещиваний дикорастущих видов с махровыми садовыми розами. При этом в генотип вводилось и некоторое количество активных генов M_i , но соблюдалось условие $k \ll l$. Как уже отмечалось, при таком условии в результате инактивации генов E_i вследствие мутаций образуются преимущественно спорты с увеличенным количеством лепестков, что мы и наблюдаем на практике.

У современных высокомахровых сортов из таких садовых групп, как чайно-гибридной и особенно флорибунда и грандифлора, полученных в результате длительных близкородственных скрещиваний в пределах этих групп, искусственный отбор по декоративности на высокую махровость привёл к тому, что в генотипе многих из них мало генов E_i или вообще их нет, а есть только полностью инактивированные рецессивные аллели e_i . Для большинства таких исходных сортов справедливо, видимо, соотношение $k \gg l$, и поэтому махровость преимущественно снижается вследствие мутаций, инактивирующих гены M_i .

При трансгрессивном унаследовании исходной формой повышенной махровости в её генотип поступает от обоих родителей большое количество активных генов M_i и (или) малое количество активных генов E_i . Между этими количествами возникает соотношение $k \gg l$, поэтому среди соматических мутантов будут преобладать такие, у которых махровость уменьшилась по сравнению с исходной формой. При трансгрессивном же унаследовании исходной формой пониженной махровости ситуация будет симметрично противоположной, вследствие чего будут возникать в основном спорты с повышенной махровостью.

Выводы

На основании изучения мутационной изменчивости количества лепестков в цветках в зависимости от степени махровости и происхождения исходных сортов подтверждён ряд общих, выявленных нами ранее особенностей и закономерностей мутирования количественных признаков садовых роз:

1. Мутационная изменчивость махровости цветков у садовых роз может быть не только совершенно случайной, но и векторной, то есть преимущественно направленной в сторону увеличения или уменьшения количества лепестков в цветках.

2. Исходные сорта, близкие по происхождению к немахровым дикорастущим видам, или трансгрессивно унаследовавшие пониженную махровость, продуцируют преимущественно спорты с увеличенным количеством лепестков. Современные же густомахровые сорта, являющиеся продуктами длительных близкородственных (межсортных) скрещиваний, или трансгрессивно унаследовавшие повышенную махровость, продуцируют преимущественно спорты с уменьшенным количеством лепестков.

3. Новые данные по мутационной изменчивости махровости цветков хорошо вписываются в предложенную нами ранее [2] гипотезу, объясняющую изменение количественных признаков у спортов роз инактивированием или элиминированием вследствие мутаций доминантных аддитивных полимерных генов, составляющих две генетические системы, первая из которых способствует, а вторая, наоборот, препятствует фенотипическому проявлению количественных признаков.

Список литературы

1. Журбин А.И. Ботаника с основами общей биологии. – М.: Медицина, 1968. – С. 238.
2. Зыков К.И. Спонтанная мутационная изменчивость количественной выраженности некоторых признаков садовых роз // Цитология и генетика. – 2002. – Т. 36, № 4. – С. 37-48.
3. Зыков К.И. Мутагенез в селекции садовых роз. – Ялта, 2008. – 658 с. – Деп. в ГНТБ Украины 24.06.08, № 62 – Ук 2008.

4. Jäger A. Rosenlexikon. – Leipzig: Zentral-Antiquaritet der DDR, 1960. – 768 p.
5. Modern roses 9 / Edited by P.A. Haring. – Shreveport: The American Rose Society, 1986. – 402 p.

МЕЖВИДОВАЯ ГИБРИДИЗАЦИЯ – ПЕРСПЕКТИВНЫЙ МЕТОД СОХРАНЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ РЕСУРСОВ РОДА *CHRYSANTHEMUM* L.

А.И. НЕДОЛУЖКО, кандидат сельскохозяйственных наук
Ботанический сад-институт ДВО РАН, Владивосток, Россия
А.В. НЕДОЛУЖКО, кандидат биологических наук
Центр Биотехнологии РАН, Москва, Россия

Введение

Из девяти российских дикорастущих представителей рода *Chrysanthemum* L. восемь произрастают на юге Дальнего Востока (ДВ) [4, 7]. Большинство российских видов находится на пределе своего распространения, некоторые (*C. chanetii*, *C. nakdongense*) едва заходят на территорию Приморского края РФ. *C. chanetii*, *C. maximowiczii*, *C. sichotense* в российской части ареала уже в настоящее время являются редкими и исчезающими, и рекомендованы к охране [3, 8]; *C. nakdongense*, *C. coreanum* занимают специфические экологические ниши и также испытывают отрицательное антропогенное влияние. *C. zawadskii* имеет более широкий, но дизъюнктивный ареал и распространен отдельными фрагментами на территории России, в том числе на юге ДВ (Амурская область и Хабаровский край) и внесен в Красные книги большинства регионов России. Близкие к нему – *C. mongolicum* (приурочен к высокогорьям Хабаровского края и о-ва Сахалин) и сахалино-хоккайдский *C. weyrichii*, встречающийся только на о-ве Сахалин. Сбережение генофонда дикорастущих *Chrysanthemum* не всегда возможно в природных резерватах либо при культивировании в связи со специфическими экологическими требованиями отдельных видов.

До настоящего времени работы по введению в селекцию большинства перечисленных видов *Chrysanthemum* в условиях России не проводились. Тогда как природные виды рода представляют благодатный источник ценных генов, недостающих существующим сортам хризантемы садовой.

Действенным методом охраны национального генофонда рода *Chrysanthemum*, находящегося в периферийной зоне основного ареала, явилась интродукция в ботанический сад, изучение возможности межвидовой гибридизации с целью объединения и сохранения ценных генов в новых гибридных организмах.

Настоящее исследование по изучению межвидовой гибридизации в роде *Chrysanthemum* является актуальным и служит дополнительным вкладом в Стратегию международного союза ботанических садов по сохранению мирового биоразнообразия.

Целью работы было выявление результативности искусственной межвидовой гибридизации как метода объединения ценных признаков и сохранения генофонда редких видов *Chrysanthemum*.

Объекты и методы исследования

Объекты – российские и корейские представители маньчжурской: *C. nakdongense* Nakai, *C. chanetii* Levl. Shih., *C. coreanum* (Levl. et Vaniot) Nakai et Mori, *C. maximowiczii* Kom., *C. zawadskii* ssp. *acutilobum* (DC.) Kitagawa, ssp. *acutilobum* var. *tenuisectum* Kitagawa, ssp. *latilobum* (Maxim.) Kitamura; монгольско-сибирской: *C. zawadskii* (Herbich) Tzvel., *C. mongolicum* Ling; японо-корейской: *C. boreale* (Makino) Kitam., *C. indicum* L., *C. pacificum* Nakai, *C. seticospe* Maxim. Hand.-Mazz. флоры.

Все образцы выращивали на коллекционных участках Ботанического сада-института ДВО РАН, расположенного в прибрежной зоне южного Приморья. Климат рассматриваемой территории муссонный, с умеренной обеспеченностью теплом и повышенной влажностью в летний период. Соцветия изолировали пакетами из кальки до распускания уже окрашенных язычковых цветков для последующей направленной гибридизации. Кастрацию не проводили, учитывая высокую степень самостерильности хризантем [1, 9-11]. Гибридизацию осуществляли в открытом грунте свежесобранной пылью однократно в период раскрытия большинства трубчатых цветков. Использовали прямые и обратные скрещивания. Контроль – изоляция соцветий без опыления.

В связи с очень поздним вступлением в фазу цветения японских видов *C. indicum* и *C. pacificum* в гибридизацию с ними привлекали производные российских дальневосточных и корейских представителей с поздним цветением. Число хромосом подсчитывали на давленных препаратах [2]. Всего за период 2005-2007 гг. выполнено 60 комбинаций скрещивания, опылено 316 соцветий, получено 7917 гибридных семян и 1450 гибридных растений.

Результаты и обсуждение

Скрещивание видов с одинаковым числом хромосом (гексаплоид х гексаплоид, $2n=54$) в прямом и обратном направлении проходило без всяких затруднений (табл. 1, 2). Завязываемость семян (22,0-129,9 шт. на 1 соцветие) сопоставима с результатами, полученными при свободном опылении растений в природных популяциях. Всхожесть семян и жизнеспособность полученных гибридных сеянцев также были на высоком уровне. Отсутствовали барьеры межвидовой несовместимости в большинстве реципрокных комбинаций тетраплоид х гексаплоид. Хорошая совместимость отмечена у *C. naktongense* ($2n=36$) и *C. zawadskii* ssp. *latilobum* ($2n=36$), использованных в качестве материнской формы в большинстве комбинаций с высокоплоидными отцовскими партнерами. Завязываемость семян варьировала в зависимости от участников скрещивания от 12,4 до 129,9 шт. на 1 соцветие. Полученные сеянцы дали жизнеспособное потомство, только отдельные сеянцы имели частично стерильную пыльцу, но хорошо завязывали сеянцы при свободном опылении.

Таблица 1

Виды *Chrysanthemum*, использованные в гибридизации

Образец	Происхождение	Символ	2n
<i>C. coreanum</i>	Приморский край	Cor	54
<i>C. naktongense</i>	Приморский край	Nak	36
<i>C. maximowiczii</i>	Приморский край	Max	54
<i>C. chanetii</i>	Приморский край	Cha	18
<i>C. zawadskii</i> var. <i>tenuisectum</i>	Корея	Ten	54
<i>C. zawadskii</i> ssp. <i>acutilobum</i>	Корея	Acut	54
<i>C. zawadskii</i> ssp. <i>latilobum</i>	Корея	Lat	36
<i>C. boreale</i>	Корея	Bor	18
<i>C. seticuspe</i>	Китай	Set	18

В максимальной степени несовместимость проявилась в комбинациях с участием диплоидных видов ($2n=18$): *C. chanetii*, *C. boreale*, *C. seticuspe*, основное число скрещиваний осуществить не удалось. Диплоиды несовместимы между собой и частично совместимы с гексаплоидами (*C. zawadskii* var. *tenuisectum*, *C. coreanum*, *C. maximowiczii*) и тетраплоидами (*C. zawadskii* ssp. *latilobum*). Сеянцы в этих вариантах завязывались в отдельных случаях и в незначительном количестве, были слабо выполнены. В настоящее время сохранилось немногочисленное жизнеспособное потомство только трех семей: *C.*

chanetii x *C. maximowiczii*, *C. coreanum* x *C. chanetii*, *C. chanetii* x *C. zawadski* spp. *latilobum*.

Таблица 2

Скрещиваемость видов рода *Chrysanthemum*

Вид	Cor	Nak	Ten	Max	Lat	Acut	Cha	Set	Bor
Cor	+	+	+	–	+	+	*	0	0
Nak	+	+	+	+	+	*	0	–	–
Ten	+	+	+	+	+	–	*	–	–
Max	–	+	+	+	+	–	0	–	–
Lat	*	*	+	+	+	*	*	–	–
Acut	–	*	–	–	+	+	*	–	–
Cha	*	0	*	*	*	0	+	0	0
Set	0	0	0	0	0	0	0	+	0
Bor	0	0	0	0	0	0	0	0	+

Примечание: + хорошая завязываемость семян, фертильные гибриды; * завязывается единичное число семян, семена либо не прорастают, либо дают малочисленное и слабое потомство; 0 – семена не завязываются; – отсутствие данных

Образцы монгольско-сибирской флоры *C. zawadskii*, *C. mongolicum* возможно филогенетически близки к маньчжурским представителям, так как имеют сходные жизненные формы и одинаковое число хромосом ($2n=54$). Большая разница в сроках цветения и быстрая потеря жизнеспособности пыльцы при хранении не позволили нам провести скрещивания в полном объеме. Но опыленные единичные соцветия завязали минимальное число семян и дали гибридные сеянцы. Получены гибридные растения и с привлечением форм, производных от *C. indicum* и *C. pacificum*.

Таким образом, легкость скрещивания гексаплоидных и тетраплоидных видов хризантем, высокая жизнеспособность гибридных семян и фертильное потомство указывают на большое сходство составляющих их наследственную основу геномов и позволяют отнести эти скрещивания к конгруэнтным, имеющим гомологичные геномы [6].

В семьях с хорошим завязыванием семян полученные гибриды F_1 отличаются мощным развитием: они морфологически однородны в пределах своей семьи, характеризуются сильной облиственностью, одномерностью, незначительным варьированием сроков цветения, интенсивным побегообразованием, высокофертильны при свободном опылении, что также подтверждает наличие у них гомологичных геномов.

Фенотипическое проявление большинства морфологических признаков у гибридов (архитектоника куста, структура листа) свидетельствует о влиянии дозы хромосом, полученной от исходных видов. По комплексу морфобиологических показателей листа гибриды уклоняются в сторону компонента с большим уровнем пloidности. Группы гексаплоид x тетраплоид характеризуются проявлением доминирования признаков гексаплоидного родителя. В семьях, полученных от равноплоидных скрещиваний, по большинству признаков наблюдается промежуточный характер наследования.

Таким образом, проведенный анализ позволил выявить близость геномов, составляющих генотипы аллополиплоидных *Chrysanthemum*. В процессе эволюции определенную роль имели спорадические скрещивания видов между собой на пересечении ареалов. Объединялись геномы, либо происходил «захват» отдельных хромосом или участков хромосом в кариотип нового вида [5]. И как результат – возникали полиплоидные и аллополиплоидные виды *Chrysanthemum*, включающие различные типы геномов. Возможно, что при этом шел интенсивный интрогрессионный процесс, повышающий степень генетического родства таксонов. Совместимость изученных видов и промежуточный характер наследования признаков – этому подтверждение.

Полученные в БСИ ДВО РАН межвидовые гибриды являются новыми аллополиплоидными формами с частично гомологичными или гомеологичными геномами. Учитывая естественную приуроченность отдельных видов *Chrysanthemum* к специфическим местообитаниям (произрастание на известковом субстрате), не всегда способствующую успешному введению в культуру, создание гибридов и сохранение в гибридных организмах ценных генов может быть перспективнее, чем культивирование чистых видов. Полученные и отобранные межвидовые гибриды F₁ являются новым генетическим материалом – хранителем генофонда, объединяющим комплексы ценных признаков, и доступным для селекции.

Выводы

Степень проявления нескрещиваемости у разных представителей *Chrysanthemum* различна и зависит от состава и числа геномов у аллополигеномных видов.

Отсутствие способности к гибридизации диплоидных видов между собой может указывать на более раннюю и значительную геномную дивергенцию в процессе филогенеза.

Создание межвидовых гибридов и сохранение в гибридных организмах ценных генов может быть перспективнее, чем интродукция чистых видов.

Список литературы

1. Недолужко А.И., Дудкин Р.В., Фадеев К.Е. Цветение и опыление природных видов дендрантем в культуре // Роль ботанических садов в сохранении биоразнообразия: Материалы междунар. конф. «Сохранение и воспроизводство растительного компонента биоразнообразия». – Ростов-на Дону, 2002. – С. 217-218.
2. Определение числа хромосом и описание их морфологии в меристеме и пыльцевых зернах культурных растений // Методические указания / Под ред. Л.И. Орел. – Л., 1988. – 63 с.
3. Перечень объектов растительного и животного мира, занесенных в Красную книгу Приморского края. – Владивосток, 2002. – 48 с.
4. Сосудистые растения советского Дальнего Востока. – СПб., 1992. – Т. 6. – 428 с.
5. Фадеева Т.С. Проблемы сравнительной генетики растений. Сообщение I. Принципы геномного анализа (на примере рода *Fragaria*) // Генетика. – 1966. – № 1. – С. 12-28.
6. Фадеева Т.С., Соснихина С.П., Иркаева Н.М. Сравнительная генетика растений. – Л., 1980. – 248 с.
7. Флора российского Дальнего Востока. Дополнения и изменения к изданию «Сосудистые растения советского Дальнего Востока» Т. 1-8 (1985-1996) / Под ред. Кожевникова А.Е., Пробатова Н.С. – Владивосток: Наука, 2006. – 456 с.
8. Харкевич С.С., Качура Н.Н. Редкие виды растений советского Дальнего Востока и их охрана. – М., 1981. – 232 с.
9. Drewlow L.W., Ascher P.D., Widmer R.E. Genetic studies of self incompatibility in garden chrysanthemum, *Chrysanthemum morifolium* Ramat. // Theoretical and Applied Genetics. – 1973. – N 43. – P. 1-5.
10. Stephens L.C., Ascher P.D., Widmer R.E. Interaction among sporophytic S loci in self-incompatible garden chrysanthemums // Euphytica. – 1984. – N 33. – P. 623-631.
11. Zagorskii J.S., Ascher P.D., Widmer R.E. Multigenic self incompatibility in hexaploid *Chrysanthemum* // Euphytica. – 1983. – N 32. – P. 1-7.

КЛОНАЛЬНОЕ МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ СОРТОВ *HEMEROCALLIS* L. И *HOSTA* L. ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ЭКСПЛАНТОВ ТКАНЕЙ И ОРГАНОВ ЦВЕТКА

А.Ю. НАБИЕВА, кандидат биологических наук
Центральный сибирский ботанический сад СО РАН, Новосибирск, Россия

Введение

Гибридные сорта родов *Hosta* L. и *Heimerocallis* L. – высоко-декоративные, устойчивые к заболеваниям растения, хорошо приспособленные к условиям умеренного резко континентального климата Западной Сибири. В практике ботанических садов преобладают традиционные методы их размножения, при которых деление куста возможно только спустя 2-3 года. Вследствие этого в большинстве ботанических коллекций возникает дефицит новых высоко-декоративных сортов и весьма актуальной становится разработка методик размножения ценных генотипов родов *Heimerocallis* и *Hosta* в культуре *in vitro*.

При использовании пазушных почек, находящихся под землей, в качестве эксплантов при размножении хост многие исследователи неизбежно сталкивались с проблемой бактериального и грибного заражения [9, 10]. Кроме того, число образовавшихся растений-регенерантов было невелико [11]. В большинстве исследований по введению лилейников в стерильную культуру развитие растений происходило посредством образования каллуса на разных типах эксплантов [6, 7]. Авторами приведены данные о соматклональной вариабельности среди регенерантов, полученных в культуре верхушек побегов хосты, где число измененных форм достигало 43,8% [10]. Большинство таких соматклонов показывало различия по площади листьев, содержанию хлорофилла и длине черешков по сравнению с исходными растениями. Поскольку у регенерантов, полученных через каллусогенез, отмечается появление соматклональной изменчивости [1, 5], изучение морфогенетических реакций при культивировании эксплантов является весьма актуальным.

Целью данной работы было апробирование методики введения в стерильную культуру тканей и органов цветка новых декоративных сортов *Heimerocallis* и *Hosta*, разработанной нами ранее на различных представителях рода *Lilium* [2], их размножение путем прямого органогенеза в условиях *in vitro* и выявление изменчивости в культуре ткани исследуемых растений.

Объекты и методы исследования

Объектами служили три сорта хосты – Krossa Regal, Christmas Tree, Streaptise и два сорта лилейника – Sabina Bayer и Bela Lugosi, растущих на интродукционном участке Центрального сибирского ботанического сада. В качестве эксплантов, имеющих высокую регенерационную способность, были взяты соматические ткани и органы цветка из еще нераскрытых бутонов высотой 15-25 мм, а именно: поперечные срезы оси соцветия, либо цветоножки – толщиной 1,5-2 мм; фрагменты цветоложа такой же толщины; тычиночные нити с пыльниками, имевшие в основании небольшой сегмент цветоложа и завязи.

Для инициации развития изолированные экспланты, выделенные из цветков, помещали на питательную среду MSm – модифицированную нами MS, к которой добавляли 40 г/л сахарозы, 7 г/л агара и регуляторы роста: ауксин 2,4-Д и цитокинин БАП. В контроле использовали среды этого же состава без регуляторов роста.

Первоначально объекты помещали в темноту в термостат при 26-28°C. Через 1,5 месяца экспланты с выраженной морфогенетической реакцией переносили для дифференциации на среду MS, в которую был добавлено 0,2 мг/л БАП, в дальнейшем их культивировали под люминесцентными лампами с фотопериодом 16 час при 20-25°C.

Для лучшего укоренения микропобеги переносили на безгормональную среду MS с уменьшенным в два раза содержанием макро- и микросолей ($1/2$ MS). Количество сахарозы в данной среде не превышало 20 г/л, а количество агара составляло 4-5 г/л. В дальнейшем растения *in vitro* помещали при + 7°C в световой термостат фирмы Rumed (Германия) для прохождения регенерантами в течение 6-8 недель периода покоя и их лучшей преадаптации к условиям *in vivo*.

Результаты и обсуждение

Отличительной особенностью хост по сравнению с лилейниками, по мнению некоторых исследователей, является их более высокая регенерационная активность, обусловленная заложением нескольких (до трех) коллатеральных почек в пазухе листа экспланта в пределах одного аксиллярного комплекса [4]. Нами отмечено, что побегообразование у хосты *in vitro* происходило на возникающих на фрагментах цветоноса адвентивных корнях, закладывающихся из субэпидермальных тканей стебля (рис. 1).

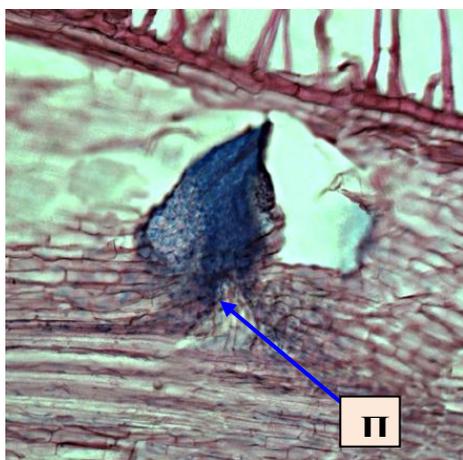


Рис. 1. Ранние этапы развития почки (II) у основания завязи хосты сорта Krossa Regal в культуре *in vitro*



Рис. 2. Образование цветоносного побега у основания завязи хосты сорта Streaptise в культуре *in vitro*

Если экспланты выделяли из раскрывшихся бутонов, развитие регенерантов проходило, в основном, по пути флорального морфогенеза (рис. 2). Образование каллуса было отмечено в тех случаях, если экспланты были взяты из бутонов на стадии роспускания, имели значительную раневую поверхность, а также, если содержание ауксина 2,4-Д в среде превышало 1,5 мг/л.

У *Hemerocallis* в культуре *in vitro* образование адвентивных почек было отмечено в основании цветоноса, а также на поперечных срезах осей соцветий. У остальных типов эксплантов, выделенных из бутонов *Hemerocallis* и *Hosta*, процесса морфогенеза не наблюдали.

В результате экспериментов было установлено, что необходимым индуктором органогенеза как хост, так и лилейников в культуре *in vitro* было включение в состав иницирующей среды как 0,4-0,8 мг/л БАП, так и 0,5-1,5 мг/л 2,4-Д. Известно, что многими исследователями 2,4-Д используется, в основном, как индуктор каллусогенеза или эмбриоидогенеза, особенно у однодольных растений [3, 8].

Можно заключить, что процесса каллусообразования у хосты можно избежать, если вносить на начальном этапе в среду MSm не более 1,5 мг/л 2,4-Д (табл.). Однако, уже на стадии дифференциации нами отмечены изменения в морфологии листьев у полученных регенерантов (рис. 3).

Таблица

Влияние регулятора роста 2,4-Д (мг/л) на регенерационные процессы в культуре ткани цветоложа, выделенного из бутонов сортов *Hosta* и *Heimerocallis*

Объект	Концентрация 2,4-Д		
	0	0,5	1,5
	Кол-во микропобегов, шт./эксплант		
<i>Hosta:</i>			
Christmas Tree	0	4,5	3,2 *
Krossa Regal	0	3,0	2,0 *
Streaptise	0,2	2,5	1,5 *
<i>Heimerocallis:</i>			
Sabina Bayer	0	5,5*	4,0*
Bela Lugosi	0	7,5	6,4

Примечание: * - не прямой органогенез (каллусогенез)



Рис. 3. Измененная морфология листа у соматклонов *Hosta*, сорт Christmas Tree



Рис. 4. Цветение регенеранта *Heimerocallis*, сорт Sabina Bayer

С другой стороны, увеличение числа регенерантов *Heimerocallis* вплоть до 6-7 пассажа происходило как за счет прямого (сорт *Bela Lugosi*), так и непрямого органогенеза (сорт *Sabina Bayer*) путем образования новых адвентивных почек. Данная методика размножения позволила получить от одного бутона 35-70 регенерантов, в зависимости от сорта. Спустя год культивирования *in vitro* все регенеранты *Hosta* и *Heimerocallis* имели хорошо развитую корневую систему и были высажены в условия закрытого грунта.

После 2 лет выращивания в почвенных условиях у сорта *Sabina Bayer* не отмечено фенотипических и генотипических изменений (рис. 4).

Выводы

У всех изученных представителей родов *Hosta* и *Heimerocallis* были получены жизнеспособные регенеранты при использовании способа культивирования изолированных тканей и органов цветков. Выявлено, что путь морфогенеза в культуре *in vitro* у эксплантов, выделенных из нераскрытых бутонов сортов *Hosta* и *Heimerocallis*, определяется концентрацией и соотношением регуляторов роста в инициальной среде, а также зависит от генотипа. Несмотря на то, что растения *Heimerocallis* сорта *Sabina Bayer* были получены путем непрямого органогенеза, среди регенерантов не выявлено соматклональной изменчивости, в то время как у регенерантов *Hosta* сорта *Christmas Tree*

отмечены изменения в морфологии листьев, что, возможно, связано с нестабильностью данного сорта.

Список литературы

1. Кунах В.А. Генетическая изменчивость соматических клеток растений. 3. Каллусообразование *in vitro* // Биополимеры и клетка. – 1997. – Т. 13, № 5. – С. 362-366.
2. Набиева А.Ю., Дорогина О.В., Красников А.А. Размножение и сохранение в культуре *in vitro* двух редких видов лилий – *Lilium distichum* Nakai и *L. cernuum* Kom. // Раст. ресурсы. – 2008. – Т. 44, Вып. 2 – С. 23-29.
3. Швецов С.Г., Гамбург К.З. Поглощение и метаболизм 2,4-Д в суспензионной культуре клеток кукурузы и сои // Физиология растений. – 1980. – Т. 27, № 4. – С. 746-755.
4. Чурикова О.А. Изучение закономерностей функционирования верхушечной меристемы побега и особенностей морфогенетических процессов в культурах *in vitro* растений разных таксономических групп // Вестн. Моск. ун-та. Сер. Биология. – 2005. – № 3. – С. 52-64.
5. Nuclear fragmentation followed by mitosis as a mechanism for wide number variation in tissue culture; its implications for plant regeneration / D'Amato F., Bennici A., Cionini P.G., Barocelli S., Lupi M.C. // Plant Cell Culture: Results and Perspectives. – Amsterdam: Elsevier, 1980. – P. 62-72.
6. Heuser C.W., Apps D.A. *In vitro* plantlet formation from flower petal explants of *Hemerocallis* cv. Chipper Cherry // Can. J. Bot. – 1976. – V. 54. – P. 616-618.
7. Hussey G. Totipotency in tissue explants and callus of some members of the Liliaceae, Iridaceae and Amaryllidaceae // J. Exp. Bot. – 1975. – 26. – P. 253-262.
8. A method for inflorescence proliferation / Lin C.-S., Chen C.-T, Lin C.-C., Chang W.-C. // Plant Cell Rep. – 2003. – V. 21. – P. 838-843.
9. Lubomski M. Shoot multiplication and rooting of *Hosta sieboldiana* cv. Gold Standard using cultured shoot tips // Acta Hort. – 1989. – N 251. – P. 223-228.
10. Paek K.Y., Ma S.H. *In vitro* propagation of hosta using cultured shoot tips and somaclonal variability of regenerants // Acta Hort. – 1996. – N 440. – P. 576-581.
11. Papachatzis P.M., Hammer P.A., Hasegawa P.M. *In vitro* propagation of *Hosta decorata* "Thomas Hogg" using cultured shoot tips // J. Am. Soc. Hort. Sci. – 1981. – V. 106, N 2. – P. 232-236.

КЛОНАЛЬНОЕ МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ РЕДКОГО СИБИРСКОГО ВИДА *GUELLENSTAEDTIA MONOPHYLLA* FISCH.

Г.Г. МАЙСТРЕНКО², кандидат биологических наук;
Т.И. НОВИКОВА¹, доктор биологических наук;
И.Ю. СЕЛЮТИНА¹, кандидат биологических наук;
К.К. СИДОРОВА², доктор биологических наук

¹Центральный сибирский ботанический сад СО РАН, Новосибирск, Россия,

²Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

Введение

Гюльденштедтия однолистная (*Gueldenstaedtia monophylla* Fisch.) семейства *Fabaceae* – реликт третичного периода, эндем центральной Азии. Вид имеет дизъюнктивный ареал и встречается в горнотепном поясе центрального, реже юго-восточного Алтая, а также в Туве и Монголии [8, 16] (рис. 1). Обычно он представлен небольшим числом популяций, строго приуроченным к засушливым каменистым

местообитаниям, имеющим тенденцию к сокращению. *G. monophylla* внесена в Красную книгу РСФСР и СССР [5, 6] со статусом 3(R) – редкий вид. В региональные сводки [3, 4] вид внесен со статусом 2 (U) – уязвимый таксон.



Рис. 1. *Gueldenstaedtia monophylla* в природных условиях

Важнейшими причинами, ограничивающими распространение вида, являются: низкая семенная продуктивность, высокая степень элиминации проростков и ювенильных особей, а также длительный (20 лет) прегенеративный период. Известно лишь семенное размножение гюльденштедтии. Для сохранения вида требуется проведение охранных мероприятий как в условиях *in situ*, так и *ex situ*. Первичные опыты по интродукции показали очень низкую приживаемость гюльденштедтии однолистной (1%) в новых условиях обитания [9]. В последние годы для сохранения *ex situ* редких и исчезающих видов, имеющих проблемы при размножении традиционными способами, успешно используются методы клонального микроразмножения [11, 13].

В литературе отсутствуют данные по методам размножения и сохранения *G. monophylla* в условиях *in vitro*.

Целью данного исследования была разработка метода клонального микроразмножения гюльденштедтии однолистной и сохранение ее в коллекции *in vitro*.

Объекты и методы исследования

В качестве исходного материала для исследований использовали семена гюльденштедтии однолистной из двух природных ценопопуляций Онгудайского района Республики Алтай, отличающихся по интенсивности пастбищного использования.

Работу в асептических условиях, приготовление питательных сред проводили по общепринятым методикам [1]. Поверхностную стерилизацию семян проводили в растворе 70%-ного этанола (20 сек) и 0,15%-ном растворе $HgCl_2$ (2 мин). Затем стерильные семена промывали в трех сменах стерильной дистиллированной воды и помещали на агаризованные среды – водный агар, среда МС [14].

Культивирование проводили на питательных средах МС, $\frac{1}{2}$ МС и Гамборга и Эвелега (B5) [12]. В состав сред вносили регуляторы роста растений: 6-бензиламинопурин (БАП) в концентрациях 0,1-1,0 мг/л, кинетин (КИН) в концентрации 1 мг/л, α -нафтилуксусную кислоту (НУК) в концентрациях 0,1-0,5 мг/л.

Растения культивировали в биологических пробирках объемом 40 мл и банках объемом 100 и 200 мл при освещении люминесцентными лампами 6000 люкс и 16-часовом фотопериоде. Коллекцию стерильных растений хранили при пониженных температурах ($7^{\circ}C$), в условиях замедленного роста в световом термостате RuMed (Германия). В таблице приведены средние арифметические данные и их отклонения, вычисленные по Доспехову [2]. Каждый вариант опыта проводили в 10 повторностях.

Результаты и обсуждение

Проращивание семян в условиях *in vitro*. Известно, что представители семейства Fabaceae относятся к эволюционно продвинутым видам, у которых отсутствует или имеется неглубокий покой семян [7]. Другой особенностью семян бобовых является достаточная жесткость семенных оболочек, что препятствует проникновению влаги и вызывает необходимость проведения скарификации семян для прорастания. Семена из двух изученных популяций отличались по степени зрелости: в популяции № 3 они были

зеленоватыми, недозрелыми и не прорастали на фильтровальной бумаге, в популяции № 5 наблюдали зрелые семена.

При использовании питательных сред и освещения люминесцентными лампами стерильные незрелые семена удалось прорастить без скарификации. Начало прорастания отмечено на вторые сутки, через неделю процент всхожести семян составил 33-37%, через две недели – 50%. Для прорастания стерильных зрелых семян (популяция № 5) требовалась скарификация. После неё, через неделю проросло 80-90% семян, через две недели – 100% семян. Полученные результаты не согласуются с данными, приведенными для этого вида Г.П. Семеновой [10]. Автор относит *G. monophylla* к термопсихрофильной группе, для которой необходимо проведение холодной стратификации в течение 20-35 сут для массового прорастания семян.

Таким образом, в условиях *in vitro* можно прорастить свежесобранные недозрелые семена и, после скарификации, зрелые семена без дополнительной холодной стратификации.

Морфогенез и регенерация побегов *G. monophylla* в культуре *in vitro*. Проросток гюльденштедтии однолистной состоит из округлых семядолей размером 0,5 x 0,3 см, гипокотили длиной 1,6-2,4 см и корня розового цвета вначале стержневого, позже утолщающегося. Через 2-3 недели на конусе нарастания побега возникают первичные, а затем и настоящие длинночерешковые листья. Побег короткометамерный, розеточного типа. У месячных ювенильных растений число листьев достигает 10-12 штук.

При использовании частей проростков в качестве эксплантов отмечены следующие морфогенетические реакции в зависимости от типа экспланта и концентраций регуляторов роста:

- целые семядоли и их части на средах с добавлением цитокинина БАП в диапазоне концентраций (0,2-1,0 мг/л) не обладали способностью к регенерации новых клонов. В варианте с равным количеством цитокинина и ауксина (по 0,5 мг/л БАП и НУК) по краю среза семядольного листа образовывался зернистый каллус, не способный к дальнейшему морфогенезу;

- сегменты гипокотили и корней в вариантах с преобладанием ауксинов над цитокининами (1,0 мг/л НУК и 0,5 мг/л БАП) также формировали каллус и не использовались в дальнейших опытах. Прямого органогенеза из ткани в указанных вариантах опыта не наблюдали;

- перспективным эксплантом являлся конус нарастания побега. На среде В5 с добавлением 1,0 мг/л БАП на нём наблюдали образование единичных пазушных побегов или почек в пазухах семядолей и первого листа (варианты с 0,1-0,5 мг/л НУК). Совместное применение ауксинов и цитокининов (0,1 мг/л НУК и 0,2 мг/л БАП) способствовало появлению почек в листовых пазухах и удлинению междоузлий побега, что позволило в дальнейшем проводить микрочеренкование.

Оптимизация протокола микроразмножения *G. monophylla*. Для оптимизации протокола клонального микроразмножения гюльденштедтии однолистной использовали два подхода. Первый заключался в воздействии на семена цитокининами БАП и КИН. Установлено, что через две недели после инкубации семян на среде В5 с цитокининами происходила активация развития пазушных меристем. При последующих пассажах на питательной среде ½ МС без внесения регуляторов роста была отмечена интенсивная регенерация пазушных побегов. В варианте с применением БАП количество пазушных побегов было почти в два раза больше, чем в варианте с КИН (рис. 2 а; табл.).

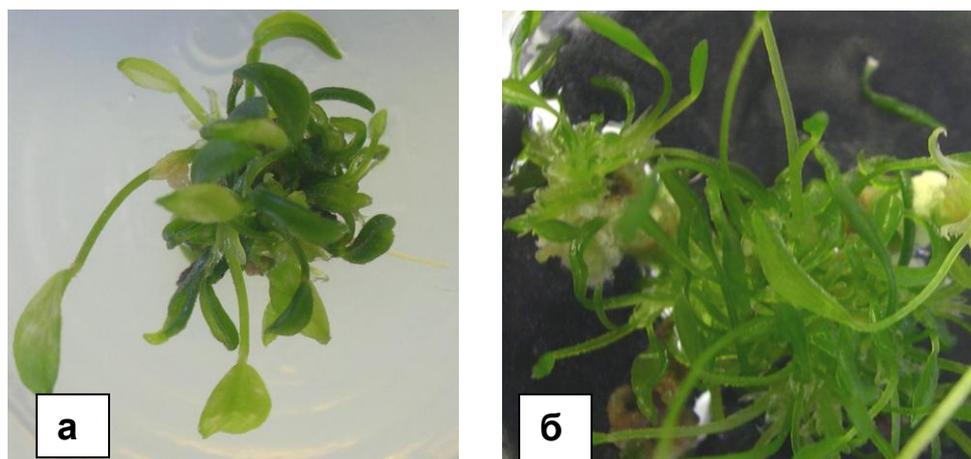


Рис. 2. Регенерация побегов: а) на ½ МС после активизации развития семян на среде В5 с добавлением 1,0 мг/л БАП; б) на ½ МС, содержащей 0,4 мг/л НУК и 1 мг/л БАП

Таблица

**Влияние типа экспланта и регуляторов роста на регенерацию побегов
*Gueldenstaedtia monophylla***

Тип экспланта	Варианты питательных сред	Число побегов после двух пассажей, шт./эксплант
Семена	В5 + БАП (1,0 мг/л) – 1 пассаж	11,6 ± 0,7
	½ МС без гормонов – 2 пассаж	
Конус нарастания побегов	В5 + КИН (1,0 мг/л) – 1 пассаж	6,4 ± 0,9
	½ МС без гормонов – 2 пассаж	
Конус нарастания побегов	В5 + НУК (0,1 мг/л) + БАП (0,2 мг/л) – 1 пассаж	21,5 ± 0,9
	½ МС + НУК (0,4 мг/л) + БАП (1,0 мг/л) – 2 пассаж	

Таким образом, культивирование семян на средах, содержащих цитокинин, с последующим переносом на безгормональные среды позволяет существенно ускорить массовое размножение регенерантов. Полученные данные согласуются с результатами, приведенными Р. Николик с соавторами [15], которые исследовали действие различных цитокининов, включая БАП и КИН, на активацию развития семян другого бобового растения – *Lotus corniculatus* L.

Второй подход, используемый в работе, заключался в двухэтапной активации развития конуса нарастания регуляторами роста. Для индукции использовали среду В5, дополненную 0,1 мг/л НУК и 0,2 мг/л БАП. Через месяц культивирования материал для дифференциации переносили на среду ½ МС, содержащую более высокие концентрации ауксина и цитокинина (0,4 мг/л НУК и 1 мг/л БАП), что позволило получить множественную пролиферацию почек и развитие из них побегов (табл.; рис. 2 б). Второй подход является более эффективным для микроразмножения гюльденштедтии, чем предварительная активация развития семян цитокининами (табл.).

На этапе укоренения побегов оптимальной средой была среда ½ МС с добавлением 1% активированного угля. Адаптация микроклонов к условиям *ex vitro* нами не изучалась и является задачей дальнейших исследований.

Выводы

1. Разработан эффективный способ микроразмножения гюльденштедтии однолистной, выявивший высокий регенерационный потенциал вида.
2. Увеличение количества побегов происходит за счет пролиферации пазушных меристем, что предполагает отсутствие генетической вариабельности.
3. Полученные микроклоны сохраняются в условиях замедленного роста. *G. monophylla* включена в коллекцию *in vitro* редких видов растений азиатской части России, созданную в ЦСБС.
Работа выполнена при поддержке гранта Программы Президиума РАН «Биологическое разнообразие».

Список литературы

1. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнология на их основе. – М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. – 160 с.
2. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта. – М.: Агропромиздат, 1985. – С. 174-178.
3. Красная книга Республики Алтай. Растения. – Новосибирск: Наука, 1996. – 130 с.
4. Красная книга Республики Тыва. Растения. – Новосибирск: Наука, 2002. – 149 с.
5. Красная книга РСФСР. Растения. – М.: Росагропромиздат, 1988. – 590 с.
6. Красная книга СССР. – М.: Лесная пром-сть, 1984. Изд. 2-е. – Т. 2. – 480 с.
7. Николаева М.Г. Особенности прорастания семян в зависимости от филогенетического положения растений и эколого-географических условий их обитания // Физиология растений. – 1999. – Т. 46, № 3. – С. 432-437.
8. Пяк А.И. Петрофиты Русского Алтая. – Томск: Изд-во Томского ун-та, 2003. – 200 с.
9. Селютин И.Ю., Черкасова Е.С., Карнаухова Н.А. Структура ценопопуляций редкого вида *Gueldenstaedtia monophylla* (Fabaceae) в Центральном Алтае // Ботанический журнал. – 2008. – Т. 93, № 9. – С. 1414-1423.
10. Семенова Г.П. Условия проращивания семян редких и исчезающих растений флоры Сибири // Сибирский экологический журнал. – 2002. – N 2. – С. 221-236.
11. *In vitro* micropropagation of *Primula scotica*: a rare Scottish plant / Benson E.E., Danaher J.E., Pimbley I., Anderson C.T., Wake J., Daley S., Adams L.K. // Biodiversity and Conservation. – 2000. – V. 9, N 6. – P. 711-726.
12. Gamborg O.L, Eveleigh D.E. Culture methods and detection of glucanases in suspension cultures of wheat and barley // Can. J. Biochem. – 1968. – V.46, N 5. – P. 417-421.
13. Fay M.F. In what situation is *in vitro* culture appropriate to plant conservation? // Biodiversity and Conservation. – 1994. – V. 3, N 2. – P. 176-183.
14. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. – 1962. – V. 15. – P. 473-497.
15. Effects of cytokinins on *in vitro* seed germination and early seedling morphogenesis in *Lotus corniculatus* L. / Nikolic R., Mitic N., Miletic R., Neskovic M. // J. of Plant Growth Regulation. – 2006. – V. 25, N 3. – P. 187-194.
16. Zhu X. A revision of genus *Gueldenstaedtia* (Fabaceae) // Ann. Bot. Fennici. – 2004. – V. 41. – P. 283-291.

НОВЫЙ ДЕКОРАТИВНЫЙ ИСКУССТВЕННЫЙ ГИБРИД *ALNUS INCANA* (L.) MOENCH. × *A. HIRSUTA* (SPACH) TURCZ. EX RUPR.

Е.В. БАНАЕВ, кандидат биологических наук;

Т.И. НОВИКОВА, доктор биологических наук

Центральный сибирский ботанический сад СО РАН, Новосибирск, Россия

Введение

Ольха (*Alnus* Mill.) – ценная декоративная порода. Многие ее виды обладают высоким фенотипическим полиморфизмом [1], широко используются декоративные формы, отличающиеся типом кроны, цветом, размерами, особенностями строения листовой пластинки [11, 19].

Имеется достаточно сведений о существовании естественных [5, 13, 15, 17, 20, 26] и искусственных [7, 10, 16, 18, 22] межвидовых гибридов ольхи, обладающих различными полезными свойствами и позволяющих получать семена, дающие жизнеспособное потомство с явлением гетерозиса [27]. Однако лишь немногие гибриды ольхи признаны экономически значимыми для лесного хозяйства [24].

Кроме практического значения, работы по изучению межвидовой гибридизации имеют существенную теоретическую составляющую, поскольку гибридизация считается важным эволюционным механизмом [4, 6, 8].

В Евразии наиболее широко распространены 2 близких вида – ольха серая (*A. incana* (L.) Moench.) и ольха пушистая (*A. hirsuta* (Spach) Turcz. ex Rupr.). В природе их ареалы не перекрываются, а данные об экспериментах по искусственному скрещиванию этих видов не известны.

Целью настоящей работы было изучение особенностей скрещивания ольхи серой и ольхи пушистой и оценка свойств межвидовых гибридов.

Объекты и методы исследования

В эксперименте использовали экземпляры ольхи серой и ольхи пушистой 30-летнего возраста из арборетума Центрального сибирского ботанического сада СО РАН (г. Новосибирск, Россия). Образец *A. incana* (L.) Moench. выращен из семян, полученных из Финляндии, а образец *A. hirsuta* (Spach) Turcz. ex Rupr. – из семян с российского Дальнего Востока. Фенологические наблюдения за видами в дендрарии ЦСБС, а также анализ литературных данных [9] показали, что периоды цветения *A. incana* и *A. hirsuta* на юге Западной Сибири полностью перекрываются. Пыльцу собирали в лаборатории со срезанных за 2 недели до начала цветения стеблей. До начала опытов пыльцу хранили в плотно закрытых стеклянных пробирках в морозильной камере при температуре -15°C. Опыление провели в момент массового цветения видов в обоих направлениях. После опыления изоляторы сохраняли на побегах в течение 2-х недель. Семена собирали осенью до начала раскрытия соплодий и хранили в сухом виде в холодильнике при положительной температуре 3-5°C. Проращивание семян гибридов провели весной следующего года. Перед проверкой на всхожесть в лабораторных условиях семена подвергли кратковременной стратификации при 5°C в течение 10 суток и затем инкубировали в термостате при 25°C. Предлагаемая методика была выбрана как оптимальная после проведения серии экспериментов с различными видами ольхи [3]. В качестве контроля использовали семена с растения *A. incana*, участвующего в эксперименте, но полученные от свободного опыления.

Для введения в культуру *in vitro* семена гибридов обрабатывали раствором коммерческого препарата Domestos (20%) в течение 10 мин, затем их многократно (5 раз) промывали дистиллированной водой. Стерильные семена помещали в чашки Петри на водный агар (1%) и держали в холодильнике при 5°C в течение 10 сут. Затем семена инкубировали в термостате при 27°C.

Эпикотили размером около 1 см перенесли в жидкую среду WPM [23], содержащую 20 мг/л сахарозы, 7 г/л агара и различные концентрации БАП (0,5 и 1,0 мг/л). Культуры выращивали при $25 \pm 2^\circ\text{C}$ и 16-часовом искусственном освещении. Для индукции корнеобразования побеги пассировали на S WPM, содержащей 1,0 мг/л ИМК.

При переводе растений в условия *ex vitro* их помещали в контейнеры, наполненные стерильным кварцевым песком и увлажненные S WPM. Через 1 месяц адаптации растения переносили на почвенный субстрат, содержащий торф, сосновую измельченную кору, сфагновый мох и вермикулит (1:1:1:1) для дальнейшей акклиматизации в теплице. Через 2 месяца хорошо укорененные растения помещали в питомник.

Результаты и обсуждение

В результате проведенного эксперимента выяснилось, что полноценные семена высокого качества сформировались в том и другом варианте скрещивания. Прорастание семян начиналось на третьи сутки инкубации. Период прорастания длился 7 суток, при этом гибридные семена имели более высокую энергию прорастания и более высокий процент всхожести по сравнению с контролем (табл.).

Таблица

Всхожесть семян ольхи в лабораторных условиях

Вариант скрещивания	Всхожесть на 3 сут., %	Всхожесть на 7 сут., %
<i>A. incana</i> x <i>A. hirsuta</i> (♀x♂)	91,3 ± 0,66	97,5 ± 0,21
<i>A. hirsuta</i> x <i>A. incana</i> (♀x♂)	71,8 ± 1,14	74 ± 0,97
<i>A. incana</i> (контроль)	53 ± 0,92	65,8 ± 0,84

Соотношение числа семян, проросших на 3 сутки инкубации, к общему числу проросших семян у гибридов составило 94-97%, тогда как в контроле – около 80%. Итоговая всхожесть семян *A. incana* x *A. hirsuta* превысила контроль почти на 32%. Следует отметить, что такой высокий процент всхожести (почти 100%) редко наблюдается у семян ольхи, полученных при свободном опылении, не говоря уже об искусственных межвидовых гибридах [12, 14, 27]. Обычно всхожесть семян ольхи не превышает 70%, что обусловлено наличием значительного количества пустых семян. Высокое качество семян межвидовых гибридов указывает на отсутствие у *A. incana* и *A. hirsuta* каких-либо барьеров, препятствующих скрещиванию, что представляет интерес как с теоретической, так и с практической точек зрения.

В ходе эксперимента нами было обнаружено, что около 5% проростков *A. incana* x *A. hirsuta* имели рассеченную листовую пластинку. Интересно заметить, что декоративная форма была получена только в варианте, когда материнским растением была *A. incana*. Эти проростки были отобраны для дальнейшего размножения *in vitro*.

Размножение проводили на среде WPM без добавления ауксинов. Ранее нами был показан негативный эффект этих регуляторов роста, проявляющийся в образовании каллуса у *A. incana* f. *laciniata* [2]. При введении в культуру этой декоративной формы ольхи обнаружено, что использование НУК (0,1 и 0,2 мг/л) приводило к формированию каллуса на поверхности срезов, на стеблях и листьях эксплантов. Причина активного образования каллуса связана, возможно, с высоким содержанием эндогенных ауксинов. Подобный эффект был отмечен ранее при размножении *in vitro* ольхи черной [21, 25].



Рис. 1. Кластер микропобегов *A. incana* x *A. hirsuta* на среде WPM, дополненной 0,5 мг/л БАП



Рис. 2. Адаптированные образцы *A. incana* x *A. hirsuta*

Использование среды WPM, дополненной БАП (0,5 и 1,0 мг/л), для размножения эпикотилей декоративного гибрида *A. incana* x *A. hirsuta* способствовало формированию кластеров побегов, которые отличались друг от друга в зависимости от концентрации цитокинина. Шарообразные кластеры, образовавшиеся на среде с добавлением 0,5 мг/л БАП, состояли из компактных пазушных и адвентивных побегов (рис. 1) без признаков витрификации в отличие от кластеров на фоне 1,0 мг/л БАП, состоявших из коротких ломких микропобегов. После 3-4 субкультивирований высокий уровень цитокинина вызывал нарушения развития побегов и образование каллуса.

Перенос микропобегов на среду WPM без регуляторов роста способствовал их быстрому вытягиванию, через неделю культивирования их высота составляла 8-15 мм. Затем микропобеги культивировали на среде, содержащей 1,0 мг/л ИМК для индукции корнеобразования. Дальнейшее укоренение проводили в условиях *ex vitro*, где через 4 недели растения сформировали корни второго порядка. Приживаемость декоративных регенерантов (рис. 2) в субстрате составило 100%.

Выводы

1. Отсутствуют барьеры, препятствующие скрещиванию *A. incana* и *A. hirsuta*. В природе эти виды не смешиваются лишь благодаря отсутствию контактов ареалов.
2. Искусственная гибридизация ольхи может служить источником новых декоративных форм.
3. Гибрид *A. incana* x *A. hirsuta* заметно отличается от известных рассеченнолистных форм ольхи и представляет интерес для озеленения и зеленого строительства.

Список литературы

1. Банаев Е.В., Шемберг М.А. Ольха в Сибири и на Дальнем Востоке России. – Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2000. – 99 с.
2. Особенности размножения и сохранения редких декоративных форм ольхи / Банаев Е.В., Киселева Т.И., Новикова Т.И., Черных Е.В. // Сиб. экол. журн. – 2005. – № 4. – С. 607-613.
3. Банаев Е.В., Банаева Ю.А., Киселева Т.И. Сравнительно-экологическое исследование прорастания семян в различных систематических группах рода *Alnus* Mill. s.l. // Сиб. экол. журн. – 2006. – № 2. – С. 175-179.
4. Бобров Е.Г. Интрогрессивная гибридизация во флоре Байкальской Сибири // Бот. журн. – 1961. – Т. 46, № 3. – С. 313-327.
5. Бобров Е.Г. Некоторые черты новейшей истории флоры и растительности южной

- части Дальнего Востока // Бот. журн. – 1980. – Т. 65, № 2. – С. 172-184.
6. Грант В. Видообразование у растений. – М.: Мир, 1984. – 528 с.
 7. Кундзиньш А.В. Опыты искусственной гибридизации ольхи // Повышение продуктивности леса. – Рига: Зинатне, 1968. – С. 69-99.
 8. Майр Э. Популяции, виды и эволюция. – М.: Мир, 1974. – 460 с.
 9. Лучник З.И. Интродукция деревьев и кустарников в Алтайском крае. – М.: Колос, 1970. – 656 с.
 10. Ромедер Э., Шенбах Г. Генетика и селекция лесных пород. – М.: Сельхозиздат, 1962. – 268 с.
 11. Соколов С.Я., Стратонович А.И. Род 2. *Alnus* Gaertn. – Ольха // Деревья и кустарники СССР. – М., Л.: Наука, 1951. – Т. 2. – С. 334-353.
 12. Щепотьев Ф.Л., Павленко Ф.А. Быстрорастущие древесные породы. – М.: Изд-во с/х лит., журн. и пл., 1962. – 373 с.
 13. Юркевич И.Д., Гельтман В.С., Парфенов В.И. Сероольховые леса и их хозяйственное использование. – Минск: Изд-во АН БССР, 1963. – 142 с.
 14. Asakawa S., Nagao A. Germination behavior of *Alnus inokumai* seeds // J. Japan. Forest. Soc. – 1963. – V. 45, N 10. – P. 331-334.
 15. Banaev E.V., Baňant V. Study of natural hybridization between *Alnus incana* (L.) Moench. and *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. // J. For. Sc. – 2007. – N 53. – P. 66-73.
 16. Chiba S. Studies on the tree improvement by means of artificial hybridization and polyploidy in *Alnus* and *Populus* species // Bull. Oji Inst. For. Tree Impr. – 1966. – N 1. – P. 1-165.
 17. Fér F., Šedivý Z. Přirození kříženci olše lepkavé (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn.) a olše šedé (*Alnus incana* (L.) Moench.) // Sborník Lesnické Fakulty Vysoké Školy Zemědělské v Praze. – 1963. – N 6. – P. 191-215.
 18. Heitmüller H.H. Die selbstungsanalyse als möglichkeit der kombinationsprüfung bei kreuzungen innerhalb der gattung *Alnus*. Tagung für forstpflanzenzüchtung // Silv. Genet. – 1957. – N 6. – P. 158-159.
 19. Hylander N. On cut-leaved and small-leaved forms of *Alnus glutinosa* and *A. incana* // Svensk. bot. tidsk. – 1957. – Bd. 51, N 2. – S. 437-453.
 20. Kobendza R. Meiszance naturalne olszy szarej i czarnej w Polsce (*Alnus incana* Moench. × *Alnus glutinosa* Gaerth. – *Alnus hybrida* Alex. Braun.) // Rocznik Dend. – 1956. – N 56. – P. 57-62.
 21. Lall S., Mandegaran Z., Roberts A.V. Shoot multiplication in cultures of mature *Alnus glutinosa* // Plant Cell, Tissue and Organ Cult. – 2005. – V. 83. – P. 347-350.
 22. Ljunger A. Al-oh alforadling // Scoden. – 1959. – V. 46, N 5. – P. 115-117.
 23. Lloyd G., McCown B. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel *Kalmia latifolia* by use of shoot-tip culture // Proc. Inter. Pl. Prop. Soc. – 1980. – N 30. – P. 421-427.
 24. Mejnartowicz L. Olsze – *Alnus* Mill. // Nasze Drewa Leśne. – 1981. – N 8. – P. 201-227.
 25. Perinet P., Lalonde M. *In vitro* propagation and nodulation of the actinorhizal host plant *Alnus glutinosa* (L.) Gaerth. // Pl. Sci. Lett. – 1983. – N 29. – P. 9-17.
 26. Steele F.L. Introgression of *Alnus serrulata* and *Alnus rugosa* // Rhodora. – 1961. – V. 63, N 755. – P. 297-304.
 27. Václav E. Klíčivost semen olše (*Alnus* sp.) z křížení na mladých hybridech // Lesnický časopis. – 1963. – N 9. – P. 811-820.

RAPD И ISSR-ГЕНОТИПИРОВАНИЕ ПЕРСПЕКТИВНЫХ ФОРМ КУРИЛЬСКОГО ЧАЯ (*POTENTILLA FRUTICOSA* L.) КОЛЛЕКЦИИ ЦЕНТРАЛЬНОГО БОТАНИЧЕСКОГО САДА НАН БЕЛАРУСИ

А.Б. ВЛАСОВА, кандидат биологических наук; В.С. ПАНКРАТОВ;

Е.В. СПИРИДОВИЧ, кандидат биологических наук;

В.Н. РЕШЕТНИКОВ, доктор биологических наук

Центральный ботанический сад НАН Беларуси, Минск, Беларусь

Введение

Сохранение биологического и, в частности, генетического разнообразия является одной из важных задач современной биологической науки. Оценка генетических различий между отдельными особями в популяции необходима для выявления наиболее уникальных форм и является актуальной для сохранения и поддержания ботанических коллекций ценных видов и таксонов, а также очень важна при проведении направленной селекции как при выборе исходного материала, так и при оценке результатов селекционного процесса.

Курильский чай (*Potentilla fruticosa* L., Syn: *Dasiphora floribunda* Pursh) относится к семейству Rosaceae Juss. (розоцветные), подсемейству Rosoideae Arnott, является широко распространенным в Европе и Северной Америке декоративным растением [6, 7]. Выбор объекта в первую очередь обусловлен его практической ценностью. Курильский чай широко используется как декоративное растение в ландшафтном дизайне [6]. Этим объясняется масштабная селекционная работа, проводимая с этой культурой, которая привела к существующему разнообразию сортов (более 130) [5]. В свою очередь в ЦБС НАН Беларуси с 1980 г. ведется селекция курильского чая с использованием методов радиационного мутагенеза, результатом которой является коллекция форм, ряд из которых получили статус сортов. Кроме того, курильский чай обладает ценными лекарственными свойствами: гемостатическими, противовоспалительными, бактерицидными [1, 6]. Растения можно использовать на корм скоту и для предотвращения эрозии почв.

За последние 2 десятилетия продемонстрирована успешность применения ДНК-маркеров с целью выявления генетического разнообразия растительных ресурсов, решения таксономических вопросов, сортовой принадлежности и др. В ряде работ экспериментально доказано оптимальное использование RAPD и ISSR-маркеров для генотипирования разных культур [2, 14, 16, 17]. Молекулярно-генетические маркеры существенно облегчают выбор наиболее значимых и специфичных морфологических признаков, которые затем можно будет использовать для решения задач систематики и оценки генетических различий.

Род *Potentilla* L. является довольно сложным в систематическом отношении, что связано с его широким распространением, нередкими случаями апомиксиса, полиплоидизации и отдаленной гибридизации [8, 11, 12]. Род разделен на несколько секций, внутри которых таксономические отношения запутаны. Использование морфологических признаков для систематики этого рода затруднено из-за их большой изменчивости, конвергенции и проблемы выбора морфологических признаков для сравнения [12]. Поэтому вопросу применения молекулярно-генетических маркеров при изучении систематики, филогении и исторической биогеографии рода *Potentilla* посвящен ряд исследований в различных европейских странах [8, 11, 12], которые помогли нам при выборе методов исследования и маркирующих праймеров, т.к. до настоящего времени нет данных по генетической паспортизации культуры *P. fruticosa* (*Dasiphora*).

Таким образом, целью настоящей работы являлось, во-первых, проведение генетической паспортизации коллекции ценных декоративных и лекарственных форм курильского чая ЦБС НАН Б, во-вторых – генетическое сравнение двух форм (Фонарик и Румянец) с рядом признанных сортов данной культуры. В задачи исследования входило: 1)

выбор типа молекулярно-генетических маркеров для паспортизации; 2) оптимизация методик выделения тотальной ДНК, условий ПЦР, и разделения ампликонов; 3) проведение молекулярно-генетической паспортизации коллекционных форм и сортов; 4) обработка полученных результатов и составление в виде генетических паспортов форм курильского чая и выявление степени генетического сходства между данными формами.

Объекты и методы исследования

Коллекция курильского чая ЦБС НАН Беларуси представлена 14 формами местной селекции, две из которых (Фонарик и Румянец) получили в 2007 г. статус сортов, а также рядом коммерческих сортов, полученных из Вильнюсского Ботанического сада. Все 14 местных сортообразцов были получены от сорта Tangerine путем радиационного мутагенеза с последующей селекцией. Для проведения RAPD и ISSR паспортизации были взяты все 16 сортообразцов, сорт Tangerine, являющийся их предком, а также 3 коммерческих сорта (Gold Star, Red Ace и Gold Teppich). Выделение тотальной ДНК проводили СТАВ-методом по Hombergen и Bachmann [13] с модификациями Gabrielsen et al. [10] из молодых листьев. Оценку концентрации и чистоты препарата ДНК (соотношение $A_{260/280}$) проводили на спектрофотометре Agilent 8453. RAPD-ПЦР (США) проводили по Gabrielsen et al. [10], с модификациями. Информация об использованных праймерах приведена в табл. 1. RAPD-ПЦР-продукты анализировали методом горизонтального электрофореза в 1,5% агарозном геле или с использованием прибора Bioanalyzer Agilent 2100 (США). ISSR-ПЦР-продукты разделяли в неденатурирующем 8% полиакриламидном геле с окрашиванием по методу Beidler et al. [3], усовершенствованному Creste et al. [4]. Цифровые изображения гелей обрабатывали в программе PhoreticsTM 1D. Данные обрабатывали с помощью пакетов Phylip 3-63 и Treecon.

Таблица 1

RAPD и ISSR праймеры, использованные для генетической паспортизации форм и сортов *P. fruticosa*

Название праймера	Последовательность	Температура отжига
<i>RAPD</i>		
OPA-05	5'AGGGGTCTTG 3'	37°C
OPA-10	5' GTGATCGCAG 3'	36°C
OPA-11	5' CAATCGCCGT 3'	40°C
OPC-02	5' GTGAGGCGTC 3'	40°C
OPC-13	5' AAGCCTCGTC 3'	40°C
OPD-08	5' GTGTGCCCA 3'	42°C
OPG-08	5' TCACGTCCAC 3'	38°C
OPX-08	5' CAGGGGTGGA 3'	42°C
<i>ISSR</i>		
UBC 807	5'AGAGAGAGAGAGAGAGT 3'	48°C
UBC 808	5' AGAGAGAGAGAGAGAGC 3'	48°C
UBC 810	5' GAGAGAGAGAGAGAGAT 3'	48°C
UBC 811	5' GAGAGAGAGAGAGAGAC 3'	48°C
UBC 818	5' CACACACACACACAG 3'	48°C
UBC 873	5' GACAGACAGACAGACA 3'	48°C

Степень генетического сходства между образцами рассчитывалась по формуле Nei и Li [15]. Дендрограммы, отражающие степень генетического сходства между формами и/или сортами, строили на основе полученных матриц расстояний при помощи метода UPGMA. После этого проводили Bootstrap-анализ, позволяющий оценить, насколько

адекватно дендрограмма отражает исходные данные, представленные в матрице сходства.

Результаты и обсуждение

Изначально для работы было отобрано 8 RAPD и 6 ISSR-праймеров, но после предварительной проверки праймеры OPA-11 и OPX-08 были исключены из дальнейшей работы, так как либо вовсе не давали ПЦР-продуктов, или получаемые маркеры были малочисленными и нечеткими.

Таким образом, для паспортизации коллекции были использованы 6 RAPD и 6 ISSR-праймеров. Полученные результаты были представлены в виде бинарных матриц (RAPD и ISSR-паспортов). Обобщенные сведения по спектрам ампликонов, полученных при использовании RAPD и ISSR-праймеров, представлены в табл. 2.

Далее на основе полученных данных строили таблицы степени генетического сходства и дендрограммы, отражающие результаты кластерного анализа UPGMA. Коэффициент корреляции между RAPD и ISSR-данными, полученными для форм Фонарик и Румянец и трех исследуемых сортов, составил 0,52 при уровне значимости 0,13. RAPD и ISSR-данные по всем формам коллекции имели коэффициент корреляции 0,58 при уровне значимости менее 0,05 и были объединены и представлены в виде единой дендрограммы на рис. 1.

Таблица 2

Характеристика спектров ампликонов, полученных с помощью использованных праймеров для сортов *P. fruticosa* (Gold Star, Red Ace и Gold Teppich, Румянец и Фонарик)

Праймер	Число маркеров	Размеры фрагментов, п.о.	Число фрагментов на образец (min, max, средн.)	Число уникальных маркеров
OPA-05	10	600-3000	3; 6; 4	3
OPA-10	5	260-1200	2; 4; 3	0
OPC-02	8	710-2700	0; 6; 2,6	5
OPC-13	4	1050-1800	2; 4; 2,6	0
OPG-08	10	300-1600	2; 6; 4	3
OPD-08	9	350-1700	1; 5; 3,6	5
UBC 807	24	360-2000	5; 13; 7,83	11
UBC 808	20	370-1600	5; 11; 8	5
UBC 810	20	440-1600	3; 12; 8,4	8
UBC 811	21	300-1700	7; 12; 10	4
UBC 818	19	480-1400	6; 11; 9	2
UBC 873	6	550-1200	3; 5; 4,4	0

Выводы

Совместное использование двух методов маркирования (RAPD и ISSR) позволило провести достаточно тщательное и разностороннее изучение генетического разнообразия коллекции курильского чая ЦБС НАН Б. Данные, полученные при паспортизации форм Фонарик и Румянец, сортов Gold Star, Gold Teppich и Red Ace двумя методами, не имели достоверно высокого коэффициента корреляции, при этом был отмечен одинаковый характер кластеризации всех пяти образцов. Наблюдаемые различия между данными двух методов, полученными при паспортизации всей коллекции, объясняются разным распределением RAPD и ISSR-ампликонов по геному: если RAPD-ампликоны распределены относительно равномерно, то ISSR-ампликоны ассоциированы с участками микросателлитной ДНК, характер изменчивости которой имеет свои особенности. Генотипирование всей коллекции RAPD и ISSR-маркерами привело к схожим данным. Полученные генетические паспорта для форм курильского чая могут использоваться для идентификации и патентования особо

ценных форм (это особенно важно для форм Румянец и Фонарик) и поддержания всей коллекции.

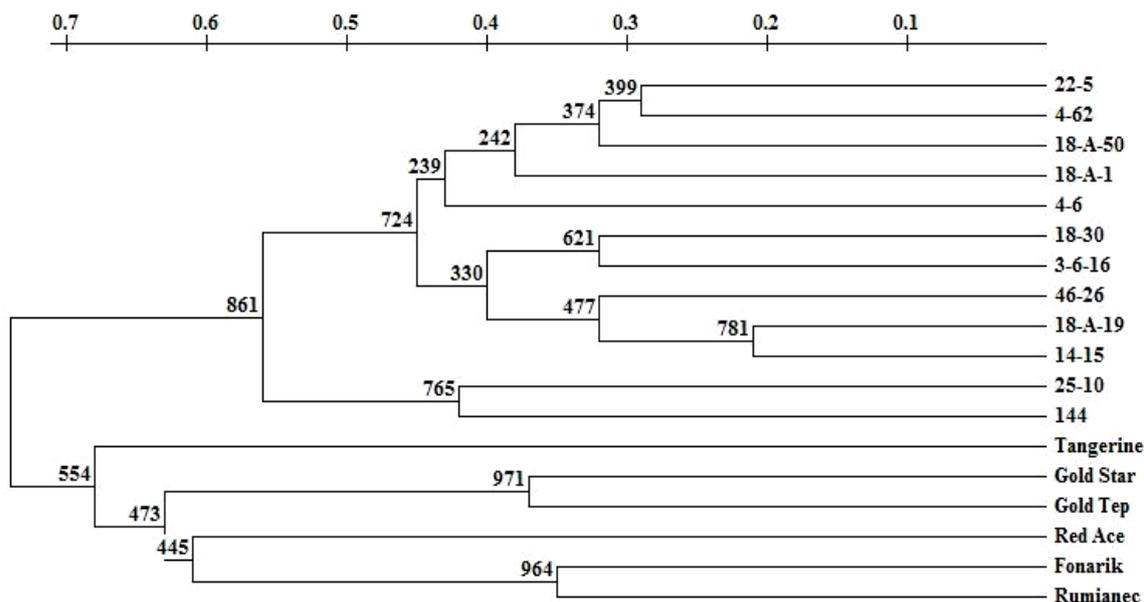


Рис. 1. RAPD+ISSR-дендрограмма на основе UPGMA-анализа, отражающая степень генетического сходства между формами и сортами *P. fruticosa*. Горизонтальная шкала – относительное генетическое расстояние между формами. В точках разветвления указаны результаты Bootstrap анализа

На основании полученных данных сделаны детальные выводы о генетических различиях и дистанциях исследованных форм, которые являются весьма ценными для дальнейшего процесса селекции. Таким образом, проведенные исследования показывают принципиальную возможность совместного применения RAPD и ISSR-маркеров для точного и достоверного генотипирования сортов курильского чая. Проведенное RAPD и ISSR-маркирование предоставило серьезные дополнительные аргументы в пользу выделения форм Фонарик и Румянец в самостоятельные сорта.

Список литературы

1. Минаева В. Г. Лекарственные растения Сибири. – Новосибирск: Наука, 1991. – 428 с.
2. Genetic diversity and relationships in mulberry (genus *Morus*) as revealed by RAPD and ISSR-marker assays / Awasthi A.K., Nagaraja G.M., Naik G.V., Kanginakudru S., Thangavelu K., Nagaraju J. // BMC Genetics. – 2004. – V. 5. – P. 1-9.
3. Beidler J.L., Hilliard P.R., Rill R.L. Ultrasensitive staining of nucleic acids with silver // Anal. Biochem. – 1982. – V. 126. – P. 374-380.
4. Creste S., Neto A.T., Figueira A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining // Plant Molecular Biology Reporter. – 2001. – V. 19. – P. 299-306.
5. Davidson C.G., Enns R.J., Gobin S.A. Checklist of *Potentilla fruticosa*: the Shrubby Potentillas. – Morden, Manitoba: Agric & AgriFood Canada Res Centre, 1994. – 80 p.
6. Elkington T. T., Woodell S. R. J. *Potentilla fruticosa* L. // J. of Ecol. – 1963. – V. 51, N 3. – P. 769-781.
7. Elkington T.T. Cytotaxonomic Variation in *Potentilla fruticosa* L. // New Phytologist. – 1969. – V. 68, N 1. – P. 151-160.

8. Eriksen B., Tupel M.H. Molecular phylogeography and hybridization in members of the circumpolar *Potentilla* sect. Niveae (Rosaceae) // Amer. J. of Bot. – 2006. – V. 93, N 3. – P. 460-469.
9. Gabrielsen T.M., Brochmann C. Sex after all: high levels of diversity detected in the arctic clonal plant *Saxifraga cernua* using RAPD-markers // Molecular ecology. – 1998. – V. 7. – P. 1701-1708.
10. Glacial survival does not matter: RAPD phylogeography of Nordic *Saxifraga oppositifolia* / Gabrielsen T.M., Bachmann K., Jakobsen K.S., Brochmann C. // Mol. ecology. – 1997. – V. 6. – P. 831-842.
11. Gregor V.T., Vechta, J. R., Weising K. RAPD-Untersuchungen und Chromosomenzählungen in der *Potentilla collina*-Gruppe (Rosaceae) // Ber. Bayer. Bot. Ges. Kassel. – 2003. – V. 72. – P. 159-167.
12. Hansen K. T., Elven R., Brochmann C. Molecules and morphology in concert: tests of some hypotheses in arctic *Potentilla* (Rosaceae) // Am. J. Bot. – 2000. – V. 87. – P. 1466-1479.
13. Hombergen E.J., Bachmann K. RAPD mapping of three QTLs determining trichome formation in *Microseris* hybrid H27 (Asteraceae: Lactuceae) // Theor. App. Genet. – 1995. – V. 90, N 6. – P. 853-858.
14. Martins M., Tenreiro R., Oliveira M.M. Genetic relatedness of Portuguese almond cultivars assessed by RAPD and ISSR-markers // Plant Cell Rep. – 2003. – V. 22. – P. 71-78.
15. Nei M., Li W. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases // PNAS. – 1979. – V. 76, N 10. – P. 5269-5273.
16. Roy A., Bandyopadhyay A., Mahapatra A.K. Evaluation of genetic diversity in jute (*Corchorus* species) using STMS, ISSR and RAPD-markers // Plant Breeding. – 2006. – V. 125. – P. 292-297.
17. Zhang J.Y., Yuan Q.H., Meng Y.Q. A genetic diversity analysis of wild *Lespedeza* populations based on morphological characters, allozyme and RAPD-methods // Plant Breeding. – 2007. – V. 126. – P. 89-94.

КУЛЬТУРА КАЛЛУСНЫХ ТКАНЕЙ И СОМАКЛОНАЛЬНАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ У ЭФИРОМАСЛИЧНЫХ РАСТЕНИЙ

Н.А. ЕГОРОВА, кандидат биологических наук;
И.В. СТАВЦЕВА, кандидат сельскохозяйственных наук;
А.Г. ИНЮТКИНА, Л.Н. ЧУБ, А.А. ЛОЛОЙКО

Институт эфиромасличных и лекарственных растений УААН, Симферополь, Украина

Введение

Селекция большинства эфиромасличных растений в основном ведется с использованием традиционных методов гибридизации и отбора, которые не всегда позволяют получать достаточно разнообразный исходный материал, отвечающий современным требованиям производства. Внедрение в селекционный процесс новых биотехнологических подходов позволяет существенно повысить его эффективность и конструировать генотипы на базе клеточной и генной инженерии, что было успешно продемонстрировано для ряда сельскохозяйственных растений [2, 5, 6].

Один из наиболее эффективных и относительно простых методов создания исходного селекционного материала основан на использовании соматической изменчивости культивируемых *in vitro* соматических клеток. Разработка этого направления для эфиромасличных растений весьма перспективна и связана, прежде всего, с оптимизацией условий длительного пассирования каллусных тканей и регенерации из них растений. В литературе имеется небольшое количество работ, посвященных исследованию процессов каллусо- и морфогенеза у отдельных эфиромасличных растений [8-12]. Однако для

основных возделываемых в Украине видов и сортов этой группы растений остаются не изученными многие методические вопросы, касающиеся оптимизации условий получения регенерантов в культуре изолированных тканей. Кроме того, очень важен анализ потомства полученных в культуре *in vitro* регенерантов для выявления возникающих соматональных изменений.

Целью проводимых исследований было изучение каллусо- и морфогенеза у некоторых эфиромасличных растений и анализ полученных регенерантов.

Объекты и методы исследования

Материалом для исследований служили ткани и органы эфиромасличных растений: лаванды – сорта Степная, Синева, Ранняя, Крымчанка, Вдала (*Lavandula angustifolia* Mill.); шалфея – сорта С-785, С-1122 (*Salvia sclarea* L.); кориандра – сорта Янтарь, Ранний, Нектар (*Coriandrum sativum* L.); фенхеля – сорт Мэрцишор (*Foeniculum vulgare* Mill.); герани – сорт Розовая (*Pelargonium roseum* Willd.); полыни эстрагон (*Artemisia dracunculus* L.) и тысячелистника (*Achillea filipendulina* Lam.,; *A. millefolium* L.).

В качестве эксплантов для получения каллусных культур использовали сегменты стеблей, листьев, черешков, соцветий, зародыши и меристемы. Культивирование проводили на различных модификациях среды Мурасиге и Скуга с применением традиционных методов культуры тканей [4]. Пассирование каллуса осуществляли каждые 30-40 сут. Каллусные ткани культивировали при + 26°C, 70%-ной влажности и освещенности 600 люкс, а при индукции морфогенеза – при освещенности 2-3 тыс. люкс с 16-часовым фотопериодом. Потомство полученных регенерантов изучали в полевых условиях в научном севообороте ИЭЛР (с. Крымская Роза Белогорского района АРК). Полученные данные обрабатывали с применением традиционных методов математической статистики на компьютере, используя пакет программ Microsoft Office XP.

Результаты и обсуждение

Получение каллусных тканей для всех изученных нами видов растений не представляло значительной сложности, при этом было показано, что частота каллусообразования и ростовой индекс каллуса при его длительном культивировании зависели от генотипа, типа экспланта, гормонального состава среды, пассажа и режимов культивирования. Максимальный индекс роста каллусной ткани был отмечен у лаванды (более 18-20), а минимальный – у фенхеля и тысячелистника (до 5-8), тогда как у остальных изученных видов этот показатель был в пределах 12-16. У большинства изученных видов (лаванда, шалфей, фенхель, герань) прирост массы каллуса достоверно не отличался при различных режимах освещения, а у полыни – был в 1,7 раза выше при освещенности 2-3 тыс. люкс по сравнению с культивированием без освещения или при 600 люкс.

Показано, что у всех изученных нами видов возможна индукция морфогенеза из каллусных культур и регенерация растений. Частота регенерации *in vitro* зависела от генотипа, типа экспланта, состава среды и длительности пассирования каллуса. Были оптимизированы питательные среды и подобраны типы эксплантов для индукции морфогенеза и получения проростков. Эмбриогенные каллусные ткани у кориандра были получены из генеративных органов (соцветий и завязей), а у фенхеля – из стеблевых сегментов и зародышей. У лаванды формирование побегов происходило в каллусных культурах, полученных из листьев и меристем, у шалфея – в каллусах из меристем или основания микрочеренков, у полыни – в каллусах из листьев и стеблей, а у тысячелистника – из листового каллуса. У герани все проанализированные экспланты (стебель, черешок и листовая пластинка, цветок) образовывали каллус, способный к индукции морфогенеза при переносе на регенерационную среду. Для ряда видов было установлено, что высокая частота морфогенеза наблюдалась при использовании в качестве эксплантов меристем или зародышей. Так, у лаванды сорта Степная максимальная частота морфогенеза из листового

каллуса была 45,5%, а из меристемного – 90,9%. У фенхеля сорта Мэрцишор у каллусов стеблевого происхождения этот показатель достигал 31,8%, а у каллусов, полученных из меристем, – 94,5%.

Для получения соматоклональных вариантов важно регенерировать растения из длительно культивируемых каллусных тканей, поскольку при их пассировании возрастает генетическая изменчивость клеток, и следовательно, вероятность возникновения измененных форм [2, 5]. Индукция морфогенеза у изученных нами видов в значительной степени лимитировалась длительностью культивирования каллуса. У большинства видов и сортов регенерация растений *in vitro* ограничивалась 3-4 пассажами. Только у герани каллусные ткани обладали способностью к индукции морфогенеза при переносе на среду для регенерации в течение трех лет культивирования. Установлено, что у лаванды, кориандра и шалфея иногда формировались штаммы, сохраняющие морфогенетические потенции при культивировании в течение 1-2-х лет. Следует отметить, что у всех изученных видов при увеличении длительности культивирования наблюдали снижение частоты морфогенеза, что показано на примере каллусной ткани фенхеля 1-3-го пассажей (рис.).

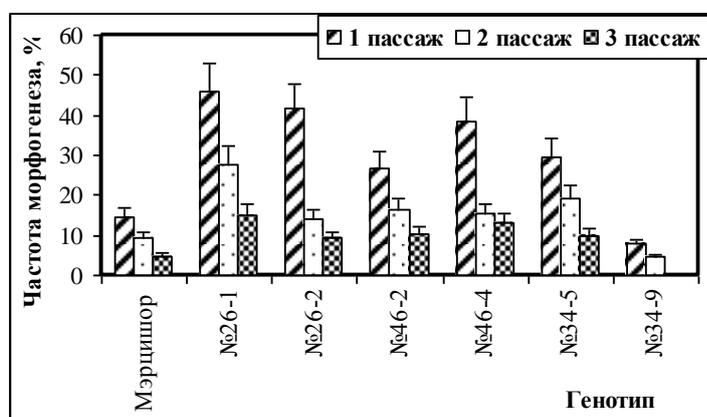


Рис. Влияние генотипа и пассажа на индукцию морфогенеза в каллусных культурах фенхеля

Выявлена значительная сортовая вариабельность по способности каллусных культур к регенерации *in vitro*, при этом у некоторых сортов или образцов при испытанных условиях не наблюдали морфогенез. Так, у лаванды из 7 изученных сортов и селекционных образцов только у пяти в листовом каллусе отмечали формирование почек и побегов с частотой от 7,8 до 47,8%. Аналогичные закономерности были выявлены у полыни, кориандра и тысячелистника.

Частота индукции каллусо- и морфогенеза зависели не только от сорта, но и генотипа индивидуального донорного растения. В частности, у фенхеля было показано, что растения в пределах одного сорта Мэрцишор варьировали не только по частоте каллусогенеза (от 0 до 100%), но и по частоте соматического эмбриогенеза (от 0 до 54,5%).

Установлено, что у некоторых эфиромасличных растений (лаванды, тысячелистника, фенхеля, кориандра) при использовании в качестве донорных растений-регенерантов происходило повышение частоты индукции морфогенеза в каллусной культуре. В частности, у фенхеля показано, что при получении каллусов из регенерантов не только повышалась в 2-4 раза частота морфогенеза, но и продлевалась до 5-9 пассажа их способность к регенерации по сравнению с исходным сортом. Как видно из представленных данных, частота морфогенеза в 1-3 пассажах в каллусных тканях, полученных из регенерантов (№№ 26-1; 26-2; 46-2; 46-4; 34-5) в несколько раз выше, чем у сорта Мэрцишор (рис.). Однако при общем повышении морфогенетического потенциала среди регенерантов изредка обнаруживались образцы (№ 34-9) с низкой способностью к морфогенезу (рис.). У люцерны и подсолнечника также были получены данные о более высокой регенерационной способности регенерантов по сравнению с исходными генотипами [1, 7].

Полученные в культуре каллусных тканей регенеранты у изученных нами видов растений отличались от исходных сортов по многим морфологическим признакам. Среди

регенерантов R_0 , особенно полученных из каллусов 6-10 пассажей, иногда встречались растения со слабым ростом, нежизнеспособные, с пониженной фертильностью. Большинство этих негативных изменений были эпигенетическими и исчезали в следующем поколении, что, судя по литературным данным, характерно и для некоторых других видов растений [2, 6].

Изучение вегетативного потомства регенерантов герани показало наличие большого числа морфологически измененных форм (до 33-56%), которое зависело от сорта и типа экспланта, при этом число соматклонов возрастало с увеличением количества пассажей [3]. Следует отметить, что у одного соматклона могли быть измененными сразу несколько признаков – например, форма и окраска листа и толщина стебля. Кроме того, была выявлена значительная вариабельность регенерантов по числу хромосом и основным хозяйственно ценным признакам. У герани, в отличие от других изученных нами видов, отмечена значительная вариабельность по качественному составу эфирного масла. Так, содержание одного из основных компонентов – цитронеллола варьировало у разных образцов от 5,6 до 61,4%; выделялись также хемотипы с высоким содержанием гераниола, ментона [3].

У лаванды до 23 % регенерантов имели морфологические отклонения по сравнению с исходными сортами, что проявлялось в изменении окраски и размеров листьев, длины соцветия, количества цветков; появлении утолщенных антоциановых побегов, укороченных междоузлий. Наблюдалась также вариабельность некоторых хозяйственно полезных признаков. Однако значительной изменчивости по компонентному составу эфирного масла, как это было показано для регенерантов *L. vera* [12], среди изученных нами образцов не выявлено.

Анализ семенного потомства регенерантов кориандра позволил выявить образцы, отличающиеся от исходного сорта Янтарь по высоте растений, форме листьев, окраске стебля и цветков, количеству соцветий, а также «кустистые» формы с увеличенным числом побегов. Варьировали и некоторые хозяйственно ценные признаки (масса плодов, урожайность, массовая доля эфирного масла). У шалфея семенное потомство регенерантов также проявило большую изменчивость по морфологии (форме куста и листьев, окраске венчика) и некоторым количественным признакам по сравнению с сортом С-785 (табл.).

Таблица

Варьирование некоторых количественных признаков у регенерантов шалфея (2006-2008 гг.)

Признак	Исходный сорт С-785	Регенеранты	
	среднее	лимиты изменчивости	V, %
Высота растения, см	131,9±8,8	79,6 – 166,0	20,7
Длина центрального соцветия, см	60,2±1,7	22,3 – 74,3	18,9
Количество боковых ответвлений 2 порядка, шт.	11,9±1,9	0,0 – 19,3	171,1
Количество боковых соцветий, шт.	6,6±1,5	1 – 13	52,7
Масса соцветий, г/растения	593,2±74,7	90,8 – 1035,0	53,3
Массовая доля эфирного масла, %	0,25±0,04	0,08 – 0,47	40,2
Сбор эфирного масла, г/растения	2,01±0,80	0,04 – 2,46	74,6
Содержание линалилацетата, %	55,3±3,8	46,6 – 63,1	6,7

Выводы

В результате проведенных исследований были изучены особенности каллусо- и морфогенеза *in vitro* у некоторых эфиромасличных растений и выявлены способы,

позволяющие повысить частоту морфогенеза, а также получить регенерацию из длительно пассируемых тканей – выделение морфогенных штаммов, отбор индивидуальных растений с высокой регенерационной способностью, использование регенерантов в качестве донорных.

Анализ полученных в культуре каллусных тканей растений исследуемых видов выявил их вариабельность по морфологии и хозяйственно ценным признакам. При этом были выявлены перспективные для селекции формы, превышающие до 30-80% исходные сорта по урожайности и сбору эфирного масла.

Список литературы

1. Соматический эмбриогенез в каллусе из семядолей незрелых зародышей подсолнечника / Антонова Т.С., Краснянский С.Ф., Челюстникова Т.А., Зезуль Т.Г. // Докл. ВАСХНИЛ. – 1991. – № 4. – С. 9-13.
2. Долгих Ю.И. Соматическая изменчивость растений и возможности ее практического использования (на примере кукурузы): Автореф. дис... докт. биол. наук: 03.00.12 / Институт физиологии растений РАН. – М., 2005. – 35 с.
3. Егорова Н.А., Бугара А.М., Ермилова А.М. Получение исходного материала для селекции эфиромасличной герани методами культуры тканей // Труды ИЭЛР. – Симферополь, 1998. – Т. 24. – С. 98-110.
4. Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. – К.: Наук. думка, 1980. – 488 с.
5. Мельничук М.Д., Новак Т.В., Кунах В.А. Биотехнология растений: Підручник – К.: Поліграф Консалтинг, 2003. – 520 с.
6. Чеченева Т.Н. Изменчивость злаков в культуре *in vitro* и в процессе регенерации растений // Физиология и биохимия культ. растений. – 2006. – Т. 38, № 2. – С. 163-175.
7. Atanassov A., Vlachova M. Somatic embryogenesis in callus and cell suspension cultures in three species of medicago // Tissue Cult., Forest and Agr.: Proc. 3rd Tenn. Symp. Plant Cell and Tissue Cult., Knoxville, Tenn., 9-13 Sept., 1984. – New York; London, 1985. – P. 301-302.
8. Hunault G., Maatar A. Enhancement of somatic embryogenesis frequency by gibberellic acid in fennel // Plant Cell, Tissue and Organ Cult. – 1995. – V. 141, N 2. – P. 171-176.
9. Murthy B. N. S., Singh R. P., Saxena Praveen K. Induction of high-frequency somatic embryogenesis in geranium (*Pelargonium x hortorum* Bailey cv. Ringo Rosso) cotyledonary cultures // Plant Cell Repts. – 1996. – V. 15, N 6. – P. 423-426.
10. Murthy H.N., Hahn E.J., Paek K.Y. Recurrent somatic embryogenesis and plant regeneration in *Coriandrum sativum* L. // Scientia Hort. – 2008. – V. 118, N 2. – P.168-171.
11. Skala E., Wysokinska H. *In vitro* regeneration of *Salvia nemorosa* L. from shoot tips and leaf explants // *In vitro* Cell. Dev. Biol. Plant. – 2004. – V. 40, N 6. – P. 596-602.
12. Tsuru M., Inoue M., Kameoka H. Variation in essential oil components in regenerated lavender (*Lavandula vera* DC) plants // Scientia Hort. – 2001. – V. 88, N 4. – P. 309-317.

ОПТИМИЗАЦИЯ ВЫРАЩИВАНИЯ СУСПЕНЗИОННЫХ КУЛЬТУР КЛЕТОК *DIOSCOREA DELTOIDEA* WALL И *POLYSCIAS FILICIFOLIA* BAILEY В ПОЛУПРОТОЧНОМ РЕЖИМЕ В БИОРЕАКТОРАХ РАЗЛИЧНОГО ОБЪЕМА

М.В. ТИТОВА; Н.А. ШУМИЛО; И.Е. КУЛИЧЕНКО;

А.В. ОРЕШНИКОВ, кандидат биологических наук

Учреждение Российской академии наук Институт физиологии растений им. К.А.

Тимирязева РАН, Москва, Россия

А.М. НОСОВ, доктор биологических наук

Биологический факультет Московского государственного университета им. М.В.

Ломоносова, Москва, Россия

Введение

В настоящее время культура клеток высших растений является альтернативным способом получения сырья для косметической, фармацевтической и пищевой промышленности [2, 6]. По сравнению с использованием интактных растений, применение технологий растительных клеток *in vitro* имеет ряд преимуществ, в частности:

- возможность получения необходимых количеств качественного продукта с воспроизводимыми характеристиками в стерильных контролируемых условиях;
- независимость от климатических и политических факторов;
- возможность использования биотрансформации для получения новых метаболитов;
- удобство производства и очистки продукта [6].

Однако следует отметить и ряд проблем, связанных с промышленным использованием культур клеток высших растений:

- трудности получения и сохранения высокопродуктивного штамма- продуцента;
- возможное снижение уровня содержания вторичных метаболитов в шамме-продуценте при длительном культивировании, опасность его генетической нестабильности;
- низкая скорость роста растительных клеток (относительно микробных культур);
- высокие требования к используемому оборудованию и, как следствие, высокая стоимость получаемой биомассы;
- технические трудности осуществления крупномасштабного выращивания клеток растений в промышленных биореакторах [3, 4].

Таким образом, для создания эффективной технологии получения биомассы культур клеток необходим целый комплекс научных и технологических исследований. Не считая получения штамма-продуцента с высокими ростовыми и биосинтетическими характеристиками, что является основой создаваемой технологии, требуется оптимизировать выращивание культур клеток в биореакторах. Для этого необходимы эксперименты по выбору оптимального типа биореактора и определения наиболее выгодных режимов выращивания культур. Кроме того, требуются специальные исследования по масштабированию процесса выращивания до биореакторов полупромышленного и промышленного объемов [3, 7].

Известно, что для промышленного производства биомассы можно использовать три варианта культивирования: периодический, проточный и полупроточный.

С точки зрения создания стабильного масштабного производства, проточный и периодический методы выращивания имеют ряд недостатков. В частности, при периодическом режиме требуется значительное время для подготовки и стерилизации биореактора, каждый новый цикл культивирования требует нового посевного материала, что может приводить к нестабильности биосинтеза и роста культуры. Проточное культивирование более стабильно, однако требует введения в схему биореактора дополнительных устройств (перистальтических насосов, разделительных мембран и пр.),

что для биореакторов промышленного объема представляет определенные конструктивные проблемы и значительно повышает стоимость процесса получения биомассы. Для проточного режима показано также изменение морфофизиологических характеристик и состава клеточных популяций (за счет отбора интенсивно делящихся клеток с пониженным синтезом). Наиболее перспективным представляется полупроточный или "отливно-доливной" метод культивирования, который занимает промежуточное положение между проточным и периодическим режимами выращивания. При использовании данного метода суспензия клеток разбавляется свежей питательной средой в фазу максимального накопления сухой массы в единице объема суспензии, что позволяет поддерживать клеточную популяцию в активно растущем состоянии и значительно уменьшает время культивирования [5].

Целью данной работы явилось оптимизирование режимов культивирования растительных клеток в биореакторах разной конструкции и объема для рентабельного производства биомассы. Для реализации поставленной задачи была исследована возможность длительного аппаратного выращивания суспензионных культур клеток с использованием полупроточного метода.

Объекты и методы исследования

В качестве объектов исследования были использованы суспензионные культуры клеток диоскореи дельтовидной и полисциаса папортниколистного. Культуры депонированы в ВККК ВР ИФ РАН под соответствующими номерами: *Dioscorea deltoidea* Wall, мутантный штамм-сверхпродуцент фураностаноловых гликозидов ИФР ДМ-0.5 (№ 6); *Polyscias filicifolia* Bailey, коллекционный штамм ВФТ-001-95 (№ 58).

Культуры выращивали на модифицированных средах Мурасиге и Скуга с добавлением сахарозы и регуляторов роста. Для всех штаммов начальная плотность культур находилась в пределах 2,0-2,5 г/л по сухому весу при жизнеспособности культур 87-93%.

Культивирование проводили в колбах и в биореакторах.

Для выращивания суспензионных культур клеток в колбах на круговой качалке использовали колбы объемом 0,5-2,0 л. Культивирование проводили в темноте при температуре 26-27°C, влажности 70-75% и частоте оборотов качалки 80-100 об/мин.

Для аппаратного выращивания использовали биореакторы 3-х типов:

1) барботажный соплоконусный ферментер (разработка Отдела биологии клетки и биотехнологии РАН), общий объем 20 л, рабочий объем 15 л.

2) аппарат с барботажем и механическим перемешиванием (фирма «Electrolux», Швеция); общий объем 75 л, рабочий объем 50 л, тип перемешивающего устройства «морской винт», скорость вращения мешалки при культивировании 30-65 об/мин.

3) барботажный аппарат (1Т, ОКБА, Йошкар-Ола), общий объем 630 л; рабочий объем 550 л.

В зависимости от типа биореактора и фазы ростового цикла расход воздуха на барботаж составлял 0,1-1,0 л/л/мин. Концентрацию растворенного кислорода pO_2 поддерживали на уровне 10-40% от насыщения при отсутствии интенсивного пенообразования. Для уменьшения отрицательного воздействия перемешивающих устройств в биореакторах с механическим перемешиванием на начальных фазах роста устанавливали минимальную скорость перемешивания по отсутствию седиментации клеток. В период экспоненциального роста скорость вращения мешалки увеличивали до максимально возможной, не приводящей к разрушению клеток (степень повреждения определяли микроскопически). Температуру суспензии поддерживали на уровне $26 \pm 0,5^\circ C$.

Для характеристики роста и физиологического состояния культур использовали сухую и сырую массы, а также жизнеспособность и концентрацию клеток. По

первичным результатам, характеризующим рост культуры, рассчитывали следующие параметры:

индекс роста: $I=X_{\max}/X_0$;

удельную скорость роста в экспоненте: $\mu=(\Delta \ln X/X_0)/\Delta t$, [сут⁻¹]

время удвоения: $T=\ln 2/\mu$, [сут], где

X_{\max} – максимальное значение параметра (сухая масса M_{dw} , сырая масса M_{fw}) в цикле роста;

X_0 – начальное значение параметра в цикле роста;

Δt – значение времени длительности экспоненциальной фазы роста, [сут].

При выращивании суспензионной культуры клеток *D. deltoidea* конце каждого цикла субкультивирования отбирали образцы биомассы и проводили количественное определение фураностаноловых гликозидов. Анализ гликозидов осуществлялся спектрофотометрическим методом с использованием реактива Эрлиха [1].

Результаты и обсуждение

Для проведения экспериментов по оптимизации и масштабированию выращивания была использована стратегия, типичная для микробных культур: предварительные эксперименты в лабораторных биореакторах (объем 2-15 л) по оптимизации роста культуры, затем выращивание в пилотных установках (объемом до 50 л) и проверка выбранных режимов, и наконец – масштабирование выращивания до полупромышленных и коммерческих биореакторов (объемом более 500 л) [5]. Для реализации этой схемы был использован ряд биореакторов с рабочим объемом от 15 до 550 л и различной системой перемешивания, причем аппараты меньшего объема использовались как инокуляторы для аппаратов большего объема.

При использовании этой схемы в течение 5 лет проводились многократные эксперименты по длительному полупроточному выращиванию суспензионных культур клеток *P. filicifolia* и *D. deltoidea*. Для всех типов биореакторов процесс «отлива-долива» проводили при достижении плотности суспензии, соответствующей началу фазы замедления роста. Разбавление средой в каждом цикле проводили до концентрации биомассы, исключающей появление лаг-фазы (2,0-2,5 г/л среды по сухому весу). При снижении плотности инокулюма ниже 2,0 г/л отмечали падение жизнеспособности клеток, уменьшение удельной скорости роста и конечной концентрации сухой биомассы, а в некоторых случаях – полную остановку роста и гибель популяции.

Полученные типичные кривые роста, а также соответствующие им основные ростовые характеристики представлены на рис. 1, 2, 3, 4 и в табл. Как следует из полученных результатов, для барботажных биореакторов удельная скорость роста культур варьировала в пределах 0,12-0,28 сут⁻¹ для *P. filicifolia* и 0,12-0,18 сут⁻¹ для *D. deltoidea*; максимальное накопление биомассы происходило на 9-14 сутки и достигало 15,0-17,0 г/л по сухому весу для культуры клеток полисциаса и 11,0-14,0 г/л для диоскореи. Жизнеспособность клеток сохранялась на уровне 90-85% для *P. filicifolia* и 90-80% для *D. deltoidea*. Для пилотного биореактора с механическим перемешиванием наблюдали общее снижение всех ростовых характеристик: удельная скорость роста составляла 0,13-0,11 сут⁻¹ для культуры клеток полисциаса и 0,12-0,10 сут⁻¹ для диоскореи. Максимальное накопление биомассы не превышало 12,0 г/л по сухому весу для *P. filicifolia* и 8,0 г/л для *D. deltoidea*; жизнеспособность варьировала в пределах 80-77 и 73-66% соответственно. Такой характер изменения ростовых параметров обусловлен, по-видимому, повреждающим действием механического перемешивания на клетки суспензии.

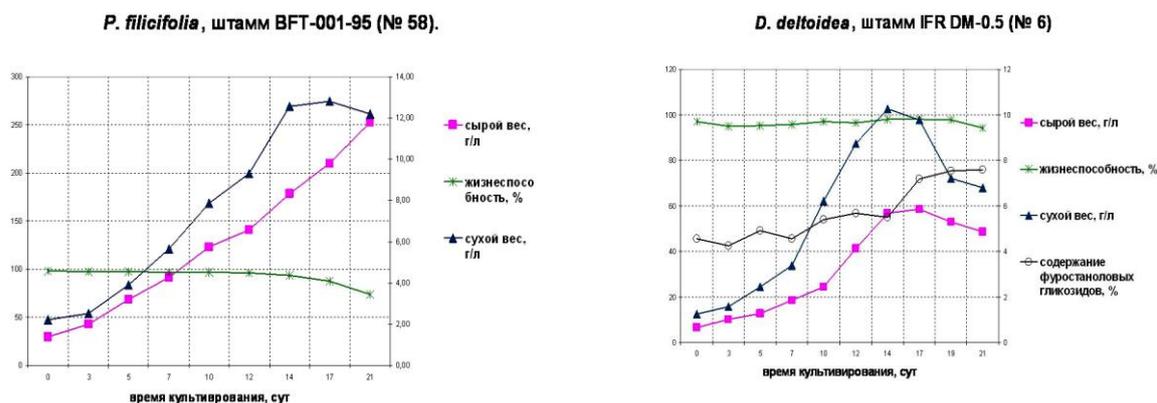


Рис. 1. Динамика роста суспензионных культур клеток *P. filicifolia* и *D. deltoidea* при периодическом выращивании в колбах

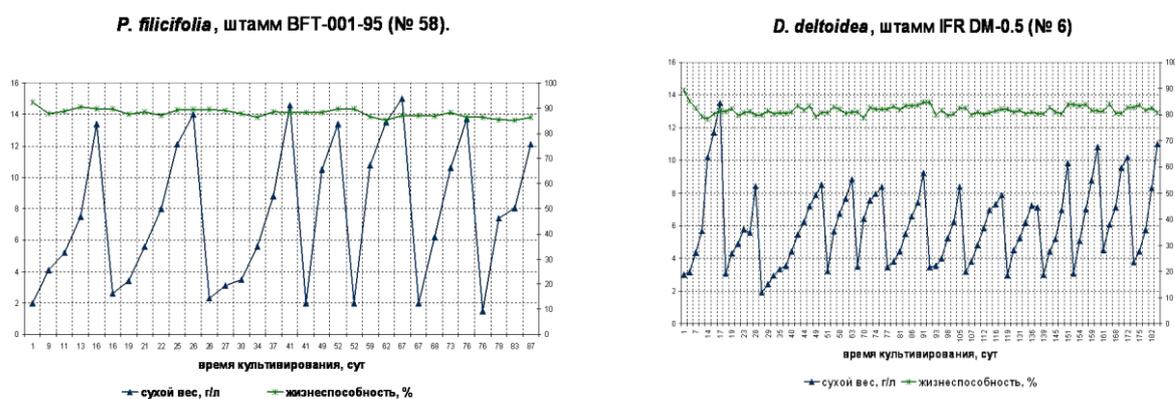


Рис. 2. Динамика роста суспензионных культур клеток *P. filicifolia* и *D. deltoidea* при полупроточном выращивании в 20L барботажном биореакторе

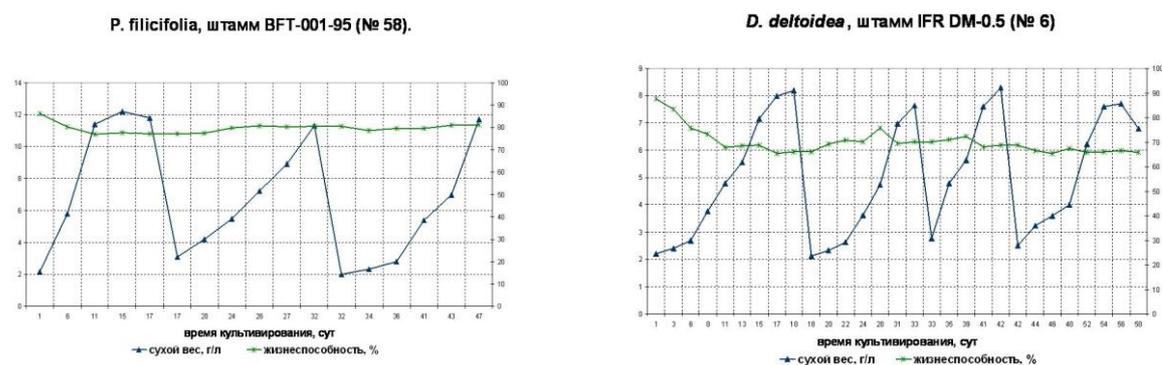


Рис. 3. Динамика роста суспензионных культур клеток *P. filicifolia* и *D. deltoidea* при полупроточном выращивании в 75L биореакторе с механическим перемешиванием

Содержание фураностероидных гликозидов при полупроточном культивировании сохранялось на уровне 4,5-9,5%, что не ниже, чем при стандартном периодическом выращивании культуры в колбах на качалке.

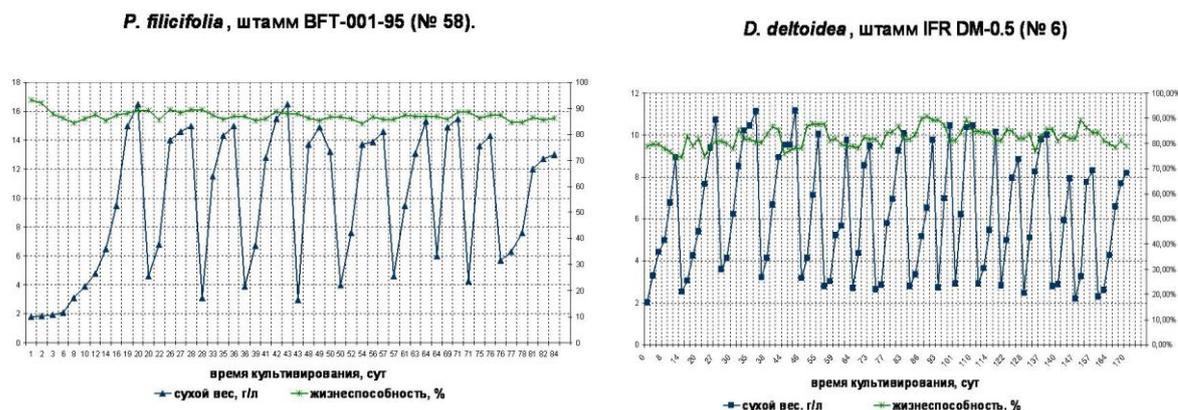


Рис. 4. Динамика роста суспензионных культур клеток *P. filicifolia* и *D. deltoidea* при полупроточном выращивании в 630L барботажном биореакторе

Таблица
Основные характеристики роста суспензионных культур клеток *P. filicifolia* и *D. deltoidea* при полупроточном выращивании в различных системах культивирования

Параметр	Объект	20L биореактор	75L биореактор «Electrolux»	630L биореактор	Колбы
M _{max} dry weight, г/л	<i>P. filicifolia</i>	15,02	11,82	16,54	12,8
	<i>D. deltoidea</i>	13,53	8,30	11,16	10,27
Удельная скорость роста, $\mu\text{M}, \text{сут}^{-1}$	<i>P. filicifolia</i>	0,28-0,17	0,13-0,11	0,19-0,12	0,22-0,15
	<i>D. deltoidea</i>	0,14-0,12	0,12-0,10	0,18-0,15	0,20-0,15
Продуктивность, $P_{\text{dry weight}}, \text{г/л} \cdot \text{сут}$	<i>P. filicifolia</i>	0,98-0,71	0,63-0,55	0,81-0,59	0,96-0,75
	<i>D. deltoidea</i>	0,75-0,48	0,58-0,36	0,75-0,63	0,63-0,46
Индекс роста, I_{M}	<i>P. filicifolia</i>	7,55-5,89	5,85-3,75	7,65-3,84	7,20-5,53
	<i>D. deltoidea</i>	5,82-3,32	4,21-3,63	5,41-3,47	6,84-5,15
Жизнеспособность, %	<i>P. filicifolia</i>	89,0-86,0	80,0-77,0	89,0-85,0	98,0-96,
	<i>D. deltoidea</i>	83,0-79,0	73,0-66,0	89,0-77,0	98,0-95,0
Содержание фураностол. гликозидов, %	<i>D. deltoidea</i>	4,6-6,8	3,0-4,5	6,2-9,5	4,5-7,6

Сходные данные были получены и для других циклов полупроточного культивирования клеток *P. filicifolia* и *D. deltoidea*.

Выводы

Таким образом, было продемонстрировано, что при переходе к длительному полупроточному культивированию в биореакторах разных типов суспензионные культуры клеток *D. deltoidea* и *P. filicifolia* сохраняют удовлетворительные ростовые и биосинтетические характеристики и предложенная схема масштабирования вполне может быть использована для производственного выращивания. Кроме того, для штамма ИФР ДМ-0,5 культуры клеток диоскореи дельтовидной остается стабильной также способность к синтезу фураностоловых гликозидов, что весьма существенно

при разработке промышленного производства биомассы.

В целом при использовании полупроточного режима выращивания общая продуктивность процесса повышается в среднем на 15-20% за счет отсутствия лаг-фазы и времени, необходимого на подготовку периодического культивирования.

Список литературы

1. Определение олигофуранозидов в культуре клеток *Dioscorea deltoidea* Wall спектрофотометрическим методом / Васильева И.С., Воробьев А.С., Горская Н.В., Липский А.Х., Гуриелидзе К.Г., Пасешниченко В.А. // Прикладная биохимия и микробиология. – 1987. – № 5. – С. 692.
2. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective / Bourgaud F., Gravot A., Milesi S., Gontier E. // Plant Science. – 2001. – 161. – P. 839-851.
3. Collin H.A. Secondary product formation in plant tissue cultures // Plant Growth Regulation. – 2001. – № 34. – P. 119-134.
4. DiCosmo F., Misawa M. Plant cell and tissue culture: alternative for metabolite production // Biotechnology Advances. – 1995. – № 3. – P. 425-453.
5. Kieran P.M., MacLoughlin P.F., Malone D.M. Plant cell suspension cultures: some engineering considerations // Journal of Biotechnology. – 1997. – 59. – P. 39-52
6. Ramachandra Rao S., Ravishankar G.A. Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites // Biotechnology Advances. – 2002. – V. 20. – P. 101-153.
7. Verpoorte R., Contin A., Memelink J. Biotechnology for the production of plant secondary metabolites // Phytochemistry Reviews. – 2002. – № 1. – P. 13-25.

РАЗМНОЖЕНИЕ БОРЕЦА СЕВЕРНОГО В КАЛЛУСНОЙ КУЛЬТУРЕ *IN VITRO* НА ОСНОВЕ ФЕНОМЕНА ЭМБРИОИДОГЕНИИ

Н.Н. КРУГЛОВА, доктор биологических наук; А.Е. КРУГЛОВА
Учреждение РАН Институт биологии Уфимского НЦ РАН, Уфа, Россия

Введение

Длительный процесс адаптивной эволюции привел к возникновению у цветковых растений разнообразных репродуктивных структур, обеспечивающих семенное (гетерофазная репродукция) и вегетативное (гомофазная репродукция) размножение [1]. Особый интерес вызывают случаи формирования эмбриоида (синонимы: соматический зародыш, зародышеподобная структура, адвентивный зародыш) – зачатка растения, образующегося из соматических (неполовых) клеток. Системный эмбриологический подход позволил установить новую категорию вегетативного (бесполого) размножения цветковых растений – эмбриоидогению; показано, что растения, образующиеся из эмбриоидов, представляют собой клоны – особи, генетически идентичные между собой и исходным растением [2].

В течение ряда лет явление эмбриоидогении в каллусной культуре *in vitro* изучается нами на примере борца северного *Aconitum lycoctonum* L. (синоним: аконит высокий *Aconitum septentrionale* Koelle), многолетнего растения из семейства Лютиковые (рис. 1).

Помимо теоретического значения, связанного с выявлением разнообразия способов размножения и систем репродукции цветковых растений, полученные данные имеют и прикладное значение для разработки способа стабильного получения растений-клонов этого ценного лекарственного растения.

В корневищах и в меньшей степени в надземной части бореца северного содержится ряд фармакологически активных алкалоидов [6].



Рис. 1. Борец северный *Aconitum lycoctonum* L. в природных условиях, х0.08

Особый интерес вызывает алкалоид лаптаконитин. Именно борец северный – единственный источник производимого из лаптаконитина высокоэффективного антиаритмического препарата аллапинин, разрешенного к производству Минздравом РФ (с 1992 г.), запатентованного в США, Японии и Германии [5].

В настоящее время борец северный достаточно широко распространен на Южном Урале [7]. Однако в корневищах растений, произрастающих на большей части ареала, отмечается низкое содержание лаптаконитина, что делает нерентабельной их заготовку как сырья.

В то же время места сбора корневищ с высоким/супервысоким содержанием лаптаконитина приурочены к малонаселенным горным или таежным районам. Кроме того, массовый сбор корневищ большими группами, как правило, неквалифицированных сборщиков наносит существенный урон всему растительному покрову региона сбора и ведет к тому, что это ценное растение может попасть в категорию исчезающих видов. Таким образом, поиск альтернативных способов расширения сырьевой базы для производства препарата аллапинин весьма актуален.

Цель работы состояла в разработке способа стабильного получения растений бореца северного – клонов суперпродуцентов лаптаконитина, на основе использования феномена эмбриоидогении в каллусной культуре *in vitro*.

Объекты и методы исследования

Объектом исследования послужили растения бореца северного – суперпродуценты лаптаконитина, отобранные на основании морфологических показателей во время экспедиционных выездов по Южному Уралу сотрудниками лаборатории экологии растительных ресурсов Института биологии Уфимского НЦ РАН (зав. лабораторией – д.б.н. Н.И. Федоров) и предварительно проанализированные методом ВЭЖХ на содержание лаптаконитина.

Использовали метод культуры органов, тканей и клеток растений *in vitro* [3], светооптические методы исследования [4].

Результаты и обсуждение

На первом этапе экспериментов с помощью гистологического контроля подобрали корневищные почки, характеризующиеся развитыми апексами. Высечки апексов таких корневищных почек, содержащие меристематическую ткань, использовали в качестве эксплантов для получения каллусов. Высечки инокулировали на среду I, составленную по Мурасиге и Скуга [9], с введением кинетина в эмпирически подобранной концентрации (know how), адекватной для индукции каллусообразования *in vitro*, и размещали в темноте при температуре +20°C.

Через 7-9 суток культивирования формировались каллусы, которые переносили на среду II, также составленную по Мурасиге и Скуга, с введением фитогормона ИУК в эмпирически подобранной концентрации (know how), индуцирующей формирование в каллусах эмбриоидов. Каллусы культивировали в темноте при температуре +26°C.

Через каждые сутки культивирования проводили гистологический анализ части каллусов для выявления механизмов формирования и развития эмбриоидов. Так, установлено, что эмбриоиды развиваются из комплекса инициальных клеток, изолированных от остальных клеток каллуса. На 28-30 суток культивирования эмбриоид характеризуется наличием органов, типичных для зародышей двудольных растений: апекс побега, апекс корня, заложившаяся пара первых листьев. К 30-35 суткам эмбриоид представлен структурой с хорошо развитыми зародышевым корнем, парой первых листьев и заложившейся парой вторых листьев.

Такие эмбриоиды во множестве отмечены на поверхности каллусов. Тот факт, что из одного каллуса (полученного в свою очередь из одной высежки корневищной почки растения-суперпродуцента) можно получить множество эмбриоидов, хотелось бы подчеркнуть особо.

Эмбриоиды переносили на среду III, составленную по Блейдзу [8], и размещали при освещенности 18 клк в условиях имитации летнего светового дня (18 час свет/6 час темнота). На 35-38 сутки эмбриоиды давали начало проросткам (рис. 2, а).

После формирования у проростков корневой системы их переносили в вегетационные сосуды со специально подобранной почвенной смесью, размещали также при освещенности 18 клк. Вокруг проростков поддерживали высокую влажность. В таких условиях проростки активно вегетировали и формировали растения (рис. 2, б).

В дальнейшем планируется перевести регенеранты в условия открытого грунта на полевые участки научного стационара и через 3-4 года провести оценку их корневищ по содержанию лаппаконитина.

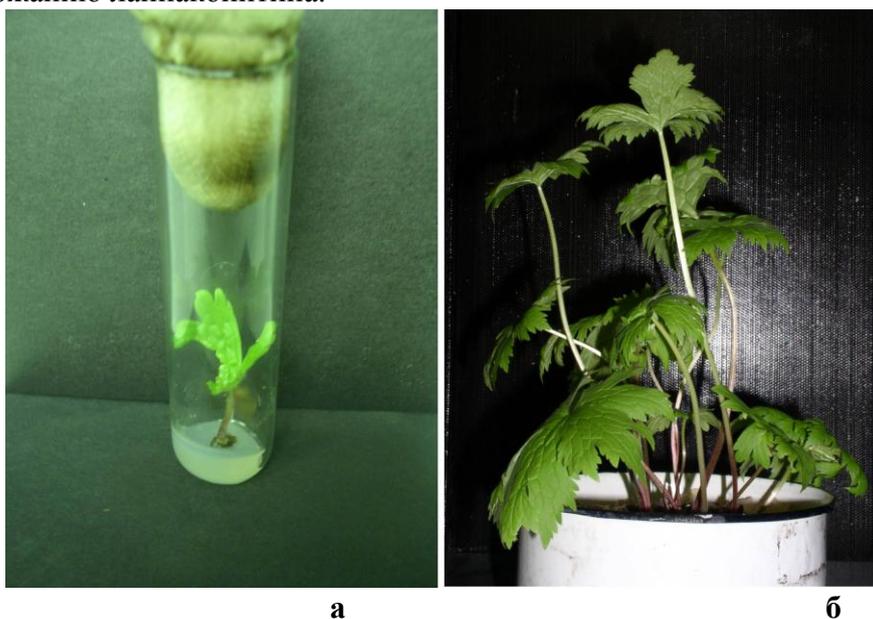


Рис. 2. Формирование и развитие регенерантов борца северного: а – проросток в условиях *in vitro*, х 0.8; б – регенерант в фазу вегетации, х 0.1

Выводы

Анализ полученных данных дает основание выделять у борца северного способ размножения в каллусной культуре *in vitro* через этап формирования эмбриоидов. Тем самым еще одно экспериментальное подтверждение получает концепция эмбриоидогении как особой категории вегетативного размножения растений в условиях *in vitro* [2].

Разработан способ стабильного получения регенерантов ценного лекарственного растения борца северного в культуре *in vitro*. Преимущество данного способа состоит в возможности массового получения клонов как вегетативного потомства растения – суперпродуцента лаппаконитина.

Полученные клоны могут быть использованы в фармакологии для расширения сырьевой базы при производстве препарата аллапинин. Однако особенно важно то, что вносится вклад в сохранение природных популяций этого растения.

Работа выполнена в рамках программы «Ведущие научные школы РФ» (грант НШ 2096.2008.4, лидер школы – член-кор. РАН Т.Б. Батыгина, Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН, г. Санкт-Петербург).

Список литературы

1. Батыгина Т.Б. Воспроизведение, размножение и возобновление растений // Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепции. Т. 3: Системы репродукции. – СПб.: Мир и семья, 2000а. – С. 35-39.
2. Батыгина Т.Б. Эмбриоидогения – новый тип вегетативного размножения // Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепции. Т. 3: Системы репродукции. – СПб.: Мир и семья, 2000б. – С. 334-349.
3. Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. Методы культуры тканей в физиологии растений. – К.: Наукова думка, 1980. – 468 с.
4. Круглова Н.Н., Егорова О.В. Световой микроскоп как инструмент в биотехнологии растений. – М.: Лабора, 2009. – 119 с.
5. Латыпова Г.М., Плеханова Т.М., Мухаметшина В.С. Фармакогностическое изучение аконита северного как источника «Аллапинина» // III Укр. конф. по мед. ботанике. Киев, 25-27 сентября 1992 г. – К., 1992. – С. 78-79.
6. Содержание алкалоида лаппаконитина в подземной и надземной частях *Aconitum septentrionale* Koelle в растительных сообществах в Башкирии / Федоров Н.И., Мартыанов Н.А., Никитина В.С., Ишбирдина Л.М. // Растительные ресурсы. – 1996. – Вып. 3. – С. 96-101.
7. Цицилин А.К., Шретер А.И. Прогноз природных ресурсов *Aconitum septentrionale* Koelle в Башкирской АССР // Растительные ресурсы. – 2000. – Вып. 4. – С. 513-539.
8. Blyaydes D.F. Interaction of kinetin and various inhibitors in the growth of soybean // *Physiol. Plant.* – 1966. – V. 19, N 3. – P. 748-753.
9. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures // *Physiol. Plant.* – 1962. – V. 15, N 3. – P. 473-497.

PECULIARITIES OF SPHAEROBLAST FORMATION AND DEVELOPMENT IN *OLEA EUROPAEA* L.

KONSTANTINOS ROUBOS¹; ANTONIOS IFOULIS¹;
IRINA MITROFANOVA², *DrSci*; CHRISTOS NELLAS¹, NIKOLAOS KOUTINAS¹;
ATHANASSIOS RUBOS¹, *PhD*

¹Plant Production Department, ATEI Thessaloniki, Greece

²Nikitsky Botanical Gardens – National Scientific Center, Yalta, Ukraine

Introduction

Sphaeroblasts are adventitious buds consisting of a woody, more or less globular structure connected to the vascular system of the plant through a pointed end and capable of differentiating vegetative meristems giving growth to juvenile shoots (Fig. 1 C, D, E). Their life is between three to four years and if during this life period do not differentiate meristems and/or give new growth they lose their viability. The first to describe sphaeroblasts was Theophrastos (371 – 287 BC), in his surviving work «*Enquiry into Plants*». He named them γόγγρο (singular), γόγγροι (plural) after their shape, looking like the beet root (γογγύλη). The first and perhaps the only study on sphaeroblast formation in olive trees have been made by Baldini and Mosse [1].

Sphaeroblasts are formed on various tree species under the effect of various factors and

they constitute a mechanism of survival and/or regeneration in plants. Among the various species *Olea europaea* L. is showing a high frequency of sphaeroblast formation.

Semihardwood leafy cuttings of olives root at higher percentages if they are made from juvenile shoots [4]. Shoots arising from sphaeroblasts are having strong juvenile characters and constitute ideal propagating material. Therefore it is very important to know first the conditions under which sphaeroblasts are differentiated; second the conditions under which sphaeroblasts develop shoots because not all of them differentiate vegetative meristems.

The purpose of this study is to investigate sphaeroblast formation in three main olive varieties cultivated in two different areas of Greece.

Objects and methods of investigation

The experiment was carried out in two olive groves located in different areas during the years 2000-2006. The first is located in the district of New Moudania city, county of Chalkidiki in north Greece; the second is located on mount Pelion, county of Magnesia, central Greece. Both olive groves included the varieties Chondrolia Chalkidikis, Megaritiki and Koroneiki. These varieties are among the main varieties cultivated in Greece the first for processed edible olives, the third for olive oil production and the second for both i.e. edible olives and olive oil. For each variety there were 36 and 60 trees in the olive groves of New Moudania and mount Pelion respectively. All the trees were distributed randomly in space. The age of the olive trees in both groves is forty years old. In New Moudania the trees are irrigated and pruned annually, on mount Pelion the trees are non irrigated and pruned every second year.

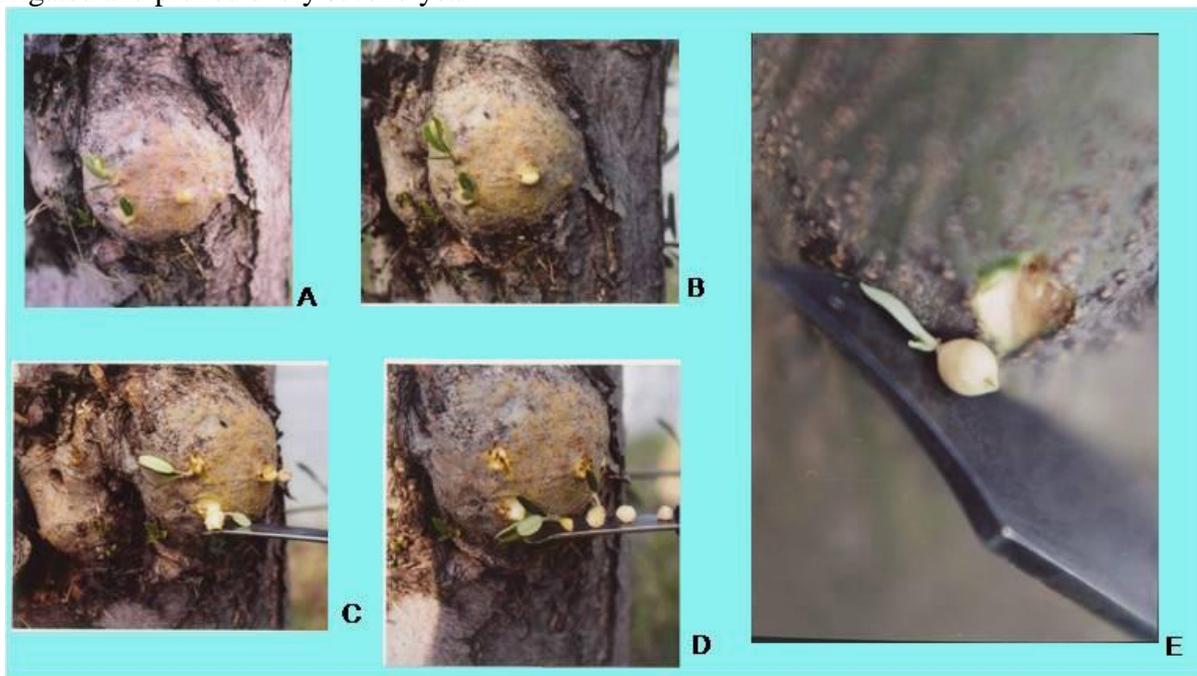


Fig. 1: Sphaeroblast formation in *Olea europaea* var. Chondrolia Chalkidikis: A – sphaeroblast formation is observed mainly on hyperplasias along and around the trunk; B,C,D – sphaeroblast excision in olive trees can be easily done with the use of a pointed tool during the vegetative period; C, D, E – sphaeroblasts in olive trees are woody structures having the form of a beet root, their size varies from 3-7 mm and they can differentiate shoot meristems on top of them

The experimental design was a factorial one $3 \times 2 \times 7$ with the trees completely randomized in space. Seven of them were taken randomly to form the sample for recording data. Observations were made in the second half of May with the beginning of flowering. for the seven years and the number of sphaeroblasts formed in each tree was recorded.

A factorial analysis of variance (ANOVA) was performed, with variety and location as independent fixed factors and years as random factor. Homogeneity of variances was tested with Levene's test. Analysis of variance was conducted with SPSS 12 (SPSS Inc. 2003).

Results

Sphaeroblasts could be easily traced because the phloem at their position is raised to a hemispherical dome or knot. They could also be excised easily with the use of a sharp or pointed tool (Fig. 1). Usually the sphaeroblasts were observed at high numbers and formation of a single sphaeroblast in a certain place rarely occurred (Fig. 2). Sphaeroblast formation was mainly observed on hyperplasias of the trunk (Fig. 1) and secondarily on shoots of all ages except the very young ones bearing leaves.



Fig. 2. Sphaeroblast formation on branches and young shoots of trees of *Olea europaea* var. *Chondrolia Chalkidikis*

Furthermore, a significant interaction between years and locations on sphaeroblasts exist ($MS = 31.397$; $df = 6, 264$; $F = 2.145$; $p = 0.049$). It seems that on mount Pelion the sphaeroblast formation shows a significantly more fluctuation during the seven years than in New Moudania. This phenomenon could be due to the pruning practice in this location (Fig. 6).

There is a different response of the varieties to the locations ($MS = 158.024$; $df = 2, 264$; $F = 10.798$; $p < 0.0001$). The varieties Megaritiki and Koroneiki had significantly more sphaeroblasts in New Moudania than on mount Pelion, while the variety Chondrolia Chalkidikis had more sphaeroblasts on mount Pelion (Fig. 7).

Interactions between varieties and locations on sphaeroblast formation, are shown in Fig. 8. The stability of the variety Chondrolia Chalkidikis is characteristic, showing significantly more sphaeroblasts on both locations. The variety Koroneiki responds better in New Moudania, while on mount Pelion showed a considerably low sphaeroblast formation.

Under certain conditions sphaeroblasts were contaminated by *Pseudomonas savastanoi* either before or while their shoot meristems were developing to shoots and were emerging through the phloem. Contaminated sphaeroblasts were converted to a callus mass. (Fig. 3 B, D).

Factorial analysis of variance indicated that varieties (Fig. 4) and location (Fig. 5) influenced significantly the sphaeroblast formation.

Analysis of variance determined that differences exist among varieties ($MS = 810.167$; $df = 2, 12$; $F = 27.034$; $p < 0.0001$). According to S-N-K multiple comparison test, Megaritiki differs significantly from Koroneiki ($p = 0.045$). Variety Chondrolia Chalkidikis shows significantly higher sphaeroblast formation than the other varieties ($p < 0.0001$). Moreover, the average sphaeroblast formation differs significantly by location ($MS = 240.667$; $df = 1, 6$; $F = 7.665$; $p = 0.032$).

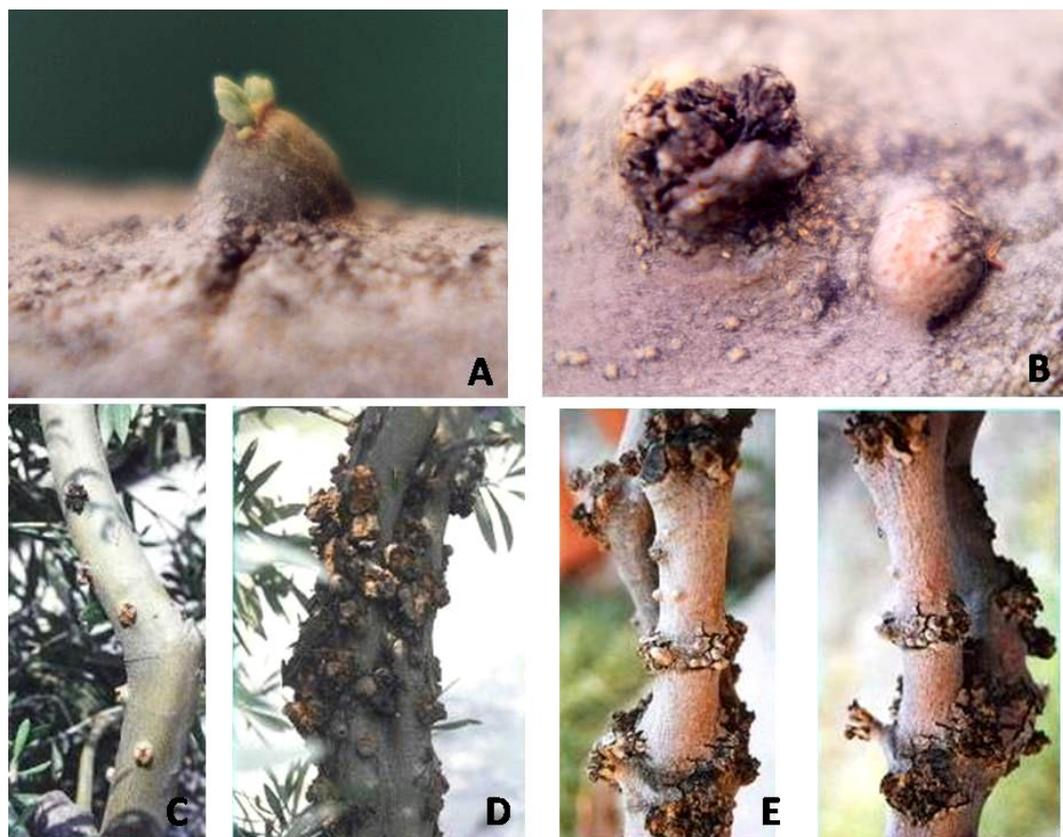


Fig. 3. Shoot formation from sphaeroblasts: A – sphaeroblasts and soot meristems arising from sphaeroblasts and emerging through the phloem in *O. europaea* var. Chondrolia Chalkidikis; B – intact sphaeroblasts on the left and sphaeroblast infected by *Pseudomonas savastanoi* and converted to callus mass (canker) on the right; C, D – sphaeroblasts infected by *Pseudomonas savastanoi* in *O. europaea* var. Chondrolia Chalkidikis; E, F – intact sphaeroblasts and callus mass produced from infected by *Pseudomonas savastanoi* sphaeroblasts in *O. europaea* var. Chondrolia Chalkidikis

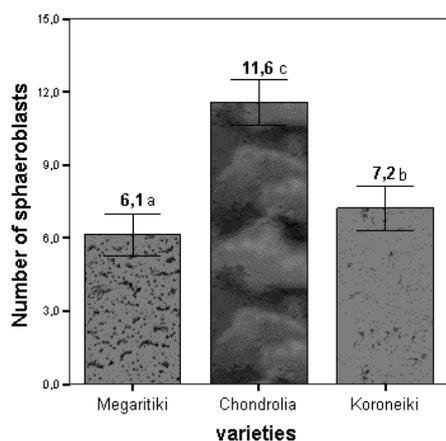


Fig. 4. Average number of sphaeroblasts formed in three olive varieties (Chondrolia Chalkidikis, Megaritiki and Koroneiki), cultivated in two different areas in Greece

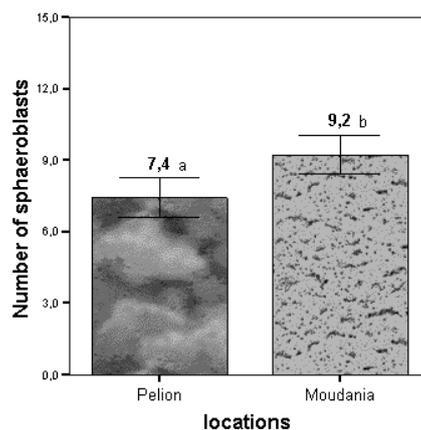


Fig. 5. The effect of the area of cultivation on the number of sphaeroblasts formed in three olive varieties (Chondrolia Chalkidikis, Megaritiki and Koroneiki)

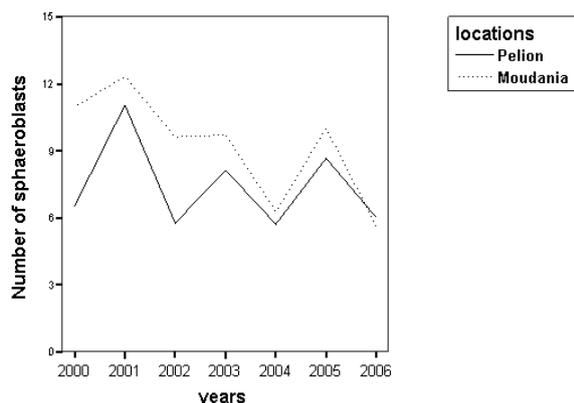


Fig. 6. Fluctuation of the number of sphaeroblasts formed in three olive varieties cultivated in the areas of New Moudania and mount Pelion in Greece

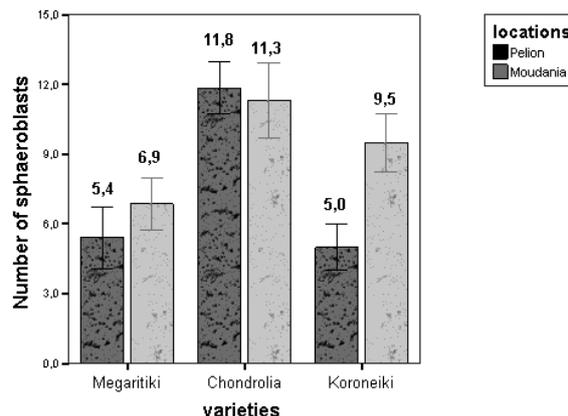


Fig. 7. Average number of sphaeroblasts formed in three olive varieties (Chondrolia Chalkidikis, Megaritikiki and Koroneiki), cultivated in the areas of New Moudania and mount Pelion in Greece

The response of the varieties along the seven years was different ($MS = 29.968$; $df = 12,264$; $F = 2.048$; $p = 0.021$). The variety Chondrolia Chalkidikis showed the smallest fluctuation from year to year, being so more homeostatic and steadier in production. Variability in was biggest in the variety Megaritikiki, having negative picks, making this variety very unsteady in sphaeroblast formation (Fig. 9).

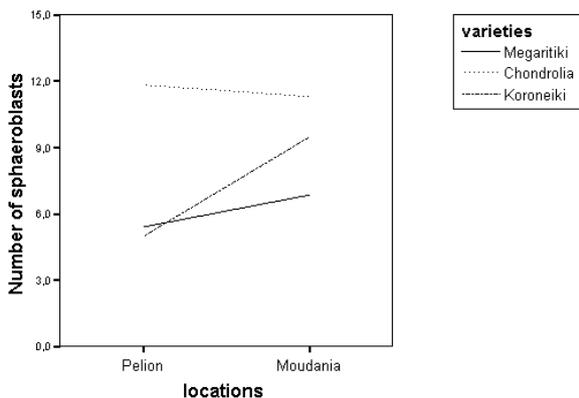


Fig. 8. Interaction between olive varieties and area of cultivation on sphaeroblast formation

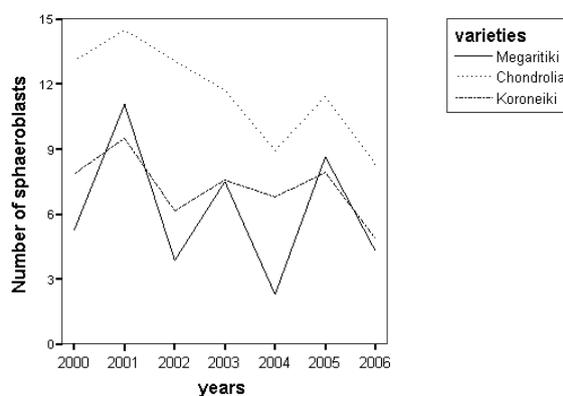


Fig. 9. The response of the olive varieties to the number of sphaeroblast formation by time

Discussions

The number of sphaeroblast formation is significantly affected by variety and area of cultivation. Among the three olive varieties used in this experiment the variety Chondrolia Chalkidikis is showing the highest and most steady number of sphaeroblast formation in the two areas of their cultivation. The response of the varieties to the same factors seems to be different. For example the varieties Megaritikiki and Koroneiki had significantly more sphaeroblasts formed in New Moudania than on mount Pelion, while the variety Chondrolia Chalkidikis had more sphaeroblasts on mount Pelion. This is probably related to differences between the varieties. For example Chondrolia Chalkidikis is more vigorous variety in comparison to Megaririkiki and Koroneiki, while Koroneiki is better adapted to very dry, non fertile areas. Cultivation techniques have an effect on sphaeroblast formation. The higher fluctuation on mount Pelion seems to be related to the every second year pruning.

With apple species disbudding can cause sphaeroblast formation [2]. The olive tree is having the ability to form sphaeroblasts under conditions which are not known. It is probable that drought, low temperatures, temporary water logging, pruning and other factors may cause sphaeroblast formation and their shoot development but this needs to be investigated experimentally.

For a more detailed study olive trees of the variety Chondrolia Chalkidikis are cultivated in pots and subjected to various factors in order to study the effect of certain factors on sphaeroblast formation.

Sphaeroblasts or knots on shoots of olive trees of the varieties Chondrolia Chalkidikis and Megaritiki after excision in some of them the woody globular structure of a sphaeroblast is appearing [3], in some others a colored mass is revealed [6], containing obviously colonies of bacteria, which cause the following canker development. In other cases while the shoot of the sphaeroblast is coming through the phloem contamination occurs and canker development follows. Rojas with colleagues [5] reported that *Pseudomonas savastanoi* in olive trees induced knot formation from which a total of nine endophytic bacterial strains were isolated, each from inside a different tree knot. From the results of A.M. Rojas investigation [5] and the results of present work the question arising is whether the knots on shoots of olives are induced by the bacteria or sphaeroblasts at a certain stage of their development are contaminated and disorganized by the endophytic bacteria and together with the surrounding tissues develop to canker. The authors believe that the second view is the more probable.

References

1. Baldini E., Mosse B. Observations on the origin and development of sphaeroblasts in the apple // J. Hortic. Sci. – 1956. – V. 3. – P. 156-162.
2. Hatcher E.S.J., Garner R.J. The production of sphaeroblast shoots of apple for cuttings // Rep. E. Malling Research Station. – 1954. – P. 5-73.
3. MacDaniels L.H. Anatomical basis of so-called adventitious buds in the apple // Cornell Experimental Station Memoir. – 1953. – N 325. – P. 3-21.
4. Porlingis I., Therios I. Rooting response of juvenile and leafy olive cuttings to various factors // J. Hortic. Sci. – 1976. – V. 51. – P. 31-39.
5. *Erwinia toletana* sp. nov., associated with *Pseudomonas savastanoi*-induced tree knots / Rojas A.M, de los Rios J. E. G., Fischer-Le Saux M., Jimenez P., Reche P., Bonneau S., Sutra L., Mathieu-Daude F. McClelland M. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2004. – V. 54. – P. 2217-2222.
6. Rubos A. The olive tree in Greece // Propagation of ornamental Plants: Fourth Scientific Conference. Sofia, Bulgaria, October 7-9, 2000. – International Plant Propagators Society; Sofia, 2000. – P. 103-109.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЙ МУТАГЕНЕЗ В СЕЛЕКЦИИ ПЕРСИКА

А.В. СМЫКОВ, кандидат сельскохозяйственных наук
Никитский ботанический сад – Национальный научный центр

Введение

Экспериментальный мутагенез является важным направлением в выведении новых форм и сортов плодовых культур [2, 3, 5]. Он повышает частоту изменчивости признаков растений и расширяет возможности селекционера для отбора хозяйственно-ценных форм. Мутанты могут индуцироваться физическими и химическими мутагенами. Использование гамма-радиации на персике показало свою эффективность [6]. Перспективно также облучение пыльцы для включения в гибридизацию [4].

В последние годы начаты исследования по изучению химического мутагенеза в

клоновой селекции персика. Обработка мутагенами соматических клеток вызывает изменение отдельных признаков сорта при сохранении его основных достоинств и является перспективной для совершенствования сортимента. При этом важное значение имеет подбор сроков и доз обработки вегетативных почек химическими мутагенами, а также комбинированное воздействие мутагенов и физиологически активных веществ для повышения выхода жизнеспособных растений с мутационными изменениями. Необходимо изучить морфо-биологические, анатомические и цитогенетические особенности мутантных форм.

Целью исследований являлась разработка методики экспериментального мутагенеза в селекции персика с последующим отбором и комплексным изучением мутантных форм для промышленного садоводства.

Объекты и методы исследования

Объектами исследования являлись мутантные формы персика, полученные в результате облучения гамма-радиацией на гамма-установке γ 1М мощностью 12,3 мА/кг вегетативных почек, семян и пыльцы и воздействия химических мутагенов этиленимина, нитроэтилмочевины, нитрозометилмочевины на вегетативные почки персика.

Изучение растений после обработки мутагенами проводили по опубликованным методикам [4, 5].

Результаты и обсуждение

Изучение генофонда облученного персика позволило выявить некоторые особенности действия радиации на его жизнеспособность и генотип. Общим критерием оценки чувствительности растений к лучевому поражению является процент их гибели, который отражает процессы повреждения и восстановления жизнедеятельности клеток. Повреждения почек радиацией проявляются не сразу, что связано с явлением продленного мутагенеза. Их приживаемость через 2 месяца после облучения практически такая же, как в контроле (вариант без облучения) и только через 8-9 месяцев часть их погибает. Чувствительность почек зависит от этапов органогенеза – чем больше степень дифференциации, тем выше радиочувствительность. В связи с этим при облучении почек на втором этапе органогенеза – в период формирования у них 7-10 зачаточных листьев и вторичных бугорков их чувствительность была выше, чем при формировании 4-6 зачаточных листьев и вторичных бугорков. Дозы облучения 10 Гр были стимулирующими, до 30 Гр – умеренными, до 70 Гр – критическими, до 90 Гр – летальными.

Для персика характерен довольно широкий спектр изменчивости признаков. В первый год развития у некоторых растений наблюдаются слаборослость, рассеченность, двухвершинность побегов, деформации, двухвершинность, узколистность, хлорофилльность листовой пластинки (рис. 1, 2). В вариантах с облучением частота изменчивости этих признаков возрастает. Некоторые из них, особенно рассеченность побегов и листьев, являются модификациями и исчезают в последующие годы развития и при размножении. В результате облучения снижаются темпы роста растений, задерживается время вступления в плодоношение. Продуктивность под действием критических доз облучения снижается. У этих растений меняется реакция на неблагоприятные факторы среды.

В результате искусственного промораживания и естественных морозов из 49 мутантов было выделено 13 радиоформ с повышенной морозостойкостью цветковых почек. Из них 7 мутантов в дозе облучения 20 Гр и 6 – 50 Гр. Стабильную морозостойкость показали 3 формы: 377, 379 в дозе облучения 20 Гр, и особенно 403 в дозе 50 Гр.

Сравнительную засухоустойчивость 29 радиомутантных форм персика изучали на

основе анализа водоудерживающих свойств листового аппарата, тургесцентности тканей и флуориметрии пигментов.

По водоудерживающей способности были выделены наиболее стабильные формы 36-227 и 40-16, испаряющие влагу в пределах 15-35%, и формы 34-224, 37-12, 39-146, которые проявили повышенную (11-45%) устойчивость к водоотдаче. Зафиксировано незначительное подавление показателя вариабельной флуорисценции у 10-ти форм: 40-3, 40-10, 40-16, 63-8, 64-164, 37-6, 63-87, 38-176, 38-172, 40-15, которые обладают стабильной водоудерживающей способностью или поддерживают относительно высокую тургесцентность тканей. Полученные данные позволили ранжировать по засухоустойчивости 5 форм, которые по комплексу физиологических показателей превышают контрольный сорт Советский.



Рис. 1. Слаборослая форма сорта Кудесник в питомнике, облучение в дозе 50 Гр

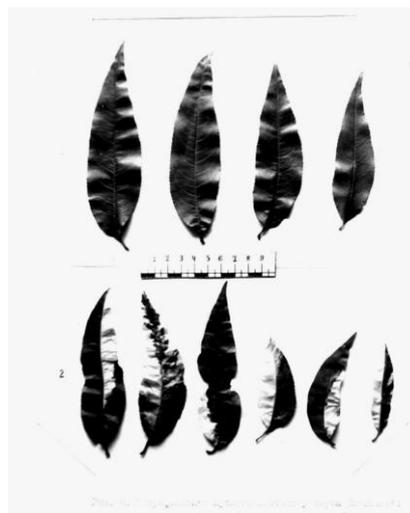


Рис. 2. Хлорофилльные мутации листьев у сорта Советский: 1 – контроль; 2- в вариантах с облучением

Облучение вызывает у персика изменение размера, формы, окраски цветков (рис. 3). У некоторых макромутантов (слаборослых, узколистных) наблюдаются мелкие цветки, поздний срок цветения, стерильность генеративных органов. Это связано с тем, что как правило, любое мутационное изменение, существенно затрагивая один признак, меняет в определенной степени комплекс других вследствие плейотропного влияния гена.



Рис. 3. Морфологические изменения цветков у сорта Рот-Фронт: 1 – контроль; 2 – в вариантах с облучением

У одного процента облученных растений на 7-15 дней меняются сроки цветения. Радиация вызывает уменьшение массы и размера плодов, массы и размера косточек (рис. 4, 5). По качественным признакам наиболее часто изменяется покровная окраска плодов, цвет и форма косточки. От 0,3 до 20,4%, косточек, взятых от слаборослых мутантных форм после самоопыления, имеют недоразвитые, 0,7-88,7% – пустые семена и 0,4-10% – по два семени, в контроле соответственно 2,6; 0,3 и 2,9%.

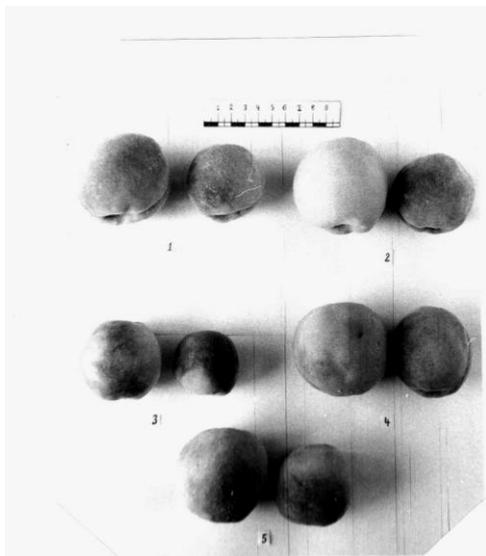


Рис. 4. Морфологические изменения плодов у сорта Советский: 1 – контроль; 2 – облучение в дозе 10 Гр; 3 – 20 Гр; 4 – 30 Гр; 5 – 50 Гр

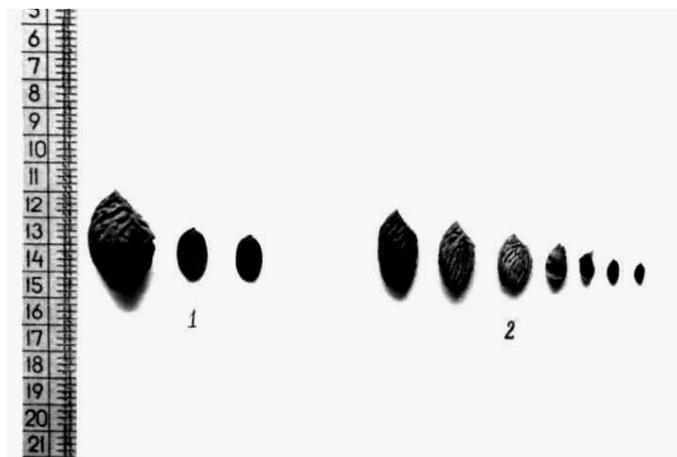


Рис. 5. Развитие семян у сорта Советский: 1 – контроль; 2 – в вариантах с облучением

У растений облучение вызывает физиологические и биохимические мутации. Листья слаборослых форм характеризуются пониженной активностью фотосинтетического аппарата и меньшим поглощением углекислоты в сравнении с листьями необлученных растений. Побеги слаборослых форм персика растут медленнее и имеют повышенное содержание суммы фенольных соединений, являющихся ингибиторами роста. У 20 ранозревающих форм сорта Советский, полученных после гамма-облучения в дозах 20, 30 и 50 Гр, было выделено 7 форм с повышенным в 1,5-1,9 раза содержанием в плодах Р-активных веществ – лейкоантоцианов, которые обладают антирадикальным и противорадиационным действием. Из 26 форм, выделенных по другим хозяйственно-ценным признакам, у 7-ми форм также наблюдалось заметное повышение в плодах лейкоантоцианов. Так, у формы 4053 в дозе облучения 50 Гр их количество составило 1040, у формы 4015 – 1200 мг/100 г, которое приближается к видовому пределу персика обыкновенного и превышает контроль (685 мг/100 г) в 1,5-1,8 раза.

У семи мутантов в дозе облучения 50 Гр и с повторным облучением 50+20 Гр отмечали значительное (в 1,6-3,3 раза) повышение содержания аскорбиновой кислоты в плодах по сравнению с контролем.

Повышение содержания пектинов в плодах на 29-41% наблюдалось у трех форм в дозах облучения 20, 50, 30+20 Гр. Некоторые формы характеризовались комплексным повышением содержания биологически-активных веществ в плодах.

В большинстве вариантов опыта проявилась тенденция к повышению содержания в плодах сухих веществ и титруемой кислотности. Тенденцию увеличения содержания в плодах некоторых компонентов их биохимического состава, а также существенное их накопление у некоторых форм после гамма-облучения можно связать с явлением

гомеостаза растений, так как эти вещества обладают защитно-восстановительными свойствами к мутагенным и другим стрессовым воздействиям.

Гамма-облучение, особенно в дозе 50 Гр, вызвало существенные изменения анатомического строения листьев персика и усиление признаков ксероморфности: уменьшение толщины листа, слоев палисадной и губчатой паренхимы, изменение формы клеток, которые могут быть использованы при диагностировании мутантных форм.

Спектр изменчивости естественных и искусственных мутаций персика сходен. Среди растений без облучения иногда встречаются формы слаборослые, с измененными сроками цветения и созревания плодов. Наибольшей мутабельностью характеризуются гетерозиготные сорта, так как мутационный процесс, как правило, идет от доминантности к рецессивности. Поэтому наибольшее количество мутаций было обнаружено у сорта Советский, который произошел в результате гибридизации сортов американской и армянской эколого-географических групп (рис. 6). У других растений (гибридов американских сортов) частота мутаций была меньше.



**Рис. 6. Слаборослая
восьмилетняя форма сорта
Советский, облучение в дозе 20 Гр**

Микромутации чаще всего не оказывают отрицательного влияния на жизнеспособность организма, но могут накапливаться в популяции, создавая большой резерв наследственной изменчивости.

Малые дозы радиации не только не угнетают, но и могут оказывать стимулирующее влияние на жизнеспособность растений персика. Дозы до 10 Гр являются стимулирующими для выживаемости вегетативных почек и роста растений, до 20 Гр – стимулируют интенсивность фотосинтеза.

В результате облучения сформированной пыльцы у 23 сортов персика в дозах 50, 100, 150, 200, 300, 400, 600, 800, 1000, 1200, 1400 Гр было выявлено, что по жизнеспособности пыльцы дозы 150-200 Гр были критическими, в дозе 600 Гр проявился стимулирующий эффект, дозы 800-1400 Гр являлись умеренными. Длина пыльцевых трубок менялась в зависимости от дозы облучения аналогично ее жизнеспособности.

По фертильности пыльцы доза 50 Гр была умеренной, 100 Гр – стимулирующей, дозы облучения 200, 250, 300, 400 Гр являлись критическими, 600 и 700 Гр – сублетальными, 900 и 1000 Гр – летальными.

Отмечено, что в дозах облучения 1000-1400 Гр пыльца сохраняет способность к прорастанию, но несет в себе погибший спермий и фактически является стерильной. В связи с этим для селекционных целей в гибридизации целесообразно использовать

В результате генетической репарации повреждений с течением времени последствие радиации на персик постепенно снижается. В связи с этим при повторном размножении растений через 9-15 лет после облучения выживаемость почек была почти такой же, как в контроле (без облучения).

Большинство мутаций, которые вызывает радиация, являются вредными или бесполезными для растений. Макромутации (слаборослость, деформация листьев, плодов, цветков, низкая продуктивность) чаще всего бывают вредными, но встречаются значительно реже, чем мало заметные микромутации (изменение формы основания, вогнутости края и зазубренности листьев, диаметра венчика, длины, ширины, количества лепестков, высоты чашечки, длины чашелистиков, опушенности завязи плодов и других признаков).

пыльцу, облученную в дозах от 50 до 500 Гр. Это позволит получить наибольшее количество сформированных плодов и семян с мутационными изменениями.

Определение жизнеспособности пыльцы и завязываемости плодов у слаборослых растений персика, полученных после гамма-облучения в дозах 20 и 50 Гр, показало, что радиация снизила жизнеспособность пыльцы, но не оказала заметного отрицательного воздействия на количество образовавшихся завязей и сформированных плодов. Поэтому эти формы можно использовать в селекционном процессе для получения генеративного потомства.

Для повышения жизнеспособности семена персика облучали гамма-радиацией в умеренной дозе 7,5 Гр и выдерживали в водных растворах физиологически активных веществ – «Фумара» (в концентрации 0,16 мг/л) и индолилмасляной кислоты (ИМК) (50 мг/л) в течение 18 часов. У большинства сортов в вариантах с обработкой наблюдали увеличение выживаемости растений, особенно у сорта Восток 3 (на 31,6% больше, чем в контроле).

Изучение макроструктурной организации кариотипов растений, выявление специфических особенностей хромосом и их идентификации имеет практическое значение для решения задач генетики и селекции. В результате изучения особенностей дифференциальной окраски хромосом у 7 гамма-облученных форм персика была разработана классификация хромосом персика, отражающая величину хромосом и порядок расположения гетерохроматиновых сегментов белков по их длине.

На основании изучения хромосом было выявлено, что кариотип у сорта Советский и его мутантных форм имеют две пары хромосом группы Б и пять пар группы А.

Сравнительный анализ расположения и размеров сегментов гетеро- и эухроматиновых хромосом в меристеме молодых листочков у слаборослой формы 3712 показал отличие по величине интеркалярного блока у пятой пары хромосом относительно пятой пары контроля исходного сорта.

У радиомутантных форм персика №№ 403, 3712, 372, 6330 наблюдали появление хромосом с крупными гетерохроматиновыми блоками. У формы 379 отмечали наличие протяженных эухроматиновых участков, у мутанта № 638 – нерасхождение одной из пар хромосом, а также мозаицизм тканей листочков с гаплоидными клетками.

В вариантах с облучением 50 Гр наблюдали изменения площади, суммарной оптической плотности клеточного ядра, появление клеток с микроядрами, мостами и полиплоидным набором хромосом.

В последние годы начаты исследования по изучению химического мутагенеза в клоновой селекции персика. При этом важное значение имеет подбор сроков и доз обработки вегетативных почек химическими мутагенами для повышения выхода жизнеспособных растений. Для определения сроков обработки на выживаемость растений персика, формирующиеся вегетативные почки обрабатывали в водных растворах химических мутагенов в эквимолярной концентрации 10^{-3} М: ЭИ – 0,004%, НЭМ – 0,12%, НММ – 0,013% в течение 12 часов в два срока, как и при обработке гамма-радиацией. Выживаемость растений, которая определялась в мае, была более высокой в первый срок обработки, чем во второй в 1,9-2,2 раза.

В сентябре после окончания роста у однолеток персика в питомнике проводили учеты морфологических признаков: диаметра штамба, высоты, деформации листьев. У всех сортов НММ в оба срока обработки вызвала появление слаборослых растений. Второй срок обработки способствовал большему снижению высоты растений, чем первый, особенно у сортов Остряковский Белый и Златогор. Этот признак является хозяйственно-ценным, так как позволяет создать загущенные сады интенсивного типа и облегчает агротехнический уход за растениями.

У некоторых растений после обработки химическими мутагенами встречались деформированные листья самой различной конфигурации, которые существенно

отличались от типичных листьев персика (рис. 7). Наряду с модификациями некоторые из этих изменений являются макромутациями. Наибольшее их количество наблюдалось после воздействия НММ и НЭМ во второй срок. Признак деформации листьев не является хозяйственно ценным, но отражает общий спектр изменчивости растений, может сопутствовать другим ценным мутациям и является диагностическим для их поиска.

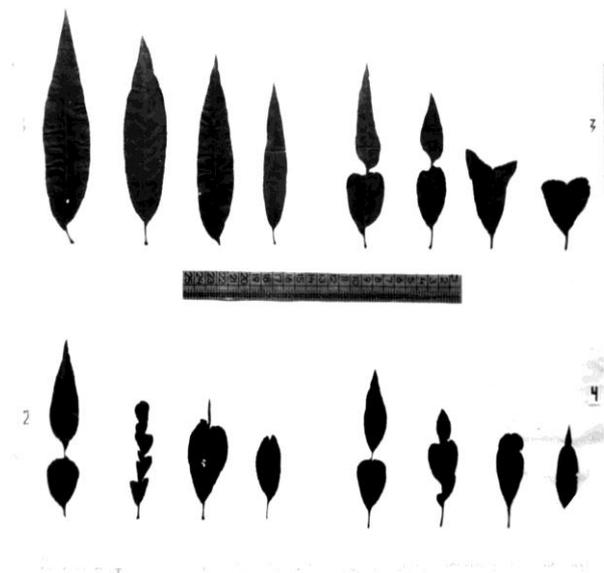


Рис. 7. Морфологическая изменчивость листьев персика сорта Остряковский Белый после обработки химмутагенами: 1 – контроль; 2 – ЭИ; 3 – НЭМ; 4 – НММ

почки обрабатывали в водных растворах химических мутагенов: ЭИ в концентрации 0,004, 0,014, 0,043%; НЭМ – 0,004, 0,012, 0,037%, НММ – 0,001, 0,003, 0,01% в течение 12 часов. Обработку проводили на втором этапе органогенеза. По степени выживаемости растений дозы ЭИ 0,004 и 0,014% были умеренными (гибель растений не наблюдалась), доза 0,043% была критической (погибло 36,3% растений). Концентрация НЭМ 0,004% оказалась умеренной (25,4%), доза 0,037% – критической (57,4%), НММ в дозах 0,001 и 0,003% вызвала критический (39,8 и 36,9%) и в дозе 0,01% – сублетальный эффект (77,1%). У всех сортов НММ в концентрации 0,01% вызвала наибольшую гибель растений.

После завершения роста у персика изучали изменения морфологических признаков: диаметра штамба, длины междоузлий, высоты, количества деформированных листьев, степень поражения листьев мучнистой росой. Химические мутагены, особенно НЭМ в концентрации 0,0012, 0,037% и НММ в дозе 0,01% вызвали уменьшение диаметра штамба, увеличение или уменьшение длины междоузлий, уменьшение высоты растений, увеличение количества деформированных листьев и возрастание степени поражения листьев мучнистой росой.

Размах изменчивости этих признаков определяли по коэффициенту вариации. Самым варибельным признаком была деформация листьев. Наибольшая его изменчивость, по сравнению с контролем, проявилась у всех сортов после воздействия НММ в дозе 0,001%. Возрастание изменчивости наблюдалось также по диаметру штамба, длине междоузлий, высоте растений и по степени поражения их мучнистой росой.

Обработка растений химическими мутагенами в первый и второй сроки не оказала существенного влияния на степень поражения мучнистой росой, но среди них встречались единичные формы со слабым поражением в 1 балл.

В вариантах с обработкой, кроме изменения средней величины признаков, наблюдалось возрастание частоты их изменчивости. Наибольшая частота появления растений с уменьшенным диаметром штамба проявилась у сортов после обработки НММ. Аналогичная картина наблюдалась и по снижению высоты растений в варианте с обработкой этим мутагеном. Другие мутагены – ЭИ и НЭМ тоже повысили частоту появления слаборослых растений, но с меньшей эффективностью, чем НММ.

Кроме изучения влияния сроков обработки мутагенами, определяли влияние их разных доз на изменчивость персика. Формирующиеся вегетативные

Химмутагены ЭИ, ЭМ, НММ вызывали увеличение толщины листьев, клеток палисадной и губчатой паренхимы.

Для модифицирования мутагенного эффекта гамма-радиации, химических мутагенов целесообразно использовать их в комплексном сочетании с физиологически активными веществами. В проведенных исследованиях зеленые черенки персика обрабатывали гамма-радиацией в дозе 20 Гр, мутагеном НММ в концентрации 0,003%, стимуляторами роста «Фумар» и ИМК в концентрации 0,16 и 50 мг/л.

Повреждающее действие НММ оказалось сильнее гамма-радиации, особенно в сочетании с физиологически активными веществами, которые снизили жизнеспособность растений. Наибольшая гибель растений проявилась в вариантах γ + НММ + Фум., γ + НММ + ИМК, которая достигла сублетального и летального уровня.

Совместное использование мутагенов и стимуляторов роста вызвало морфологические изменения у растений в питомнике. У некоторых сортов наблюдалось увеличение, у других – уменьшение диаметра штамба. Изменчивость этого признака в вариантах с обработкой, особенно в сочетании со стимуляторами, возросла до 3,5 раз. У всех сортов в вариантах с обработкой длина междоузлий от контроля существенно не отличалась, за исключением сорта Чемпион Ранний, у которого она уменьшилась. По этому признаку в вариантах с обработкой гамма-радиацией, НММ в сочетании со стимуляторами роста изменчивость возросла до 10,4 раза в сравнении с контролем. У сортов после обработки мутагенами наблюдали уменьшение высоты растений. В комбинациях НММ + ИМК и γ + ИМК отмечалась наибольшая (до 6,3 раз) изменчивость этого признака. Количество деформированных листьев у растений возросло во всех вариантах с обработкой, особенно заметно в сочетании гамма-радиации и «Фумара». Существенные различия по степени поражения растений мучнистой росой в вариантах с обработкой и контролем не проявились, но возросла изменчивость этого признака до 1,7-1,5 раз.

Таким образом, раздельное и совместное использование мутагенов с физиологически активными веществами снизило выживаемость растений в питомнике, но увеличило размах изменчивости признаков и повысило частоту появления измененных форм. Физиологически активные вещества не смягчили повреждающее действие мутагенов на жизнеспособность растений, но повысили частоту мутаций.

Одним из путей повышения эффективности мутагенеза является повторное воздействие мутагенов на растения, которое увеличивает частоту появления измененных форм. В проведенных опытах изучали влияние повторного действия гамма-радиации и НММ в сочетании с физиологически активными веществами ИМК и «Фумар» на гамма-облученный персик. Первое облучение вегетативных почек проводили в дозах 20 и 50 Гр. У взрослых растений, выросших из этих почек, были взяты черенки, которые обрабатывали гамма-радиацией, НММ, стимуляторами роста в умеренных дозах. В большинстве вариантов наблюдалось снижение выживаемости растений. Особенно заметно оно проявилось в результате действия НММ с физиологически активными веществами и при совместном использовании гамма-радиации, НММ, ИМК, «Фумара». При первом облучении в дозе 20 Гр выживаемость в этих вариантах колебалась от 4,0 до 16,7%, при 50 Гр – от 5,8 до 44,0%, в контроле – 64%.

Повторное действие мутагенов в сочетании с ИМК и «Фумаром» вызвало морфологические изменения у растений в питомнике. Существенные различия с контролем по диаметру штамба проявились в варианте обработки 50 Гр + НММ + Фум. Коэффициент вариации этого признака во многих вариантах с обработкой увеличился от 1,9 до 3,4 раз. Длина междоузлий уменьшилась в четырех вариантах с обработкой и ее изменчивость возросла в 2,3-7,2 раза. Высота растений в вариантах с обработкой не изменилась, но коэффициент вариации возрос в 2,7-9,4 раза. Изменения формы листьев проявилось только в вариантах с первым облучением 20 Гр и не были обнаружены с

облучением 50 Гр. Это, вероятно, связано с определенным спектром изменчивости листьев при обработке в дозе 20 Гр. Изменчивость листьев возросла в семи вариантах с обработкой в 1,9-5,6 раз. Устойчивость растений к мучнистой росе в большинстве вариантов с обработкой снизилась, в остальных – не отличалась от контроля.

С возрастом изменчивости увеличилась частота появления слаборослых растений: с уменьшенным диаметром штамба (от 11,1 до 33,3%), с укороченными междоузлиями (35,3-66,7%, в контроле 10,0%), со сдержанным ростом (17,4-42,9%, в контроле 3,3%). Наибольшим количеством слаборослых форм по трем этим показателям роста выделили в варианте обработки 50 Гр + γ + НММ + Фум.



Рис. 8. Плоды сорта Меркурий

В результате экспериментального мутагенеза выделено более 40 мутантов с различными хозяйственно-ценными признаками: сдержанным ростом, с поздними сроками цветения, ранними сроками созревания плодов, крупными плодами, с высоким содержанием в них биологически активных веществ, с повышенной засухоустойчивостью и морозостойкостью. Один из них зарегистрирован в 2007 г. в Госсортослужбе как новый сорт Меркурий (рис. 8), который отличается от контрольного сорта Советский более

привлекательным внешним видом, высокими вкусовыми и товарными качествами плодов, более поздним цветением (на 11 дней), повышенной устойчивостью к курчавости листьев и высоким содержанием в плодах аскорбиновой кислоты.

Выводы

1. Индуцированный мутагенез является перспективным направлением в селекции персика для выведения новых сортов при правильном подборе объектов исследований, условий, средств воздействия и зависит от следующих факторов: 1. генотипа исходного сорта; 2. его происхождения; 3. мутабельности; 4. вида мутагена; 5. дозы обработки; 6. этапов органогенеза; 7. модифицирования мутагенного эффекта.

2. В результате экспериментального мутагенеза выделено более 40 мутантов с различными хозяйственно-ценными признаками: сдержанным ростом, с поздними сроками цветения, ранними сроками созревания плодов, крупными плодами с высоким содержанием в них биологически активных веществ, с повышенной засухоустойчивостью и морозостойкостью. Один из них зарегистрирован в 2007 г. в Госсортослужбе как новый сорт Меркурий.

Список литературы

1. Равкин А.С. Действие ионизирующих излучений и химических мутантов на вегетативно размножаемые растения. – М.: Наука, 1981. – 191 с.
2. Равкин А.С. Индуцированный мутагенез в селекции плодовых и ягодных растений // Радиационный мутагенез и его роль в эволюции и селекции: Сб. научн. работ. – М.: Наука, 1987. – С. 205-219.
3. Семакин В.П. Селекция сортов плодовых культур на основе искусственного мутагенеза // Обзорная информация. – М., 1982. – 47 с.
4. Семакин В.П., Равкин А.С. Методика экспериментального мутагенеза и полиплоидии в селекции плодовых и ягодных растений // Программа и методика

сортоизучения плодовых, ягодных и орехоплодных культур. – Мичуринск, 1980. – С. 377-414.

5. Смыков А.В. Методические рекомендации по использованию гамма-излучения в клоновой селекции персика. – М., 1991. – 26 с.

6. Смыков А.В. Мутагенез // Труды Никит. ботан. сада. – Ялта, 1999. – Т. 118. – С. 39-41.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ГЕНОФОНДА РОДА *PRUNUS* L. В СЕЛЕКЦИИ КЛОНОВЫХ ПОДВОЕВ КОСТОЧКОВЫХ КУЛЬТУР

Г.В. ЕРЕМИН, доктор сельскохозяйственных наук;

В.Г. ЕРЕМИН, кандидат сельскохозяйственных наук

Государственное научное учреждение «Крымская опытно-селекционная станция» ГНУ СКЗНИИСиВ Россельхозакадемии, Крымск, Краснодарский край, Россия

Введение

Интенсификация возделывания косточковых культур – персика, абрикоса, сливы, черешни, вишни – потребовала в мировом плодоводстве перехода от сильнорослых – семенных к слаборослым – клоновым подвоям. В настоящее время во всех странах, где возделываются косточковые культуры, в технологиях интенсивного типа преимущественно используют более слаборослые – клоновые подвои [3-8]. Этот процесс сейчас идет и в России, где селекция клоновых подвоев проводится в ряде научных учреждений, создавших оригинальные подвои для различных косточковых культур [1, 2]. Эти клоновые подвои в более суровых условиях климата и почвы оказались продуктивнее зарубежных аналогов. На Крымской ОСС селекция клоновых подвоев для различных косточковых культур проводится с 50-х годов прошлого века. 14 клоновых подвоев селекции станции районировано в России и в Украине, ряд подвоев испытывается в различных странах мира.

Целью настоящего исследования было создание для различных косточковых культур адаптивных клоновых подвоев разной силы роста, отвечающих следующим требованиям: легкое размножение черенками и (или) отводками; устойчивость к комплексу почвенных патогенов, переувлажнению, недостатку влаги, избытку извести; мощное развитие корневой системы, обеспечивающее высокую якорность деревьев в саду; отсутствие или слабое образование корневой поросли.

Объекты и методы исследования

В качестве исходного материала в работе был использован генофонд косточковых культур Крымской ОСС, насчитывающий свыше 5000 генотипов. Основной метод селекции – гибридизация между видами рода *Prunus* L. – *P. spinosa* L., *P. tomentosa* Thunb., *P. incana* (Pall.) Batsch, *P. fruticosa* Pall., *P. ulmifolia* Franch., *P. pumila* L., *P. cerasifera* Ehrh., *P. lannesiana* (Carr.) Rehd., *P. serrulata* Lindl., *P. maackii* (Rupr.) Kom., *P. armeniaca* L., *P. persica* (L.) Batsch, *P. prostrate* Labill., *P. pseudocerasus* Lindl., *P. kurilensis* Miyabe, *P. americana* Marsh., *P. salicina* Lindl., *P. cerasus* L. и др. Преимущественно проводили гибридизацию видов из различных Центров происхождения (по Н.И. Вавилову) и характеризующихся устойчивостью к различным стрессорам, а также склонностью к легкому вегетативному размножению.

Отбор на такие признаки, как устойчивость к различным стрессорам и на способность размножаться черенками и отводками, проводили, начиная с селекционного питомника. Лучшие элитные формы испытывали на участках стационарного испытания. В качестве привоя брали районированные сорта, а также испытывали подвои на совместимость с другими стандартными и перспективными сортами.

Результаты и обсуждение

Изучение генофонда рода *Prunus* на Крымской ОСС позволило выявить достаточное число генотипов, имеющих селекционно-значимые признаки, и многие из них использовать в селекционной работе (табл. 1).

В ряде случаев возникала необходимость в выведении специальных комплексных доноров. Для этой цели наряду с межвидовой гибридизацией использовали методы получения искусственных полиплоидов или выделение генотипов, склонных продуцировать нередуцированные гаметы.

Использование межвидовой гибридизации полностью себя оправдало. Лучшие клоновые подвои, полученные от гибридизации видов, формировавшихся в различных экологических условиях, зачастую не только имеют благоприятное сочетание признаков родительских видов, но и проявляют новые ценные свойства, а иногда и гетерозис по силе роста или положительные трансгрессии по устойчивости к различным стрессорам.

Выдающимся донором адаптивности к почвенным стрессам, а также источником легкого размножения показали себя генотипы алычи. Восемь из 10 районированных клоновых подвоев селекции Крымской ОСС для сливы, алычи, абрикоса и персика выведены с участием алычи. Среди них такие адаптивные клоновые сорта-подвои, как Кубань 86, ВВА-1 и Эврика 99. Хорошую комбинационную способность проявили также микровишни войлочная и низкая, с участием которых выведено по два клоновых подвоя для тех же культур.

Таблица 1

Виды и источники признаков, выделенных из генофонда рода *Prunus* и использованных при создании клоновых подвоев

Признаки	Представители рода <i>Prunus</i>
Слаборослость	<i>P. spinosa</i> , <i>P. tomentosa</i> , <i>P. incana</i> , <i>P. fruticosa</i> , <i>P. ulmifolia</i> , <i>P. pumila</i>
Легкая укореняемость черенков	<i>P. cerasifera</i> , <i>P. pumila</i> , <i>P. lannesiana</i> , <i>P. serrulata</i> , <i>P. tomentosa</i>
Устойчивость корней к морозам	<i>P. spinosa</i> , <i>P. maackii</i> , <i>P. pumila</i> , <i>P. fruticosa</i> , <i>P. armeniaca</i> , <i>P. ulmifolia</i>
Устойчивость к водному стрессу и высоким температурам	<i>P. spinosa</i> , <i>P. fruticosa</i> , <i>P. incana</i>
Устойчивость к избытку извести в почве (хлорозу)	<i>P. spinosa</i> , <i>P. fruticosa</i> , <i>P. incana</i>
Устойчивость к почвенным нематодам	<i>P. cerasifera</i> , <i>P. spinosa</i>
Устойчивость к коккомикозу	<i>P. lannesiana</i> , <i>P. serrulata</i>
Красная окраска листьев	<i>P. cerasifera</i> , <i>P. persica</i>

Выдающимся донором устойчивости к патогенам и легкого размножения черенками и отводками можно считать и генотип вишни Ланнеза – Л-2, с участием которого получено три клоновых подвоя, в том числе и перспективный подвой ВСЛ-2.

В результате проведенной селекционной работы на Крымской ОСС для косточковых культур выделены клоновые подвои различной силы роста, позволяющие использовать их в садах с различной плотностью размещения растений. Особую ценность представляют наиболее слаборослые подвои – ВВА-1 и ВСВ-1 – для сливы, абрикоса и персика и ВСЛ-1 – для черешни и вишни (табл. 2).

Таблица 2

Характеристика клоновых подвоев селекции Крымской ОСС

Подвой	Вид, гибрид	Совместим с культурами	Способ размножения
Алаб-1	<i>P. cersifera</i> x <i>P. americana</i>	абрикос, персик, слива	черенки
ВВА-1	<i>P. tomentosa</i> x <i>P. cersifera</i>	абрикос, персик, слива	черенки
Весеннее Пламя	(<i>P. americana</i> x <i>P. salicina</i>) x <i>P. cersifera</i>	слива, персик	черенки, отводки
ВСВ-1	<i>P. incana</i> x <i>P. tomentosa</i>	слива, персик	черенки, отводки
ВСЛ-1	<i>P. fruticosa</i> x <i>P. lannesiana</i>	черешня, вишня	черенки, отводки
ВСЛ-2	<i>P. fruticosa</i> x <i>P. lannesiana</i>	черешня, вишня	черенки, отводки
ВЦ-13	<i>P. cerasus</i> x (<i>P. cerasus</i> x <i>P. maackii</i>)	черешня, вишня	зеленые черенки
Дружба	<i>P. pumila</i> x <i>P. armeniaca</i>	абрикос, слива	зеленые черенки, отводки
Зарево	клон подвоя Весеннее Пламя	слива, персик	черенки, отводки
Кубань 86	<i>P. cersifera</i> x <i>P. persica</i>	слива, персик, абрикос	черенки
Л-2	<i>P. lannesiana</i>	черешня, вишня	черенки
ЛЦ-52	<i>P. cerasus</i> x (<i>P. cerasus</i> x <i>P. maackii</i>)	черешня, вишня	зеленые черенки
Спикер	(<i>P. pumila</i> x <i>P. salicina</i>) x <i>P. cersifera</i>	слива	черенки
Фортуна	<i>P. cerasus</i> x (<i>P. salicina</i> x <i>P. persica</i>)	слива, персик	черенки
Эврика 99	(<i>P. pumila</i> x <i>P. salicina</i>) x <i>P. cerasus</i>		черенки, отводки

Все клоновые подвои селекции Крымской ОСС легко размножаются зелеными черенками. Одревесневшими черенками легче всего укореняется клоновый подвой сорта Эврика 99, близко к нему – Кубань 86, Алаб-1, Весеннее Пламя, Зарево, ВВА-1, Спикер, Фортуна, а также ВСЛ-1, ВСЛ-2. Хуже других этим способом укореняются черенки клоновых подвоев Дружба, ЛЦ-52, ВЦ-13, ВСВ-1. Горизонтальные отводки можно использовать для размножения ВСЛ-1, ВСЛ-2, Эврика, Весеннее Пламя, ВСВ-1. Этим способом не удастся размножить клоновые подвои Кубань 86, ВЦ-13 и ЛЦ-52.

Важнейшее значение для успешного использования в производстве клоновых подвоев косточковых культур имеет их хорошая совместимость с сортами-привоями. Хотя новые клоновые подвои обладают широким спектром совместимости с сортами нескольких косточковых культур, отмечаются и случаи проявления несовместимости как генетической, так и вирусной. Отличную совместимость со всеми изучавшимися сортами сливы, абрикоса и персика проявили подвои ВВА-1 и Эврика 99.

Клоновый подвой Кубань 86 хорошо совместим со всеми сортами персика и сливы японской, большинством сортов сливы домашней (кроме сортов Кабардинская Ранняя, Баллада, Синяя Птица) и абрикоса (кроме двух коллекционных образцов). Случаи генетической несовместимости с рядом сортов персика и нектарина отмечены для подвоев Зарево, ВСВ-1, Дружба, для ряда сортов вишни и клоновых подвоев Л-2 и ВСЛ-2.

У вишни и черешни наблюдается также проявление вирусной несовместимости (*Nepo-virus*) с клоновыми подвоями ЛЦ-52 и ВСЛ-2. Толерантны клоновые подвои ВЦ-

13 и Л-2.

Большинство новых клоновых подвоев, выведенных на Крымской ОСС, хорошо адаптированы к биотическим и абиотическим стрессам. Особенно устойчивы к низким температурам в зоне корней (до -12°C) ВВА-1, Дружба, ВЦ-13, ЛЦ-52, ВСЛ-1 и ВСЛ-2. Наиболее высокой засухоустойчивостью обладают Кубань 86, ВСВ-1 и ВСЛ-2. Недостаточно засухоустойчивы и могут на юге возделываться только на орошении ВВА-1 и Л-2. Подвои Кубань 86, ВСВ-1 показали хорошую устойчивость к избытку извести.

Клоновые подвои косточковых культур показывают высокую устойчивость и к почвенным патогенам, в частности, к нематодам, вертициллезу, бактериальному раку, асфикции. По устойчивости к различным видам нематод выделяются Кубань 86 и Алаб-1. Подвой ВВА-1 выносит длительное затопление и переувлажнение почвы даже летом, но может поражаться корневым раком. Не выносит переувлажнения и затопления ВСВ-1.

Предлагаемые для широкого возделывания подвои косточковых культур обладают хорошо развитой мочковатой корневой системой и не нуждаются в опоре. Особенно мощная корневая система у подвоев Кубань 86, а из подвоев для черешни – у ВСЛ-2. Наклоны деревьев наблюдали только у деревьев сливы домашней на подвоях Дружба и Эврика 99, но только в пору начала плодоношения деревьев. Далее это явление не прогрессировало.

Образование корневой поросли наблюдали лишь у таких подвоев, как ВСЛ-13, ЛЦ-52, ВСЛ-1, ВСЛ-2 и Весеннее Пламя (у последних трех только при механическом повреждении корней во время обработки почвы).

Клоновые подвои Весеннее Пламя и Зарево обладают красной окраской молодых листьев, что облегчает проведение обломки побегов подвоя при первой подчистке во втором поле питомника.

Серия подвоев, созданная на Крымской ОСС, позволяет широко использовать клоновые подвои в различных технологиях при возделывании косточковых культур в России. Однако в плане совершенствования подвоев остается решить еще целый ряд проблем. Это прежде всего касается создания более адаптивных слаборослых подвоев, особенно для черешни и вишни; выведения подвоев с повышенной устойчивостью к различным стрессорам; выведения краснолистных подвоев и т.д. В этом направлении работа по селекции клоновых подвоев на Крымской ОСС продолжается. Вовлекаются новые виды косточковых растений, обладающих выдающимися свойствами, в частности, *P. spinosa*, *P. ulmifolia*, *P. prostrata*, *P. pseudocerasus*, *P. kurilensis* и ряд других. Из числа межвидовых гибридов выделены новые перспективные элиты, что даст возможность уже в ближайшие годы предложить новые клоновые подвои для косточковых культур, позволяющие получать стабильные урожаи этих ценных плодов.

Выводы

1. Выведенные на Крымской ОСС клоновые подвои косточковых культур позволяют применять современные технологии интенсивного типа при их возделывании в России.

2. Новые клоновые подвои характеризуются легким вегетативным размножением и хорошей совместимостью с современными сортами различных косточковых культур, что разрешает быстро размножить и эффективно использовать их при возделывании косточковых культур.

3. Высокая адаптивность клоновых подвоев дает возможность повысить устойчивость насаждений косточковых культур к неблагоприятным факторам среды.

4. Использование имеющегося генофонда видов рода *Prunus* позволяет эффективно проводить селекционную работу по совершенствованию клоновых подвоев косточковых культур

Список литературы

1. Еремин Г.В. Генофонд рода *Prunus* L. и его использование в селекции // Труды по прикл. ботанике, генетике и селекции. – 2007. – Т. 164. – С. 208-217.
2. Косточковые культуры. Выращивание на клоновых подвоях и собственных корнях / Г.В. Еремин, А.В. Проворченко, В.Ф. Гавриш и др. – Ростов-на-Дону: Феникс, 2000. – 256 с.
3. Layne R.E. Peach rootstocks // Poy C. Rom and Robert F. Carlson. Rootstocks for Fruit Crops / Ed. J. Wiley and Sons. – Oregon, 1987. – P. 185-217.
4. Okie W.R. Plum rootstocks // Poy C. Rom and Robert F. Carlson. Rootstocks for Fruit Crops / Ed. J. Wiley and Sons. – Oregon, 1987. – P. 321-360.
5. Perry R.L. Cherry rootstocks // Poy C. Rom and Robert F. Carlson. Rootstocks for Fruit Crops / Ed. J. Wiley and Sons. – Oregon, 1987. – P. 217-204.
6. Raunaud P.C., Anderson G.M. Apricot rootstocks // Poy C. Rom and Robert F. Carlson. Rootstocks for Fruit Crops / Ed. J. Wiley and Sons. – Oregon, 1987. – P. 295-320.
7. Les porte-greffes des especes fruitieres de genre *Prunus* / Saless G., Grossely C., Renaud R., Clauerie J. // Amelioration des especes vegetales cultivees. Objectifs et criteres de selection / Ed. A. Gallais H. Bannerot. – Paris: I.N.R.A, 1992. – P. 605-619.
8. Register of Fruit and Nut Varieties. – 3rd edition. – Alexandri: ASHSPress, 1997. – 744 p.

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ СИСТЕМЫ ДИАГНОСТИКИ ВИРУСА ШАРКИ СЛИВЫ (*PLUM POX VIRUS*) И ОТБОРА ТОЛЕРАНТНЫХ СОРТОВ КОСТОЧКОВЫХ ПЛОДОВЫХ КУЛЬТУР

О.В. МИТРОФАНОВА¹, доктор биологических наук;

И.В. МИТРОФАНОВА¹, доктор биологических наук;

С.Н. ЧИРКОВ², доктор биологических наук;

В.Н. ЕЖОВ¹, доктор технических наук;

Н.П. ЛЕСНИКОВА-СЕДОШЕНКО¹

¹Никитский ботанический сад – Национальный научный центр

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
Москва, Россия

Введение

В современном садоводстве огромный ущерб урожаю плодовых насаждений причиняют вирусные инфекции, роль которых в обозримом будущем будет возрастать. Интенсивное развитие сельскохозяйственной отрасли, расширение международного обмена семенным и посадочным материалом способствуют интродукции вирусов в новые регионы. При этом непрерывно увеличивается число известных вирусов, а глобальное потепление расширяет ареалы насекомых-переносчиков вирусов и увеличивает их численность [16, 22]. Среди известных и вредоносных вирусных болезней косточковых плодовых культур одной из самых опасных является шарка сливы, вызываемая вирусом *Plum pox virus* (PPV) (род *Potyvirus*, семейство *Potyviriidae*). Это заболевание относится к карантинным объектам, и сегодня оно распространено в 38 странах мира [18, 25]. Первая публикация о шарке сливы появилась в Болгарии в 1932 г. [17]. Позже, в 1937 г., шарка была выявлена в Югославии, а затем она постепенно распространилась в другие страны. В Украине шарка сливы впервые была зарегистрирована в 1966 г. в Черновицкой области [12]. В настоящее время, по данным областных Государственных инспекций по карантину растений и результатов наших

исследований, очаги заражения шаркой зарегистрированы в 9 регионах Украины (АР Крым, Винницкая, Закарпатская, Ивано-Франковская, Львовская, Николаевская, Одесская, Тернопольская, Черновицкая области) [7, 8, 10, 11, 13, 21, 23].

Вирус шарки сливы имеет широкий круг растений-хозяев в пределах рода *Prunus*, а также может поражать более 60 видов травянистых растений. Вирус распространяется соком, пылью и тлями [15, 16]. Перенос вирусной инфекции осуществляется путем прививки, либо неперсистентно – тлями [2, 3, 22]. Скорость динамики распространения инфекции может быть различной и зависит от конкретного штамма и вида поражаемого растения. В настоящее время выделено 6 штаммов PPV: D, M, Rec, EA, C, W. Каждый из этих штаммов может быть идентифицирован с использованием иммуноферментного анализа (DASI-ELISA) и системы ПЦР [19, 20]. Заболевание шаркой снижает урожай у восприимчивых сортов на 70-100% и ведет к быстрой гибели пораженных, особенно молодых, деревьев [2, 24]. Огромных финансовых затрат требуют фитосанитарная профилактика, программы обследования и диагностики, а также непосредственно ликвидация вируса шарки. Суммарная оценка затрат, связанных с ликвидацией вируса шарки во всем мире, за истекшие 30 лет превышает 10.000 миллионов евро [18]. Однако совершенствование методов, применяемых для выявления PPV, и углубление знаний о нем существенно помогает в борьбе с этим вирусом и дает возможность сдерживать возникновение и распространение эпифитотий.

Как известно, производство безвирусного посадочного материала основано на отборе здоровых растений и их последующем размножении [7, 10]. При тотальном заражении сорта оздоровление растений от вирусов проводят с помощью комплекса биотехнологических методов (термотерапии, культуры меристем, хемотерапии *in vitro*). Поскольку безвирусное растениеводство сосуществует с традиционными технологиями, при массовом тиражировании оздоровленных растений высокий инфекционный фон *in situ* не исключает их повторное заражение. Получение и выращивание устойчивых или толерантных к вирусу шарки сортов косточковых плодовых культур существенно снижает потери от заболевания при производстве плодовой продукции. Один из подходов к выявлению устойчивости основан на определении содержания стероидных гликозидов, являющихся природными стимуляторами защитных механизмов растений. Очевидным является тот факт, что для отбора здоровых растений, контроля, оздоровления, размножения, сертификации посадочного материала и мониторинга своевременного выявления и ликвидации очагов вируса шарки, предупреждения эпифитотий, а также поиска и отбора устойчивых и толерантных сортов и форм к PPV необходимы надежные и эффективные методы диагностики.

Целью настоящего исследования являлась разработка и совершенствование системы методов диагностики, тестирования и отбора толерантных к PPV сортов косточковых плодовых культур для последующего получения оздоровленного посадочного материала и обеспечения селекционных работ на безвирусной основе.

Объекты и методы исследования

Объектами исследований были сорта персика (*Prunus persica* L.), абрикоса (*Prunus armeniaca* L.), алычи (*Prunus cerasifera* Ehrh.) и сливы (*Prunus domestica* L.). Материалом для проведения исследований служили сортообразцы, отобранные во время визуального обследования (март-июнь, август-сентябрь) при мониторинге на поражаемость вирусом шарки косточковых плодовых культур в коллекционных и промышленных насаждениях НБС–ННЦ, Бахчисарайского, Джанкойского, Симферопольского, Севастопольского районов АР Крым, Беляевского и Овидиопольского районов Одесской области. Проанализированы сортообразцы персика Агрофирмы «Сады Украины» (Днепропетровская область и АР Крым).

Исследования выполнены в лаборатории биотехнологии и вирусологии растений отдела биотехнологии и биохимии растений Никитского ботанического сада – Национального научного центра.

Вирус шарки идентифицировали на растениях-индикаторах *Chenopodium foetidum* Schrad, *Nicotiana benthamiana* Domin, *N. clevelandii* A.Gray и древесном индикаторе *Prunus serrulata* Lendl. ‘Schirofugen’. Инокулюмы лепестков цветков, почек и листьев готовили в 0,1М фосфатном буфере Серенсена (pH 7,0), 0,01М буфере Трис-НСl (pH 8,5) и 0,1М боратном буфере (pH 8,0). Все буферы содержали вирусстабилизирующие добавки [4, 7]. Инокуляцию древесных растений-индикаторов проводили способом окулировки 4-8 почками (глазками) испытуемого сортаобразца. Тестирование и диагностику вируса шарки проводили молекулярно-биологическим методом, используя систему «Пиротест-ИФА» («Иммунохим», Россия) и метод иммунохроматографического анализа [14]. При оценке сортов абрикоса, персика, сливы и алычи на устойчивость к вирусу шарки применяли в качестве маркера вирусостойкости стероидные гликозиды. Изучение локализации вируса шарки сливы и стероидных гликозидов осуществляли в различных органах и тканях пораженных растений (лепестки цветков, почки, листья, плоды, кора и древесина). Наличие фураностановых гликозидов определяли методом тонкослойной хроматографии [5, 9]. Измельченное воздушно-сухое сырье сортаобразцов экстрагировали 70%-ным этанолом в соотношении 1:5 при комнатной температуре в течение 7 суток. Тонкослойную хроматографию проводили в системе хлороформ:метанол:вода (1:5:до насыщения), на пластину (ПТСХ-АФ-А «Sorbfil Plates», Россия) наносили по 5 мкл экстракта каждого образца. В качестве проявляющего реактива использовали реактив Эрлиха.

Результаты и обсуждение

Для изучения распространения вируса шарки и степени поражаемости косточковых плодовых культур вирусной инфекцией нами обследовано более 2000 сортов и селекционных форм персика (*Prunus persica* (L.) Batch), абрикоса (*Prunus armeniaca* L.), сливы (*Prunus domestica* L.), алычи (*Prunus cerasifera* Ehrh.) в промышленных и коллекционных насаждениях южных регионов Украины. В связи с недостаточной изученностью заболевания и необходимостью ранней диагностики вируса шарки сливы (*Plum pox virus*) в органах и тканях косточковых плодовых культур разрабатывали методы комплексной диагностики вирусной инфекции. При этом наиболее эффективным оказалось использование системного подхода в выявлении и идентификации вируса шарки сливы, основу которого составили: проведенный мониторинг распространения вируса и поражаемости сортов персика, абрикоса, сливы и алычи в ряде регионов Украины; применение растений-индикаторов; иммунохроматографический метод и ИФА – система «Пиротест». Многолетними наблюдениями установлены оптимальные сроки проявления внешних признаков болезни – апрель-май, август-сентябрь. Выявлены наиболее характерные симптомы вируса шарки. Так, у ряда сортов персика – Бекетовский, Достойный, Золотая Москва, Тракийский Ранний, Эрли Ред Хейвен, California, Maria Marta, Venus на листьях были обнаружены хлоротические пятна, дуги и кольца вдоль центральной и боковых жилок, на зеленых плодах – хлоротические пятна и кольца, на зрелых плодах – красные кольца, яркие сливающиеся сиренево-красные пятна или крупные кольца с розовым центром (рис. 1 а-г). У таких плодов косточки часто деформированы.

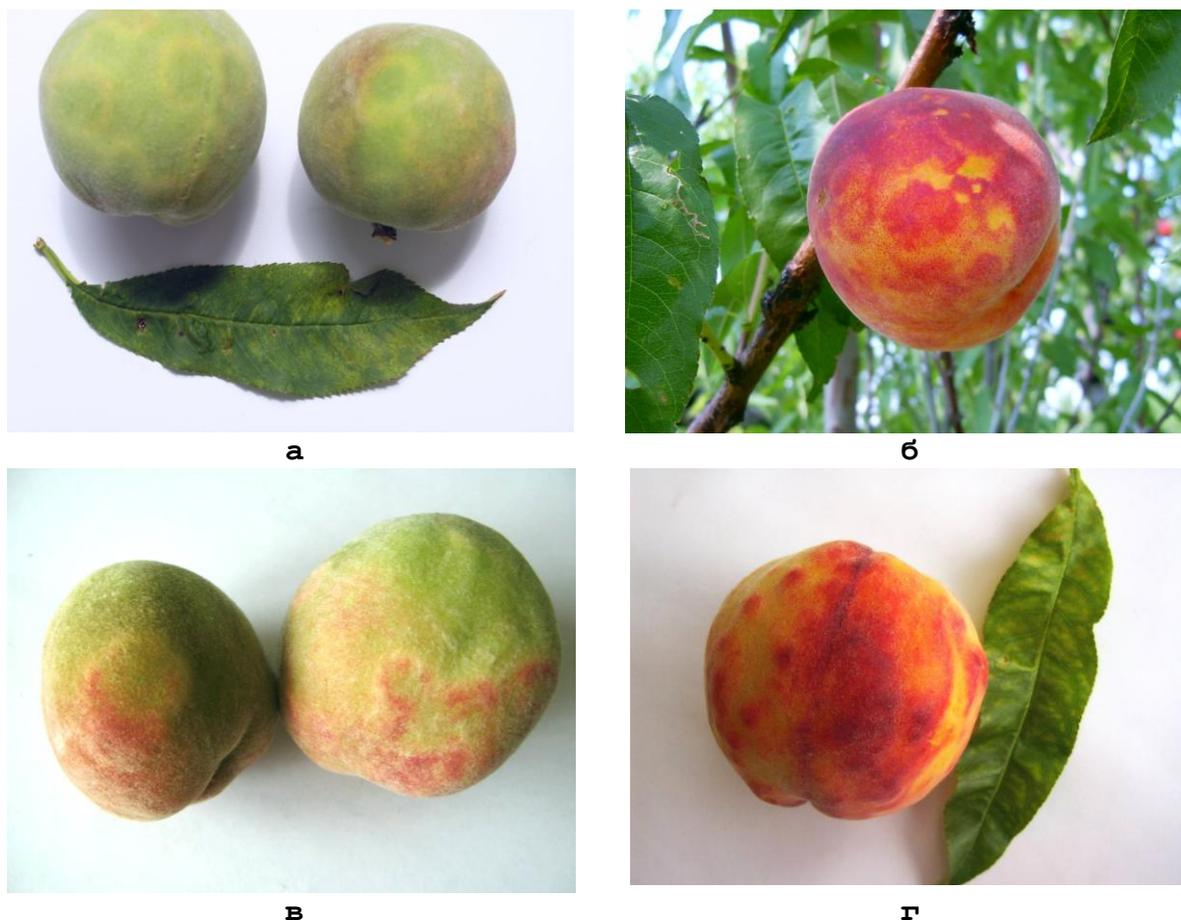


Рис. 1. Внешние признаки проявления вируса шарки на листьях и плодах персика: а и б – сорт Эрли Ред Хейвен; в – сорт Тракийский Ранний; г – сорт Золотая Москва

На листьях сортов абрикоса сортов Детский, Маркулешти, Мечта и Mandule Kayszi наблюдались желто-зеленые кольца, пятна и дуги, на плодах – светлоокрашенные пятна, окруженные зеленым кольцом, бугристость. У пораженных плодов сорта Маркулешти на косточках были заметны кольца и язвы. Сходные симптомы отмечены у сортов алычи Бордовая, Пурпуровая, Салгирская Румяная и сортов сливы Верити, Изюм Эрик, Клеймен, Ренклюд Альтана, Стенлей. На листьях – мелкие хлоротические пятна, кольца, дуги, полосы; на плодах проявлялись светлые кольца с более темным центром, вдавленные пятна; плоды сливы, как правило, деформированы, на косточках – темноокрашенные пятна (рис. 2 а, б). При этом установлено, что основная вредоносность вируса связана с неравномерным созреванием и некротическим поражением плодов, что согласуется с литературными данными [1, 13].

При идентификации возбудителя шарки сливы (PPV) сортообразцы отбирали с деревьев определенного сорта, имеющих как явные симптомы поражения, так и с бессимптомных. На растениях-индикаторах *Ch. foetidum*, *N. clevelandii*, *N. benthamiana* протестировано 418 сортообразцов, из них абрикоса – 102, персика – 199, сливы – 81 и алычи – 36. Тестирование на растениях-индикаторах показало положительную реакцию на вирус шарки в 287 сортообразцах.



Рис. 2. Симптомы поражения вирусом шарки на листьях сливы сортов Поп Харитон (а) и Клеймен (б)

Включение в систему комплексной диагностики методов ИФА-«Пиротест» и иммунохроматографического анализа (иммунострипов) значительно ускоряет процесс идентификации вируса шарки. Система «Пиротест» выполняется как стандартный сэндвич-вариант твердофазного иммуноферментного анализа. В качестве фермента использована неорганическая пирофосфатаза, расщепляющая молекулу пирофосфата на два иона фосфата, которые окрашиваются стоп-реагентом в яркий зелено-синий цвет. Интенсивность окрашивания пропорциональна концентрации вируса в образце. В отрицательном контроле и в образцах, не содержащих вирус, наблюдается желтое окрашивание. Результаты исследований, представленные на рисунке 3 а, показывают положительную реакцию на вирус шарки (PPV) сортообразцов абрикоса, персика, сливы (лунки окрашены в зелено-синий цвет разной интенсивности).

Среди проанализированных 1500 сортообразцов персика доказано наличие вируса шарки в 487, что составляет 32,5%. Из 238 сортообразцов абрикоса вирус обнаружен в 59 (24,8%). Самый высокий процент (61,7%) пораженных сортообразцов был выявлен у сливы – из 300 сортообразцов вирус обнаружен в 185. Среди выращиваемых косточковых плодовых культур наиболее устойчивой к вирусу шарки оказалась алыча. Из 186 сортообразцов положительную реакцию дал лишь 21 (11,3%). В период обследования нами впервые был обнаружен новый природный резерватор вируса – дурман (*Datura stramonium* L.), произрастающий в междурядьях промышленных насаждений персика. Лабораторный анализ подтвердил наличие вируса шарки в соке, выделенном из листьев дурмана. Как показали наши исследования, система «Пиротест», по сравнению с другими серологическими методами для обнаружения вируса шарки в том или ином сорте, является наиболее перспективной и позволяет выявить минимальные концентрации вируса PPV в сортообразце – 10-50 нг/мл. Поэтому при отборе толерантных сортов к PPV применяли систему «Пиротест» в сочетании с методом оценки сортов на содержание стероидных гликозидов, что обеспечило достоверность полученных результатов.

Проведение диагностики вируса шарки во внелaborаторных полевых условиях показало эффективность высокочувствительного экспресс-метода иммунохроматографического анализа. Принцип применения иммунострипов заключается в следующем: тест-полоску погружали в анализируемую пробу (экстракт листа) на 1,5 мин в вертикальном положении, а затем извлекали и помещали на горизонтальную поверхность. Реакцию оценивали визуально в течение 10 мин. Результаты анализа представлены на рисунке 3 б.

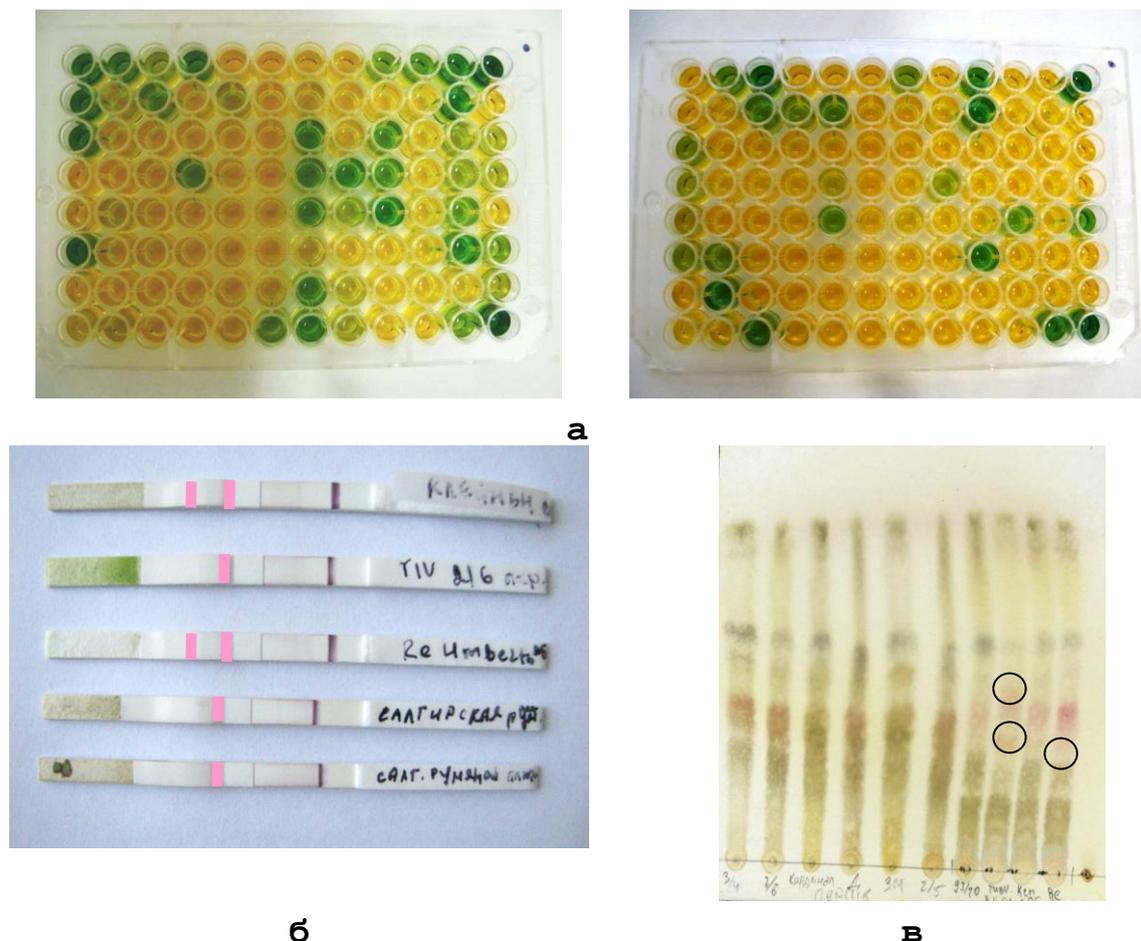


Рис. 3. Метод диагностики вируса шарки косточковых плодовых культур на основе комплексного использования системы «Пиротест», метода ИХА и использования как маркера вирусоустойчивости стероидных гликозидов фураностанового ряда: а – диагностика вируса шарки сливы сортов персика, абрикоса, алычи и сливы методом ИФА системы «Пиротест»: желтое окрашивание – вирус отсутствует; зелено-синее окрашивание – вирус выявлен; б – определение вируса PRV в экстрактах из листьев сливы ‘Клеймен’, персика ‘Бархатистый’, абрикоса ‘Re Umberto’ и алычи ‘Салгирская Румяная’ методом иммунохроматографического анализа; в – выявление стероидных гликозидов в коре и вегетативных почках сортов косточковых плодовых культур методом тонкослойной хроматографии (пятна морковного цвета)

При оценке и отборе толерантных и устойчивых к вирусу шарки сортов косточковых плодовых культур разрабатывались методы определения качественного и количественного содержания стероидных гликозидов, как маркеров вирусоустойчивости, и одновременно изучали локализацию вируса в органах и тканях сортов персика, абрикоса, сливы и алычи.

Как видно из таблицы, вирус шарки обнаружен в вегетативных почках, листьях и плодах сортов абрикоса Детский, Маркулешти, Re Umberto, персика сортов Золотая Москва, Понтийский, Stark Early Glo, сливы сортов Клеймен, Ренклюд Альтана, Стенлей, алыче сортов Бордовая и Салгирская Румяная.

Принцип использования стероидных гликозидов при оценке устойчивых или толерантных сортов косточковых плодовых культур основан на том, что стероидные гликозиды фураностанового ряда могут выступать в качестве маркера вирусоустойчивости благодаря своим антиоксидантным свойствам и способны стимулировать защитные реакции растения-хозяина, индуцируя у него устойчивость [5, 6].

Таблица

Результаты изучения локализации вируса шарки (PPV) и стероидных гликозидов (СГ) в сортообразцах абрикоса, персика, сливы и алычи

№ пп	Сортообразец	Локализация вируса PPV ^{*)}			Локализация СГ ^{**)}	
		плоды	почки	листья	листья (почки)	древесина
1	2	3	4	5	6	7
	<i>Абрикос</i>					
1.	Альтаир	-	+	+	-	-
2.	Гибридный	-	+	+	+	-
3.	Детский	+	+	+	+	+
4.	Кеч-Пшар	-	+	+	0	0
5.	Маркулешти	+	+	+	+	+
6.	Палава	-	0	0	-	-
7.	Юпитер	+	+	+	0	-
8.	97-20	+	+	+	0	-
9.	Narcot	0	0	0	0	-
10.	Mandule Cayszi	-	+	+	+	+
11.	Re Umberto	+	+	+	0	-
	<i>Персик</i>					
12.	Бархатистый	0	0	0	0	-
13.	Гранатовый	-	+	+	-	-
14.	Декоративный	-	+	+	0	-
15.	Достойный	-	+	+	-	-
16.	Золотая Москва	+	+	+	0	0
17.	Кардинал	-	+	+	0	0
18.	Лакомый	-	+	+	-	-
19.	Любимый	-	+	+	-	-
20.	Мечта	-	0	0	-	-
21.	Нарядный Никитский	-	0	0	-	-
22.	Никитский Подарок	-	0	0	-	-
23.	Памятный Никитский	-	+	+	-	-
24.	Понтийский	+	+	+	-	-
25.	Темисовский	-	+	+	-	-
26.	Санбим	-	+	+	0	-
27.	Frederica	-	+	+	-	-
28.	Loadel	-	0	0	-	-
29.	Stark Early Glo	+	+	+	-	-
	<i>Слива</i>					
30.	Клеймен	+	+	+	0	0
31.	Монфор	0	0	0	0	+
32.	Нивена	0	0	0	0	0
33.	Ренклюд Альтана	+	+	+	0	+
34.	Стенлей	+	+	+	0	+
	<i>Алыча</i>					
35.	Бордовая	+	+	+	0	-
36.	Идиллия	0	0	0	+	0
37.	Орбита	0	0	0	+	-
38.	Салгирская Румяная	-	+	+	0	0
39.	Субхи Ранняя	0	0	0	0	0
40.	Таврическая	0	0	0	0	0

Примечание: *) (0) – вирус отсутствует; (+) – вирус шарки обнаружен; (-) – в период отбора образцов плоды отсутствовали

**) (0) – СГ не выявлены; (+) – СГ обнаружены; (-) – опыт не проводился

В связи с этим нами проведено скрининговое исследование 7 сортов абрикоса, 5 сортов сливы, 6 сортов персика и 6 сортов алычи на присутствие стероидных гликозидов

ряда фуростана. Для каждого сорта отбирали образцы с внешне здоровых и пораженных деревьев. Для извлечения стероидных гликозидов использовали древесину, кору, почки и листья в зимний, весенний и летний периоды. Из 26 сортообразцов гликозиды фуростанового ряда обнаружены в листьях и почках, в том числе у 18 сортообразцов – в древесине (табл.). Наличие стероидных гликозидов выявлено у абрикоса формы 97-20, сортов Детский, Mandula Cayszi, у сортов сливы Монфор, Ренклюд Альтана, Стенлей и сортов алычи Идиллия и Орбита. Содержание гликозидов в органах растений, пораженных вирусом шарки, оценивали на хроматограмме по яркости окраски пятна морковного цвета, которое является количественной характеристикой присутствия стероидного гликозида в исследуемом образце (рис. 3в).

Выводы

Таким образом, на основании проведенного нами мониторинга выявлены очаги вирусной инфекции, определены некоторые пути интродукции вируса в регионы и дана оценка поражаемости сортов косточковых плодовых культур, что позволило разработать и усовершенствовать комплексные биотехнологические системы методов диагностики, тестирования и отбора толерантных сортов к вирусу шарки (PPV).

Используя биотехнологическую систему комплексной диагностики и отбора толерантных сортов, можно достоверно утверждать о значительном распространении и опасности вируса шарки на юге Украины и, особенно, в АР Крым.

Как показывают результаты наших исследований, для радикального снижения вредоносности вируса шарки необходим перевод косточковых плодовых культур на безвирусную основу, а также поиск и создание устойчивых и толерантных сортов персика, абрикоса, сливы и алычи.

Работа выполнена в рамках проекта УААН 09.02/016.

Список литературы

1. Устойчивость сортов и гибридов сливы к вирусу шарки / Вердеревская Т.Д., Бивол Т.Ф., Кеглер Х., Кукурузак Е.А. // Генетика иммунитета и селекция сельскохозяйственных растений на устойчивость в Молдавии. – Кишинев: Штиинца, 1984. – С. 99-107.
2. Вердеревская Т.Д., Маринеску В.Г. Вирусные и микоплазменные заболевания плодовых культур и винограда. – Кишинев: Штиинца, 1985. – 311 с.
3. Вредные организмы, имеющие карантинное значение для Европы // Информационные данные по карантинным вредным организмам для Европейского союза и Европейской и Средиземноморской организации по защите растений (ЕОЗР) / Пер. с англ. – М.: Колос, 1996. – 912 с.
4. Кеглер Х., Вердеревская Т. Развитие и современный уровень диагностики вирусов плодовых культур // Производство безвирусного посадочного материала плодовых культур и винограда: Второе совещание специалистов стран-членов СЭВ. – Ашерслебен, 6-10 июля 1976 г. – Берлин, 1977. – С. 15-28.
5. Строение и биологическая активность стероидных гликозидов ряда спиростана и фуростана / Кинтя П.К., Лазурьевский Г.В., Балашова Н.Н., Балашова И.Т., Суружиу А.И., Лях В.А. – Кишинев: Штиинца, 1987. – 142 с.
6. Лахматова И.Т. Устойчивость сливы к вирусу шарки: Автореф. дис. ... доктора биол. наук / Науч.-исслед. селекционно-технический ин-т плодоводства Республики Молдова. – М., 1997. – 48 с.
7. Диагностика вирусных болезней и биотехнологические приемы получения безвирусного посадочного материала косточковых плодовых культур / Митрофанова О.В., Славгородская-Курпиева Л.Е., Митрофанова И.В., Лукичева Л.А. – Ялта: Крымпресс, 2000. – 46 с.

8. Изучение вирусов и вирусных болезней косточковых плодовых культур на юге Украины и особенности оздоровления растений *in vitro* / 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. // Бюлл. Никит. ботан. сада. – 2005. – Вып. 91. – С. 1-120.
9. Митрофанова О.В., Лесникова-Седошенко Н.П., Ходаков Г.В. Биотехнология в селекции и оздоровлении косточковых плодовых и субтропических культур / Фактори експериментальної еволюції організмів: Зб. наук. пр. Укр. т-ва генетиків і селекціонерів ім. М.І. Вавилова / За ред. М.В. Роїка. – К.: Логос, 2006. – Т. 3. – С. 619-624.
10. Митрофанова О.В., Митрофанова И.В. Вирусы субтропических и косточковых плодовых культур и биотехнологические приемы оздоровления растений // Біоресурси та віруси: II Міжнар. конференція. Київ, 7-10 вересня 1998 р. – Київ: Фітосоціоцентр, 1998. – С. 94.
11. Омелюта В.П., Устінова А.Ф., Устінов І.Д. Карантинні об'єкти // Захист рослин. – 1997. – № 3. – С.4-5.
12. Пискун Н.И. «Шарка» слив на Украине // Защита растений. – 1969. – № 6. – С. 54.
13. Ратушняк Л.К. Розповсюдженість шарки сливи в Україні // Вісник аграрної науки південного регіону. Сільськогосподарські та біологічні науки. – Одеса: СМІЛ, 2003. – Вип. 4. – С. 156-163.
14. Чирков С.Н., Приходько Ю.Н. Пиротест – новый метод диагностики вируса шарки сливы // Промышленное производство оздоровленного посадочного материала плодовых, ягодных и цветочно-декоративных культур: Междунар. науч.-практич. конф. 20-22 ноября 2001 г. – М.: ВСТИСП, 2001. – С. 71-72.
15. Шевченко Т.П., Полищук В.П., Бойко А.Л. Віруси рослин: штамове різноманіття – Київ: Фітосоціоцентр, 2002. – 78 с.
16. Шпаар Д. Хозяйственное значение вирусных болезней культурных растений // Борьба с вирусными болезнями растений / Пер. с нем. Г.И. Лойдиной. – М.: Агропромиздат, 1986. – С. 9-35.
17. Atanassov D. Plum pox. A new virus disease // Annals of the University of Sofia Faculty of Agriculture and Silviculture. – 1932. – 11. – P. 49-69.
18. Plum pox virus and the estimated costs associated with sharka disease / Cambra M., Capote N., Myrta A., Llacer G. // Bulletin OEPP/EPPO Bulletin. – 2006. – 36. – P. 202-204.
19. Candresse T., Cambra M. Causal agent of sharka disease: historical perspective and current status of *Plum pox virus* strains // Bulletin OEPP/EPPO Bulletin. – 2006. – 36. – P. 239-246.
20. James D., Glasa M. Causal agent of sharka disease: new and emerging events associated with *Plum pox virus* characterization // Bulletin OEPP/EPPO Bulletin. – 2006. – 36. – P. 247-250.
21. Kondratenko P., Udovichenko V. *Plum pox virus* (PPV) in Ukraine // Bulletin OEPP/EPPO Bulletin. – 2006. – N 36. – P. 217.
22. Kunze L., Krczal H. Transmission of sharka virus by aphids // Fruit Tree Virus Diseases: 8th European Symposium, Paris, France, 1971. – Paris: INRA, 1971. – P. 255-260.
23. Molecular identification of *Plum pox virus* isolates from Lithuania and Ukraine / Norkus T., Staniulis J., Žižytė M., Melnyk M., Yusko L., Snihur H., Budzanivska I., Polischuk V. // Zemdirbyste-Agriculture. – 2008. – V. 95, N 3. – P. 277-285.
24. Nemeth M. History and importance of *Plum pox virus* in stone-fruit production // Bulletin OEPP/EPPO Bulletin. – 2004. – N 24. – P. 525-536.
25. Roy A.S., Smith I.M. *Plum pox virus* situation in Europe // Bulletin OEPP/EPPO Bulletin. – 2004. – N 24. – P. 515-523.

СИСТЕМНЫЙ АНАЛИЗ ИЗМЕНЧИВОСТИ ПРИ РАЗРАБОТКЕ МЕТОДОВ УСКОРЕННОЙ ОЦЕНКИ УСТОЙЧИВОСТИ ФОРМ РОДА *CERASUS* MILL. К КОККОМИКОЗУ

А.П. КУЗНЕЦОВА, кандидат биологических наук

ГНУ Северо-Кавказской зональный

научно-исследовательский институт садоводства и виноградарства Россельхозакадемии,
Россия;

С.Н. ЩЕГЛОВ, доктор биологических наук

Кубанский государственный университет, Россия

Введение

Основной сложностью при выделении форм плодовых культур как из селекционного материала, так и сортового, является длительность процесса изучения, т.к. эти многолетние растения представляют собой двухкомпонентную систему, состоящую из сорта и подвоя, которые обладают самостоятельными механизмами и структурами саморегуляции.

Разработка ускоренной оценки хозяйственно ценных параметров интродуцированных растительных ресурсов и новых отечественных на основе использования инструментальных методов последнего поколения является весьма актуальным направлением с позиций фундаментальных исследований, ориентированных на разработку ресурсосберегающих, экологически безопасных и экономически оправданных технологий возделывания плодовых культур.

Одним из главных биотических стрессоров, значительно снижающих урожайность, зимостойкость, засухоустойчивость как подвоев, так и привитых на них культурных растений рода *Cerasus* Mill., в условиях юга России является коккомикоз (возбудитель – *Coccomyces hiemalis* Higg.– сумчатая стадия и *Cylindrosporium hiemalle* Higg. – конидиальная стадия).

При изучении сложной системы «хозяин-патоген-среда», где хозяин представлен в виде двухкомпонентного организма, перспективным направлением явилось изучение биохимических показателей листьев устойчивых и неустойчивых к коккомикозу форм вишни в различных экологических условиях (различные года и сезоны) как для прогнозирования поражения сортов вишни коккомикозом, так и для создания экспресс-оценки устойчивости к возбудителю болезни.

Наличие в СКЗНИИСиВ современной инструментальной лабораторной базы и разработанных в СКЗНИИСиВ методик позволило провести биохимический анализ листьев у поражаемых и не поражаемых коккомикозом растений.

Цель наших исследований – поиск связи между устойчивостью форм рода *Cerasus* к коккомикозу и биохимическими показателями для создания методов экспресс-оценки, а также обнаружение экологической составляющей этих признаков за счет использования современных биохимических и многомерных статистических методов. Использование методов многомерной статистики предполагает обращение к системному анализу рассматриваемого явления, основных его составляющих и связей, принятие решения о характере установленных закономерностей (распознавание с помощью дискриминантного анализа).

Объекты и методы исследования

Биохимический анализ листьев иммунных и поражаемых коккомикозом форм проводился в течение 2003-2008 гг. – весной, летом и осенью. Объекты исследований – представители рода *Cerasus*, поражаемые коккомикозом сорта: вишня Любская, Малышка, Краснодарская сладкая, черешня сорта Франц Иосиф и не поражаемые формы – сеянцы от свободного опыления образцов *C. lannesiana* Carr., *C. serrulata* Halle

Tolivetto, гибрид *C. lannesiana* × Франц Иосиф, а также подвои косточковых ВП1, ВСЛ-2. Исследовали образцы листьев, взятые с приростов текущего года, отобранные в разных зонах Краснодарского края. Содержание калия, натрия, магния, кальция, фенольных соединений и органических кислот в экстракте листьев определяли с помощью СВЧ-минерализатора «Минотавр-1», рН-метра рН 410, системы капиллярного электрофореза «Капель-103Р» [2, 4].

В работе был использован дискриминантный анализ, обеспечивающий объективное сравнение (разделение) групп за счет искусственной минимизации внутригруппового разнообразия (дисперсии), с учетом системы корреляций, более того, когда несколько групп уже разделены в дискриминантном анализе, возможно определить принадлежность неизвестного объекта к одной из них [1, 3].

Результаты и обсуждение

Исследование содержания в клеточном соке катионов металлов (магния, кальция, калия, натрия), органических кислот (лимонной, яблочной, янтарной) и фенольных соединений начали с изучения количественной оценки влияния генотипа представителей рода *Cerasus* (сорт) и года выращивания на биохимические показатели с помощью двухфакторного дисперсионного анализа.

Было установлено, что генотип и год выращивания оказывают статистически достоверное влияние на все биохимические показатели. Результаты дисперсионного анализа данных за исследуемые года показали, что структура изменчивости этих показателей в соке листьев растений различна.

Для нахождения оптимальных сроков выявления максимальных различий, достоверно подтверждаемых статистическими методами, химический анализ клеточного сока каждый год проводился весной, летом и осенью. С помощью однофакторного дисперсионного анализа было доказано, что результаты измерений по каждому году показывают статистически значимые различия и по временам года.

Была определена количественная оценка влияния года, вида, срока исследования и их взаимодействия на биохимические признаки (табл. 1).

Из таблицы 1 видно, что различия обнаружены по всем без исключения признакам, а доля влияния фактора «год» варьирует от 4,1 до 30,8%, фактора «вид» от 0,9 до 13,1%, фактора «срок измерения» от 2,4 до 27,9%, взаимодействия «год × вид» от 4,7 до 16,4%, взаимодействия «год × срок измерения» от 7,7 до 41,7%, взаимодействия «вид × срок измерения» от 2,6 до 21,3%, взаимодействия «год × вид × срок измерения» от 15,6 до 33,7%.

Можно сделать вывод, что на этот последний вид взаимодействия приходится наибольший вклад в общую изменчивость биохимических признаков. Для некоторых признаков отмечены высокие вклады влияния года – 30,8% (содержание Na) и взаимодействия «год × срок исследования» – 41,7% (содержание янтарной кислоты).

Для решения вопроса о стабильности различий устойчивых и неустойчивых видов по биохимическим признакам было проведено сравнение их средних значений *t*-критерием Стьюдента по срокам измерения и годам исследования (табл. 2).

Из общей картины видно, что все признаки оказались задействованы в идентификации устойчивых и неустойчивых сортов, но некоторые стабильно различались каждый год. Надежным идентификатором устойчивых и неустойчивых видов (показавшим статистически достоверные различия три года подряд) в мае является содержание янтарной и лимонной кислот, магния и кальция; в июле – содержание хлорогеновой, кофейной и яблочной кислот, калия; в сентябре – содержание лимонной кислоты (табл. 2).

Таблица 1

**Доля в общей дисперсии факторов, влияющих на изменчивость
биохимических признаков (%)**

Изменчивость	Биохимические признаки								
	хлорогеновая кислота	кофейная кислота	янтарная кислота	яблочная кислота	лимонная кислота	калий	натрий	магний	кальций
между годами	16,2	7,3	12,2	4,1	16,8	8,7	30,8	8,5	4,7
между видами	7,6	11,1	0,9	7,3	7,7	13,1	1,7	2,8	6,9
между сроками	16,4	2,4	21,2	18,9	4,2	4,7	12,7	23,7	27,9
«год × вид»	10,2	16,4	5,6	10,9	7,8	14,0	4,7	6,4	14,8
«год × срок»	13,2	8,7	41,7	14,3	12,5	7,7	26,1	32,2	2,2
«вид × срок»	11,3	18,6	2,6	10,1	16,1	21,3	4,2	6,7	17,0
«год × вид × срок»	24,3	29,8	15,6	33,6	33,7	27,0	17,7	19,3	26,3
остаточная	0,8	5,8	0,2	0,7	1,1	3,4	2,1	0,3	0,3

Таблица 2

**Сравнение средних значений устойчивых и неустойчивых видов
на примере данных 2003-2005 гг.***

Признак	Май			Июль			Сентябрь		
	2003	2004	2005	2003	2004	2005	2003	2004	2005
хлорогеновая кислота	-	+	-	+	+	+	-	+	-
кофейная кислота	+	+	+	+	+	+	-	+	-
янтарная кислота	+	+	+	-	+	-	+	-	-
яблочная кислота	-	-	+	+	+	+	+	-	-
лимонная кислота	+	+	+	+	-	-	+	+	+
калий	-	-	-	+	+	+	-	+	+
натрий	+	-	+	-	+	+	-	-	-
магний	+	+	+	+	+	+	-	-	+
кальций	+	+	+	-	+	-	-	-	-

*Примечание: знаком «+» обозначены статистически достоверные различия между устойчивыми и неустойчивыми формами рода *Cerasus*

Представляло интерес изучение содержания биохимических веществ в листьях до и после поражения коккомикозом. Их сравнение было проведено с помощью t-критерия Стьюдента. Была найдена экологическая составляющая содержания биохимических веществ в листьях вишни, зависящая от года. Установлено, что стабильные различия (в

течение трех лет) обнаружены в таких показателях, как содержание яблочной кислоты, натрия и кальция (их количество всегда растет после поражения).

По многолетним данным было установлено, что весной в период активного роста обнаруживаются статистически достоверные различия по наибольшему числу биохимических показателей. Сравнение средних значений химических показателей с помощью t-критерия Стьюдента между годами подтвердило вывод, что устойчивые и неустойчивые к коккомикозу формы статистически достоверно различаются по этим четырём признакам, содержанию магния, кальция, кофейной и янтарной кислот.

С учетом именно этих четырех показателей был проведен дискриминантный анализ для окончательного разделения различных форм на устойчивые и неустойчивые к коккомикозу, который показал, что разделение представителей рода *Cerasus* по выделенным показателям проходит успешно (табл. 3).

В результате анализа по данным за четыре года были получены функции классификации и неравенство, позволяющее относить неизвестные образцы к устойчивым или неустойчивым образцам (патент РФ №2343697 от 2009 г.). Листовую диагностику проводят в период активного роста листьев путем определения в них количественного содержания магния, кальция, кофейной и янтарной кислот, а об устойчивости форм к коккомикозу судят сравнением полученных уравнений.

Устойчивые формы = $0,1015 \cdot \text{Содержание кофейной кислоты} + 5,2659 \cdot \text{Содержание янтарной кислоты} + 0,0122 \cdot \text{Содержание магния} + 0,0277 \cdot \text{Содержание кальция} - 12,1629$.

Таблица 3

Результаты дискриминантного анализа представителей рода *Cerasus* Mill., устойчивых и неустойчивых к коккомикозу

Дискриминантная функция	Лямбда Уилкса	Хи-квадрат	Число степеней свободы	Уровень значимости
1	0,366	41,13	4	0,00

Неустойчивые формы = $0,01997 \cdot \text{Содержание кофейной кислоты} + 7,46984 \cdot \text{Содержание янтарной кислоты} + 0,0095 \cdot \text{Содержание магния} + 0,02763 \cdot \text{Содержание кальция} - 5,90917$.

Генотип будет относиться к устойчивому и неустойчивому к коккомикозу при максимальном классификационном значении, полученном при умножении биохимических показателей на соответствующие коэффициенты.

Выводы

Изучение структуры изменчивости биохимических показателей в процессе вегетации растений позволило найти их связь с устойчивостью к коккомикозу и разработать метод экспресс-оценки данного вида устойчивости.

Обнаруженная экологическая составляющая изменчивости биохимических признаков требует дальнейшего изучения для разработки новых методов прогнозирования развития инфекции.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ и администрации Краснодарского края № 06-04-97142 и № 09-04-96601.

Список литературы

1. Клекка У.Р. Дискриминантный и кластерный анализ // Факторный дискриминантный и кластерный анализ. – М.: Финансы и статистика, 1989. – С. 78-137.

2. Комаров Н.В., Каменцев Я.С. Практическое руководство по использованию систем капиллярного электрофореза «Капель». – СПб.: ООО «Веда» 2008. – 212 с.
3. Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Высшая школа, 1990. – 293 с.
4. Якуба Ю.Ф. Применение СВЧ-экстракции и высокоэффективного капиллярного электрофореза для анализа вегетативных органов растений // Современное приборное обеспечение и методы анализа почв, растений и с/х сырья: Сб. науч. тр. по материалам II Междунар. конф. 6-9 декабря 2004 / Отделение земледелия РАСХН, ВНИИ агрохимии им. Д.Н. Прянишникова, Москва. – М.: ВНИИА, 2004. – С. 71-74.

НОВЫЕ РАЙОНИРОВАННЫЕ И ПЕРСПЕКТИВНЫЕ СОРТА ЧЕРЕШНИ СЕЛЕКЦИИ НИКИТСКОГО БОТАНИЧЕСКОГО САДА

Л.А. ЛУКИЧЕВА, кандидат биологических наук
Никитский ботанический сад – Национальный научный центр

Введение

Никитский ботанический сад – Национальный научный центр является одним из старейших научных учреждений, занимающихся не только изучением интродуцированных, но и выведением новых сортов черешни – *Cerasus avium* (L.) Moench (*Prunus avium* L.) [4, 8]. Успешное решение задач по их созданию во многом определяется наличием разнообразного исходного материала, несущего различные признаки и свойства [9, 10].

В генофонде черешни НБС–ННЦ собрано более 400 сортообразцов из 19 стран мира, принадлежащих к 7 эколого-географическим группам. На основе многолетних исследований дана оценка генофонда по следующим показателям: хорошая приспособленность к местным условиям, зимостойкость, крупные плоды и высокие вкусовые качества, урожайность, скороплодность, транспортабельность, устойчивость к основным заболеваниям и к растрескиванию плодов, засухоустойчивость и др. В результате выявлены сорта – источники хозяйственно ценных признаков, которые и были использованы в селекционном процессе путем направленной гибридизации.

При оптимальной агротехнике черешня дает высокие стабильные урожаи и является высокорентабельной культурой [2]. Природно-климатические условия Крыма очень специфичны. Лимитирующим фактором при возделывании черешни являются частые оттепели в зимнее время и возвратные заморозки весной [1]. Наряду с этим, в последнее время существенное значение имеют меняющиеся климатические, экологические, экономические и другие условия [5]. Это требует постоянного совершенствования сортимента, способного быстро адаптироваться к изменяющимся условиям. Поэтому постоянно требуется внедрение новых сортов, способных адаптивно реагировать на возможные изменения климата, разный уровень технической обеспеченности, конъюнктуру рынка и другие объективные факторы. В связи с этим очевидна необходимость обновления существующего сортимента черешни новыми, перспективными сортами, в полной мере отвечающими требованиям сегодняшнего дня.

Целью исследования было изучение коллекционного и селекционного фонда черешни и выделение к районированию новых высокопродуктивных, стойких к болезням, адаптированных к условиям степной зоны Крыма сортов черешни, имеющих плоды различных сроков созревания.

Объекты и методы исследования

За период исследований, с 1992 г. по настоящее время, проведена хозяйственно-биологическая и селекционная оценка генофонда черешни по основным хозяйственно

ценным признакам. Работы по селекции и сортоизучению проводили в соответствии с общепринятыми методиками [6, 7]

Результаты и обсуждение

На протяжении ряда лет в Степном отделении НБС–ННЦ проводили изучение генофонда с целью выявления перспективных сортов, которые по комплексу хозяйственно ценных признаков значительно превосходят районированные.

Это послужило основанием для выделения перспективных сортоформ с целью практического и селекционного использования. На участке производственного испытания, расположенном в с. Новый сад, проходят испытание 18 отборных перспективных сортоформ. Они разнообразны по окраске, размерам и форме плодов, консистенции мякоти, по срокам созревания и существенно различаются по габитусу кроны.

Благодаря успешной работе селекционеров НБС–ННЦ существенно поменялся состав районированных сортов черешни. До 2007 г. в Реестр по Крыму входили одиннадцать сортов и только три из них были выведены в Никитском ботаническом саду. В список сортов растений, занесенных в Государственный реестр, пригодных для распространения в Украине и рекомендованных для выращивания в Автономной Республике Крым на 2008-2009 гг., входит четырнадцать сортов черешни, одиннадцать из которых выведены в Никитском ботаническом саду [11]. Это сорта различных сроков созревания. К ультраранним и ранним срокам созревания относятся сорта Патриотка Крыма, Услава, Призерша и Весенние Напевы. Баловница, Пиковая Дама, Крымская Ночь, Чернокрымка – сорта среднего срока и Выставочная, Генеральская, Июльская – позднего срока созревания. В 2008 г. оформлены заявочные документы на первичную экспертизу еще трех перспективных сортов: Кутузовка, Знатная и Карадаг.

Ниже дана краткая характеристика районированных и новых перспективных сортов черешни (табл.).

Сорт черешни **Патриотка Крыма** очень раннего срока созревания (20-25 мая). Плоды округлой формы, средняя масса 4,9 г. Окраска плодов темно-бордовая, при полном созревании – черная. Мякоть темная, средней плотности. Отрыв плода от плодоножки сухой, прочность прикрепления плотная. Крона округлая, средней высоты. Сорт относительно устойчив к монилиозу. При дегустации плодов ощущается легкий привкус шоколада.

Сорт **Услава (Джалита)** очень раннего срока созревания (21-26 мая). Плоды крупные для этого срока созревания (5,8 г), одномерные, округлой формы, приплюснутые с боков. Основная окраска плодов темно-красная, плотность мякоти выше средней, вкус сладко-кислый. Дерево сильнорослое, крона обратно пирамидальная, средней густоты. Основные достоинства сорта: очень ранние сроки созревания, высокие вкусовые качества, красивый внешний вид плодов, хорошая транспортабельность, высокая морозостойкость, возможность получать урожай даже в критические годы [3].

Сорт **Призерша** раннего срока созревания (24-28 мая). Несмотря на раннее созревание, отличается очень крупными (6,5 г), одномерными плодами, плоскоокруглой формы. Основная окраска плодов темно-бордовая, мякоть бордовая, плотная, гармоничного вкуса. Отрыв плодоножки сухой, прочность прикрепления средняя. Дерево среднерослое, крона шаровидная, средней густоты. Основные достоинства сорта: имеет очень крупные, привлекательные плоды высоких вкусовых качеств, очень высокую транспортабельность.

Сорт **Весенние напевы** созревает 28 мая–2 июня. Обладает крупными плодами массой 5,5-6,0 г, высокого качества, плотность мякоти выше средней. Окраска плодов

Таблица

Краткая характеристика районированных и перспективных сортов черешни

Сорт	Дата цветения	Дата созр.	Сред. масса, г	Окраска		Плотн. мякоти	Отрыв плода	Дегус. оценка	Трансп.
				покров.	основн.				
Патриотка Крыма*	16-27/04	20-25/05	4,9	Черн.	Борд.	Сред.	Сух., плот.	4,3	Сред.
Услада*	15-24/04	20-25/05	5,8	Красн.	Борд.	Выше сред.	Сух., сред.	4,6	Выс.
Призерка*	17-26/04	26-31/05	6,5	Т-борд	Борд.	Плот.	Сух., сред.	4,5	Выс.
Весенние Напевы*	15-25/04	28/05-2/06	5,9	Крас.	Борд.	Сред.	Сух., сред.	4,3	Сред.
Пиковая Дама*	16-26/04	5-10/06	8,2	Борд.	Борд.	Плот.	Сух., сред.	4,6	Выс.
Чернокрышка*	16-30/04	4-8/06	6,8	Борд.	Т.-борд	Плот.	Сух., плот.	4,8	Выс.
Баловница*	16-26/04	12-17/06	8,5	Крас.	Крем.	Плот.	Сух., плот.	4,9	Выс.
Крымская Ночь*	20/04-2-/05	11-15/06	7,5	Борд.	Т.-борд.	Сред.	Сух., сред.	4,5	Сред.
Выставочная*	21/04-2/05	25-30/06	7,0	Роз.	Крем.	Плот.	Сух., сред.	4,8	Выс.
Генеральская*	21/04-2/05	27/06-1/07	8,0	Роз.	Крем.	Плот.	П/с., сред.	4,7	Сред.
Июльская*	19-27/04	5-10/07	6,2	Крас.	Крем.	Оч. пл.	Сух., сред.	4,6	Выс.
Кулузовка**	16-26/04	7-11/06	8,5	Т.-борд.	Т.-крас.	Плот.	Сух., плот.	4,8	Выс.
Знатная**	21/04-1/05	19-23/06	8,2	Борд.	Борд.	Плот.	Сух. слаб.	5,0	Выс.
Карадаг**	20/04-2/05	26/04-3/07	8,4	Черн.	Борд.	Оч. пл.	Сух., плот.	4,8	Выс.

Примечание: * - включен в Государственный реестр растений, ** - принят на госсортоиспытание

темно-красная. Отрыв плода от плодоножки сухой, прочность прикрепления средняя. Крона у дерева в молодом возрасте округло-овальной, затем раскидистой формы, средней густоты. Основные достоинства сорта: раннее созревание плодов, высокая устойчивость к морозам и весенним заморозкам. Сорт среднеустойчив к коккомикозу.

Сорт **Пиковая Дама** раннесреднего срока созревания (6-10 июня). Плоды средней массой 8 г, очень необычной привлекательной формы, широкосердцевидные, с сильно вытянутым носиком. Окраска плодов бордовая. Сок темно-красный. Плотность мякоти выше средней. Дерево среднерослое, с раскидистой кроной средней густоты. Основные достоинства сорта: высокие вкусовые качества, хорошая транспортабельность, очень привлекательный внешний вид.

Сорт **Чернокрымка**. Плоды созревают в середине июня, крупные (средняя масса 6,3 г), широкоокруглой формы. Окраска темно-бордовая, почти черная, мякоть бордовая, с белыми прожилками. Плоды высокотоварные, универсального назначения, высокой транспортабельности. Дерево сильнорослое, с широкоокруглой густой кроной. Цветет в средние сроки. Сорт устойчив к засухе, возвратным весенним заморозкам.

Сорт **Баловница** отличается очень крупными плодами (8,5-9 г), плоскоокруглой формы, созревающими в середине июня. Основная окраска плодов желтая, покровная – красная, размытая, занимающая около 50% поверхности; мякоть желтая, гармоничного вкуса с оценкой 4,9 балла. Отрыв плодоножки – сухой, прочность прикрепления плотная. Дерево среднерослое, крона метельчатая, раскидистая. Основные достоинства сорта: очень крупные, привлекательные плоды, высокие вкусовые качества, высокая транспортабельность.

Сорт **Крымская Ночь**. Плоды созревают в середине июня (16-20 июня), широкосердцевидной формы, средней массой 7,5 г. Окраска плода темно-красная, мякоть красная, средней консистенции. Отрыв плода от плодоножки сухой, средний. Вкусовые качества высокие. Основные достоинства сорта: высокие вкусовые качества, хорошая транспортабельность, очень привлекательный внешний вид. Ежегодная высокая урожайность. Сорт относительно устойчив к монилиозу.

Сорт **Выставочная** позднего срока созревания (25-30 июня), универсального назначения. Сорт имеет крупные плоды широкоокруглой формы. Основная окраска кремовая, покровная – розово-красная, размытая, занимающая 50-65% поверхности. Мякоть плотной консистенции, гармоничного содержательного вкуса. Плодоножка к плоду прикреплена прочно. Деревья среднерослые с широкоовальной кроной. Зимостойкость цветковых почек высокая, цветение позднее, урожайность высокая.

Сорт **Генеральская** позднего срока созревания (3 декада июня–1 декада июля). Плоды крупные, средней массой 8 г. Основная окраска кремовая, покровная – с розовым румянцем, мякоть плотная, гармоничного вкуса, с приятной кислинкой. Сорт универсального использования. Дерево сильнорослое, с округлой кроной. Зимостойкость цветковых почек хорошая, цветение позднее. Плодоношение ежегодное, урожайность высокая. Сорт устойчив к коккомикозу.

Сорт **Июльская** очень позднего срока созревания (6-10 июля). Плоды среднего размера, массой 6,2 г, яйцевидной формы. Основная окраска плодов кремовая, покровная розово-красная, мякоть кремового цвета, очень плотная, с большим содержанием сухих веществ. Плоды привлекательного внешнего вида, сладкого вкуса, универсального назначения, хранятся при комнатной температуре 3-5 дней без изменения окраски. Дерево сильнорослое, крона пирамидальная, густая. Основные достоинства сорта: очень позднее созревание, высокие вкусовые качества, высокая транспортабельность, возможность хранения без холодильника.

Сорт **Знатная** универсального назначения, имеет высококачественные привлекательные плоды, созревает 20-25 июня. Плоды крупные (средняя масса около 8 г),

широкоокруглой формы. Окраска плода бордовая, мякоть темно-красного цвета, плотная, сочная, сок красный. Вкус гармоничный. Отрыв плода сухой, прочность прикрепления средняя. Транспортабельность высокая. Основные достоинства: высокая урожайность, плоды универсального назначения, с высокими вкусовыми и товарными показателями. Стойкий к растрескиванию плодов после дождя. Сорт пригоден для механизированного съема плодов, обладает повышенной зимостойкостью и засухоустойчивостью.

Сорт **Карадаг (Наша Марка)** универсального назначения. Плоды созревают в конце июня–начале июля, очень крупные, средняя масса 8,4 г, очень привлекательные, блестящие. Окраска темно-бордовая, при полном созревании чёрная. Форма плода широкоокруглая, мякоть темно-бордового цвета, сок красный. Отрыв плода от плодоножки сухой, прочность прикрепления средняя. Мякоть очень плотная, транспортабельность и урожайность очень высокие. Основные достоинства: сорт позднего срока цветения, не попадает под возвратные заморозки, морозостойкий и стойкий к монилиозу. Повышенная устойчивость к растрескиванию плодов. Ежегодная высокая урожайность. Очень высокая транспортабельность.

Сорт **Кутузовка** средне раннего срока созревания (7-11 июня). Плоды очень крупные, средняя масса – 8,5 г, широкоокруглой формы. Окраска плода бордовая, мякоть темно-красного цвета, очень плотной консистенции, гармоничного вкуса. Отрыв плода от плодоножки сухой, прочность прикрепления средняя. Повышенная устойчивость к засухе. Урожайность высокая, транспортабельность плодов высокая. Сорт устойчив к растрескиванию плодов после дождя. Высокие вкусовые и товарные качества плодов.

Кроме описанных сортов, выделен ряд других перспективных гибридов и форм, заслуживающих внимания, которые требуют дополнительного изучения.

Выводы

1. Значительно расширен сортимент сортов черешни в Реестре по Крыму за счет включения в него новых сортов селекции НБС–ННЦ.
2. Новые районированные сорта обеспечивают конвейер поступления свежих плодов черешни с третьей декады мая по первую декаду июля.
3. Выделение новых перспективных сортов с последующим включением их в Реестр сортов растений Украины позволит полнее удовлетворять постоянно меняющиеся требования как промышленного производства, так фермерских и личных хозяйств. Кроме того, использование полученных сеянцев и сортоформ с ценными признаками позволит проводить направленные скрещивания и, таким образом, увеличит эффективность селекционного процесса.

Список литературы

1. Антюфеев В.В., Важов В.И., Рябов В.А. Справочник по климату Степного отделения Никитского ботанического сада. – Ялта, 2002. – 88 с.
2. Крамер З. Интенсивная культура черешни / Перевод с нем. А.М. Мазурицкого. – М.: Агропромиздат, 1987. – 186 с.
3. Лукичева Л.А. Новый сорт черешни Услава // Бюл. Никит. ботан. сада. – 2007. – Вып. 95. – С. 25-26.
4. Лукичёва Л.А., Орехова В.П. Сортоизучение черешни в степной зоне Крыма // Труды Никит. ботан. сада. – Ялта, 2004. – Т. 122. – С. 74-78.
5. Неотложные меры по обеспечению устойчивого развития садоводства юга Украины / Митрофанов В.И., Смыков В.К., Митрофанова О.В., Митрофанова И.В., Смыков А.В. // Труды Никит. ботан. сада. – Ялта, 2004. – Т. 122. – С. 8-15.
6. Программа и методика сортоизучения плодовых, ягодных и орехоплодных

- культур / Под ред. Е.Н. Седова, Т.П. Огольцовой. – Орел: ВНИИСПК, 1999. – 608 с.
7. Программа и методика селекции плодовых, ягодных и орехоплодных культур / Под ред. Е.Н. Седова. – Орел: ВНИИСПК, 1995. – 503 с.
8. Рябов И.Н. Сортоизучение и первичное сортоиспытание косточковых плодовых культур в Государственном Никитском ботаническом саду // Сотроизучение косточковых плодовых культур на юге СССР. – М.: Колос, 1969. – Т. XLI. – С. 5-83.
9. Смыков В.К. Интенсификация селекции и ускорение внедрения новых сортов плодовых культур // Труды Никит. ботан. сада. – Ялта, 1989. – Т. 107. – С. 6-15.
10. Смыков В.К., Смыков А.В. Мобилизация исходного материала для селекции плодовых культур // Труды Никит. ботан. сада. – Ялта, 2004. – Т. 122. – С. 6-8.
11. Список сортов растений, занесенных в Государственный реестр, пригодных для распространения в Украине и рекомендованных для выращивания в Автономной Республике Крым на 2008-2009 годы. – Симферополь, 2008. – 32 с.

МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ ПЕРСПЕКТИВНЫХ СОРТОВ ЧЕРЕШНИ (*PRUNUS AVIUM* L.) В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

Н.В. КОРЗИНА

Никитский ботанический сад – Национальный научный центр

Введение

Начало изучению изолированных органов и тканей черешни (*Prunus avium* L.) в условиях *in vitro* было положено Тукеу в 40-х годах прошлого столетия [20]. Для выведения раносозревающих сортов были проведены опыты с культурой зародышей персика и черешни. На протяжении последующих десятилетий создание новых сортов являлось ведущим направлением биотехнологических исследований косточковых плодовых культур.

В настоящее время в связи с высокой степенью поражения вирусной, бактериальной и грибной инфекцией промышленных насаждений методы биотехнологии активно применяют для получения оздоровленного ценного посадочного материала [3, 5-7, 11]. Так, разными авторами указывается высокая степень поражения сортов черешни (30-90%), едва вступившие в полное плодоношение сады становятся нерентабельными. В частности, в Крыму на черешне обнаружены вирусы некротической кольцевой пятнистости листьев (PNRSV), скручивания листьев черешни (CLRv), мозаики резухи (AMV), хлоротической кольцевой пятнистости листьев (CIRSV) [3-5, 11]. В связи с тем, что вирусы являются облигатными внутриклеточными патогенами растений, прямая борьба с ними практически невозможна. В последние годы исследования по оздоровлению растений интенсивно проводятся в Никитском ботаническом саду–Национальном научном центре [3, 7]. В наших исследованиях, несмотря на использование в опытах отобранных со здоровых растений эксплантов, при их культивировании применялись профилактические мероприятия от патогенов – вводились в питательную среду вироциды.

Получение в условиях *in vitro* растений является актуальным для видов с низкой способностью к побегообразованию и, в особенности, к ризогенезу. Из литературных источников известно, что черешня относится к трудноразмножаемым культурам. В процессе клонального микроразмножения отмечена низкая способность формирования микропобегов и развития корней [1, 8, 9, 15, 16, 18, 19]. Поэтому, несмотря на имеющиеся экспериментальные работы, многие вопросы культивирования черешни до сих пор остаются малоизученными. Цель данной работы – выявить морфогенетический

потенциал органов и тканей разных генотипов черешни в культуре *in vitro* и получить полноценные регенеранты.

Объекты и методы исследования

Объектом исследования являлись сорта черешни (Призерша, Рубиновая Ранняя, Сказка, Талисман и Анонс) разных сроков созревания плодов. При постановке опытов применяли как общеизвестные методы, так и разработанные в отделе биотехнологии и биохимии растений НБС–ННЦ [2, 8, 10]. Отбор черенков осуществлялся с внешне здоровых и предварительно протестированных на отсутствие вирусов деревьев в зимний (декабрь – февраль), весенний (март, апрель), летний (июнь, август) и осенний (ноябрь) периоды. Тестирование проводили с использованием растений-индикаторов: *Chenopodium foetidum* Schrad., *Nicotiana glutinosa* L., *Nicotiana tabacum* L. ('Samsun'), *Cucumis sativus* L. ('Delikatess') и методом иммуноферментного анализа (ИФА). Для освобождения растительного материала от экзогенной бактериальной и грибной инфекций в качестве стерилизующих агентов применяли растворы этанола и гипохлорита натрия. Для гарантии получения здоровых регенерантов в качестве профилактики в питательную среду вводили вирицид – рибовирин в концентрации 1-3 мг/л. Микропобеги культивировали на питательных средах Gamborg и Eveleigh (B5) [14], Murashige и Skoog (MS) [17] и в наших модификациях. Для индукции множественного побегообразования и ризогенеза в питательную среду вводили регуляторы роста: 6-бензиламинопуридин (БАП) в концентрациях 1,0-4,4 мкМ, N⁶-(2-изопентил)аденин (2ip) – 1,97-3,94 мкМ, гибберелловая кислота (ГК₃) – 0,15-2,89 мкМ, β-3-индолилмасляная кислота (ИМК) – 2,46-7,35 мкМ, α-нафтилуксусная кислота (НУК) – 5,37-10,74 мкМ, индолилуксусная кислота (ИУК) – 2,85-5,71 мкМ. Пробирки с микропобегами помещали в культуральную комнату с заданным режимом (интенсивность освещения 2,0-2,5 клк, 16 часовой фотопериод и температура 24±1°C). Статистическую обработку данных проводили на компьютере с использованием программного обеспечения Microsoft Office Excel 2003.

Результаты и обсуждение

В работе с культурой тканей и органов черешни использовали сортообразцы, свободные от вирусной инфекции, предварительно протестированные на отсутствие вирусов с применением методов травянистых растений-индикаторов. Для введения эксплантов в условия *in vitro* были отработаны режимы стерилизации с применением разных концентраций гипохлорита натрия и установлено, что почки сортов раннего и раннесреднего сроков созревания плодов (Призерша и Рубиновая Ранняя) наиболее чувствительны к действию стерилизующего агента. Менее повреждались почки сортов Талисман и Сказка.

Для успешной регенерации микропобегов важное значение имеют приемы изолирования первичных эксплантов. Показано, что активно развиваются экспланты всех изучаемых сортов черешни, у которых при введении в стерильные условия на питательные среды MS и B5 срез в базальной (нижней) части проведен под углом 40-45°. В этом случае отмечено появление зачатков листьев через 4 суток культивирования *in vitro*, в то время как микропобеги с ровным срезом в базальной части только увеличились в размерах (рис. 1).

Отличия в развитии сохраняются на протяжении последующих 1-2 пассажей: у микропобегов в опытном варианте листья сформированы и увеличились в размерах, в то время как в контрольном варианте (с ровным срезом в базальной части) листовые пластинки еще полностью не раскрыты (рис. 2).

Для снятия апикального доминирования и индукции множественного побегообразования были испытаны регуляторы роста БАП (1,0-4,4 мкМ), 2ip (1,97-3,94 мкМ) и ГК₃ (0,15-2,89 мкМ) в разных концентрациях и сочетаниях. Показано, что

экспланты черешни сортов Призерша, Рубиновая Ранняя и Анонс, введенные в условия *in vitro*, на питательной среде, дополненной 2ip и ГК₃, незначительно увеличиваются в размерах и темнеют, при этом на среде с добавлением БАП и ГК₃ у эксплантов формируются зеленые листья.

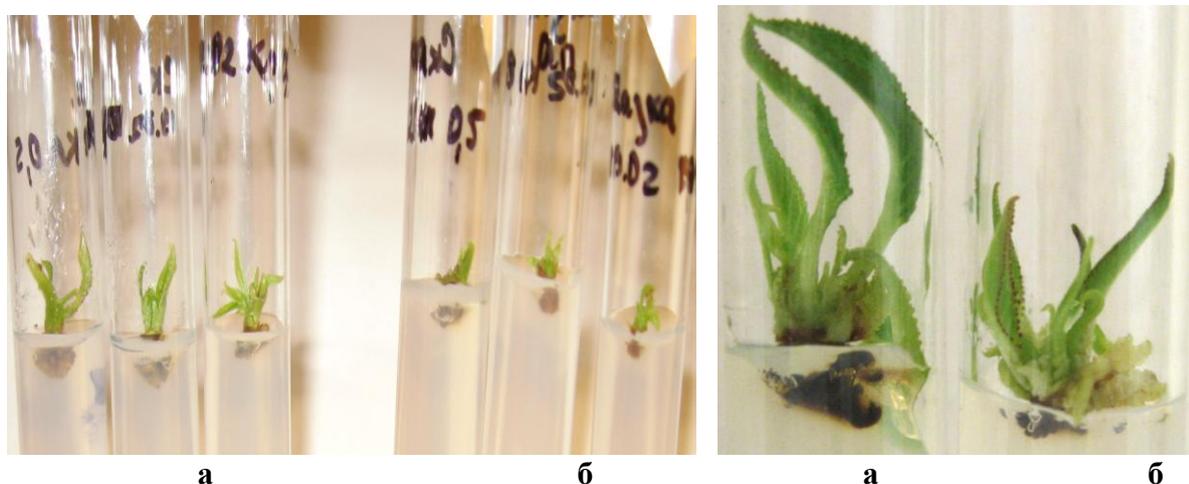


Рис. 1. Микропобеги черешни через 4 суток культивирования:

а – со срезом в базальной части под углом 40-45°; б – с ровным срезом в базальной части



Рис. 2. Микропобеги черешни через 40 суток культивирования:

а – со срезом в базальной части под углом 40-45°; б – с ровным срезом в базальной части

На этапе собственно микроразмножения высоким морфогенетическим потенциалом обладали микропобеги сортов среднего и позднесреднего сроков созревания плодов (Сказка и Талисман). Формирование конгломератов микропобегов отмечали через 25-30 суток культивирования на модифицированной питательной среде МС, дополненной 1,0-4,4 мкМ БАП и 0,44-2,88 мкМ ГК₃. Как показали исследования, коэффициент размножения микропобегов сортов Сказка, Талисман и Анонс (1:16-1:20) был выше, чем у сортов Призерша и Рубиновая Ранняя раннего и раннесреднего сроков созревания плодов (1:1-1:4) (рис. 3).

Заключительным этапом микроразмножения *in vitro* является укоренение полученных микропобегов. Для индукции ризогенеза были испытаны как агаризированные, так и жидкие питательные среды, которые являлись модификациями среды MS с уменьшенным вдвое содержанием макросолей, дополненные регуляторами роста ауксинового ряда.

Успешное укоренение микропобегов происходило на питательных средах, содержащих 2,85-5,7 мкМ ИУК и 5,37-10,7 мкМ НУК соответственно.

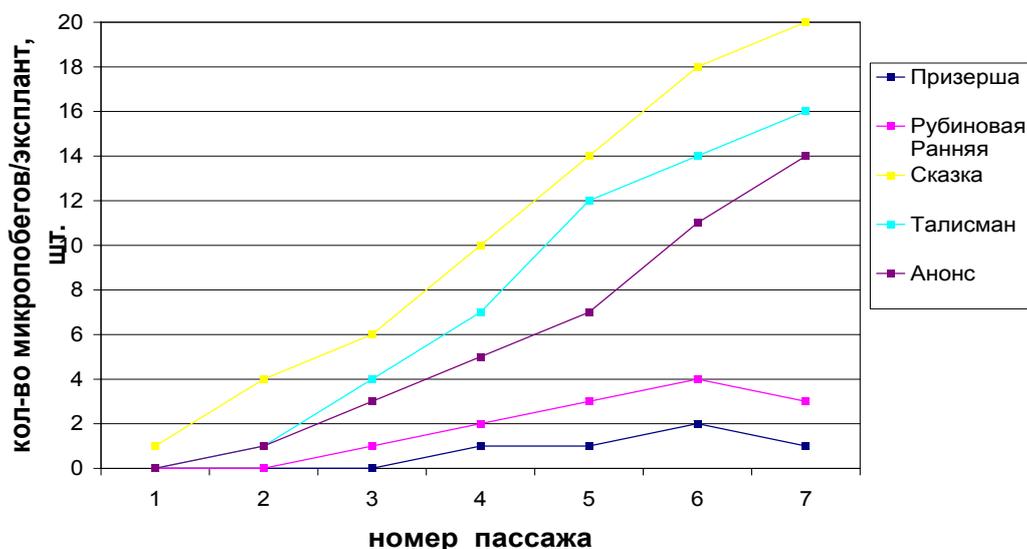


Рис. 3. Влияние генотипа на коэффициент размножения микропобегов черешни

Присутствие в среде ИМК ускоряло появление корней у микропобегов на 4-6 суток по сравнению с контрольным вариантом, однако полученные регенеранты не развивались в нестерильных условиях. Показано, что у микропобегов черешни сорта Сказка корни формировались как на жидкой, так и на агаризированной питательной среде. Однако на среде с агаром корни были многочисленными, в то время как на жидкой среде развилось не более 3-4 корней на микропобег (рис. 4).

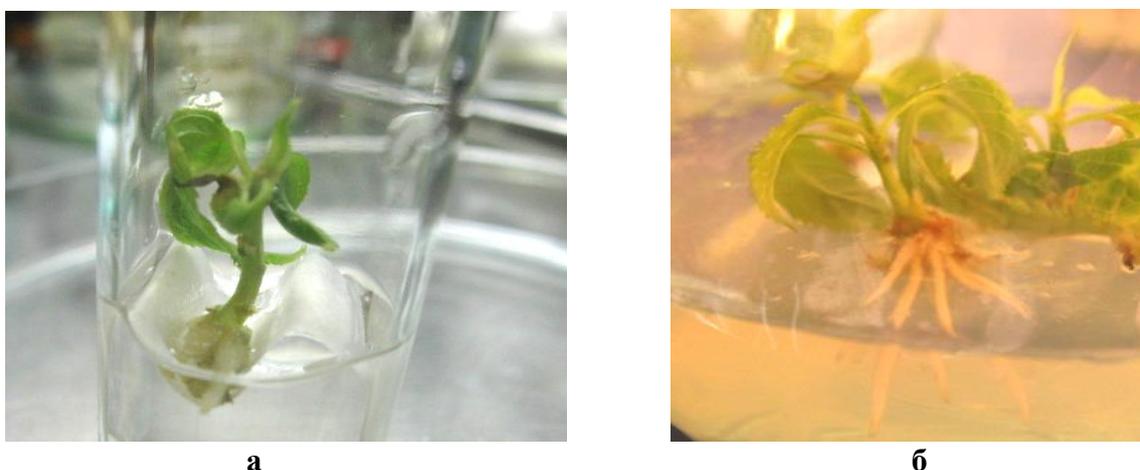


Рис. 4. Развитие корней у микропобегов черешни: а – на жидкой питательной среде; б – на агаризированной питательной среде

В ходе опытов наблюдали явление спонтанного ризогенеза у микропобегов сорта Сказка на питательной среде, не содержащей регуляторов роста ауксинового ряда. Из базальной части регенерантов развились тонкие корни (1-3 шт/микропобег), при этом на них формировались корни второго порядка. Подобное явление не характерно для древесных культур и некоторыми авторами объясняется как накопление эндогенных ауксинов в растительных тканях в результате их длительного культивирования (рис. 5).

Полученные регенеранты с развитыми корнями высаживали в стерильный субстрат (смесь торфа, перлита, песка в разных соотношениях) для адаптации в условия *in vivo*.

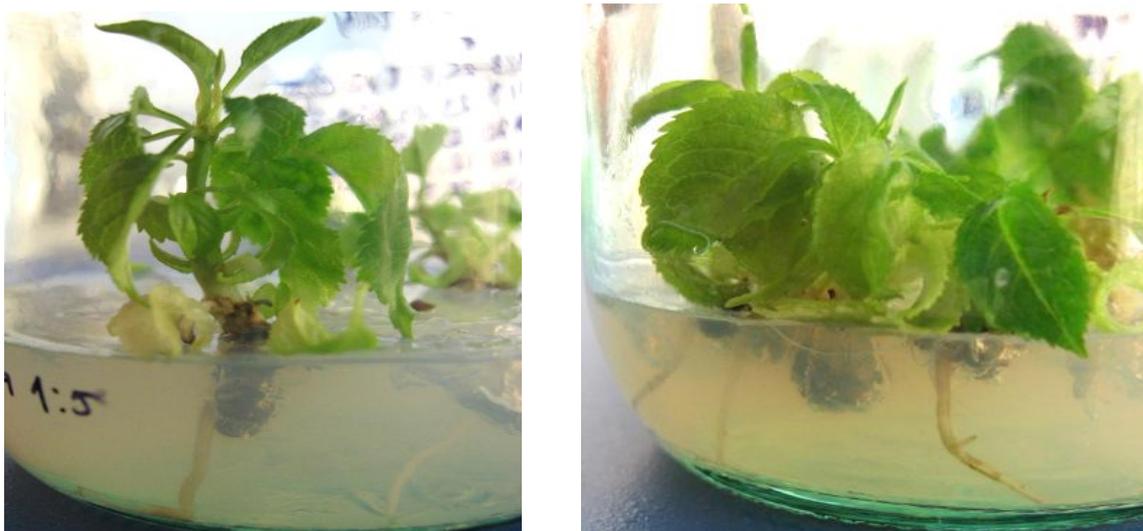


Рис. 5. Спонтанный ризогенез у микропобегов черешни

Выводы

Показано, что лучшее развитие и дифференциацию первичных эксплантов черешни наблюдали в том случае, когда срез в базальной части проведен под углом 40-45°С. Установлено, что микропобеги сортов среднего (Сказка) и среднепозднего (Талисман) сроков созревания плодов обладали более высоким морфогенетическим потенциалом, чем микропобеги сортов с ранним (Призерша), раннесредним (Рубиновая Ранняя) и поздним (Анонс) сроками созревания плодов. Определены регуляторы роста и их концентрации, повышающие эффективность микроразмножения и индукцию корнеобразования. Получены полноценные регенеранты сортов черешни.

Список литературы

1. Бленда А.В. Мікроклональне розмноження *in vitro* представників під родини *Prunoidae* // 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. Биотехнологические системы оздоровления косточковых плодовых культур и получение безвирусного посадочного материала / Митрофанова О.В., Лесникова-Седошенко Н.П., Чирков С.Н., Смыков А.В., Вожегова Р.А. // Фактори експериментальної еволюції організмів: Зб. наук. пр. / Укр. т-во генетиків і селекціонерів ім. М.І. Вавилова. – К.: Логос, 2008. – Т. 5. – 2008. – С. 410-415.
4. Вердеревская Т.Д., Маринеску В.Г. Вирусные и микоплазменные заболевания плодовых культур и винограда. – Кишинев: Штиинца, 1985. – 311 с.
5. Вирусы, поражающие косточковые плодовые культуры, и биотехнологические пути создания устойчивых форм / Митрофанова О.В., Лесникова-Седошенко Н.П., Митрофанова И.В., Кузнецова Н.В. // Біоресурси та віруси: V Між. конф., 10-13 вересня 2007. – К., 2007. – С. 182.
6. Высоцкий В.А. Культура изолированных тканей и органов плодовых растений, оздоровление и клональное микроразмножение // С.-х. биология. – 1983. – № 7. – С. 42-47.
7. Изучение вирусов и вирусных болезней косточковых плодовых культур на юге Украины и особенности оздоровления растений *in vitro* / 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. // Бюл. Никит. ботан. сада. – 2005. – Вып. 91 – С. 111-120.
8. Калинин Ф.Л., Кушнир Г.П., Сарнацкая В.В. Технология микроклонального размножения растений. – К.: Наукова думка, 1992. – 232 с.

9. Кузнецова Н.В. Влияние регуляторов роста на эффективность регенерации растений при клональном микроразмножении черешни (*Prunus avium* L.) // Бюл. Никит. ботан. сада. – 2008. – Вып. 97. – С. 52-55.
10. Методи біотехнології в селекції і розмноженні субтропічних і плодкових культур / Митрофанова О.В., Митрофанова І.В., Смыков А.В., Лесникова Н.П. // Труди Никит. ботан. сада. – 1999. – Т. 118. – С. 188-189.
11. Митрофанова О.В., Михайлов А.П., Чехов А.В. Біотехнологічні аспекти звільнення від вірусів і клонального микроразмноження деяких економічно важливих багаторічних культур // Труди Никит. ботан. сада – 1997. – Т. 119. – С. 7-34.
12. Митрофанова О.В., Митрофанова І.В. Состояние и перспективы біотехнологічних досліджень садових культур на юге України // Садівництво: Міжвідомчий тематичний науковий збірник. – 2000. – Вип. 50. – С. 269-281.
13. Фомина Е.Г., Жук Н.Г. Клональное микроразмножение районированных в Беларуси сортов *Cerasus* // Плодоводство. – 1994. – Т. 9. – С. 64-74.
14. Gamburg 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.
15. Gregor Osters, Luthar Zlata, Stampak Franci. The importance of the sterilization proceducing vigorous cherry plants (*Prunus* sp.) *in vitro* // Acta agriculturae slovenica. – 2004. – V. 83. – P. 45-51.
16. Kuznetsova N.V., Mitrofanova O.V Investigation of regeneration ability of four cultivars of sweet cherry (*Prunus avium* L.) in conditions *in vitro* // Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология: IX междунар. конф. Звенигород, 8-12 сентября 2008 г. – Звенигород, 2008. – С. 60.
17. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. – 1962. – V. 15, № 3. – P. 473-497.
18. Sauer Annemarie. *In vitro* – Vermehrung verschiedener genotypen von *Prunus avium* L. // Gartenbauwissenschaft. – 1983. – Bd. 48. – S. 124-127.
19. Snir Iona. *In vitro* micropropagation of sweet cherry cultivars // HortScience. – 1982. – V. 17, № 2. – P. 735-736.
20. Tukey H.B. Embryo abortion in early-ripening varieties of *Prunus avium* // Bot. Gaz. – 1933. – V. 94. – P. 433-468.

АЙВА ЗВИЧАЙНА (*CYDONIA OBLONGA* MILL.) В ЛІСОСТЕПУ УКРАЇНИ: ПІДСУМКИ ІНТРОДУКЦІЇ І СЕЛЕКЦІЇ

С.В. КЛИМЕНКО, доктор біологічних наук
Національний ботанічний сад ім. М.М. Гришка НАН України, Київ

Вступ

Айва звичайна (*Cydonia oblonga* Mill.) – визнана сировина для одержання желюючих продуктів, завдяки високому вмісту пектинових речовин – природних сорбентів [2, 13]. Плоди айви полівітамінні [18, 22]. Айва звичайна – основна карликова підщепа для груші [19].

Айву культивують більш ніж у 40 країнах світу, однак насадження її у більшості країн невеликі [26]. ФАО не публікує даних про виробництво плодів у країнах світу [1]. Питома вага айви в Україні серед зерняткових культур за площами насаджень складає 0,33%. Щодо валових зборів, то за 1995-2005 рр. айва в структурі садів зерняткових становить 0,42%. Урожайність айви в країні становить 100-250 ц/га залежно від кліматичних умов вирощування, сортових і агротехнічних властивостей. Зараз айву вирощують переважно у приватних господарствах. Вона займає близько 1000 га, або

76% від загальної площі в усіх категоріях господарств, де збирають 40420 т, що становить 87,5% від загальної кількості в господарствах [4]. Зазначимо, що за 20 років до розпаду СРСР (60-70 рр. минулого століття) площі під айвою в Україні збільшилися у 17 разів у порівнянні з існуючими і складала 2-4% від усіх плодових культур [5].

Донедавна айва культивувалася в основному у південних районах із середньорічною температурою від 10°C до 15°C і тривалим періодом вегетації – 240-245 днів.

В останні десятиріччя вирощування цієї культури стало можливим у північних регіонах України із середньорічною температурою від 7°C до 10°C. Завдяки роботам Національного ботанічного саду (НБС) НАН України виведено зимостійкі сорти [27]. Межа вирощування айви просунулася на 500 км північніше від ареалу її культивування.

Роботи з айвою звичайною – це реалізація ідей академіка М.Ф. Кашенка про можливість її культури на півночі України [3].

Актуальність досліджень обґрунтована наявністю в НБС генофонду культурних форм айви (близько 120 форм), що являє собою цінний вихідний матеріал для селекції за найрізноманітнішими ознаками.

Об'єкти та методи дослідження

Вихідним матеріалом для гібридизації і селекції є колекції айви довгастої у НБС, у яких зібрано генофонд з великою біологічною і генетичною різноманітністю. Використано методи аналітичної та синтетичної селекції. Застосовано традиційний, але такий, що виправдав себе, метод масового посіву насіння від вільного запилення з подальшим доббором, а також міжсортова гібридизація місцевих сортів, виведених протягом останніх 80 років і адаптованих до умов півночі України.

За основу досліджень біологічних особливостей росту і плодоношення було взято метод біологічного обстеження плодових рослин, розроблений П.Г. Шиттом [25]. Оцінку зимостійкості, посухостійкості, загального стану насаджень, облік урожаю, бракування і добір гібридних сіяньців проведено за методикою державного сорто випробування сільськогосподарських культур [11] та за програмою і методикою селекції плодових, ягідних і горіхоплідних культур [14]. Спостереження за фазами росту і розвитку рослин проведено за методикою фенологічних спостережень в ботанічних садах СРСР [12]. Морозостійкість надземної частини сортів айви селекції НБС досліджено анатоміко-мікроскопічним методом за методикою М.О. Соловйової [21].

Результати та обговорення

В основі досліджень – концепція адаптивної інтродукції, яка полягає в аналізі біологічних особливостей виду, необхідності виявлення і мобілізації потенційних можливостей окремих елементів генофонду. Досліджено ритми росту і розвитку, особливості запилення, репродуктивну здатність, зимостійкість, морфологічні, фізіологічні особливості, тривалість глибокого спокою, морфогенез генеративних органів у зв'язку із зимостійкістю, регенераційну здатність.

В умовах Лісостепу України проблема вирощування інтродукованих плодових рослин пов'язана з вирішенням складного питання зимостійкості. Айву звичайну за зимостійкістю порівнюють з персиком та абрикосом. Однак дослідження показали, що айва підмерзає лише в окремі роки. Рослини айви сортів НБС витримують зимове зниження температури – -28...-30°C з незначними пошкодженнями однорічного приросту; більш низькі температури (-37...-40°C) пошкоджують 2-4-річну деревину.

Агроєкологічний аналіз умов вирощування і зимових пошкоджень плодових рослин показав, що в Україні найчастіше плодові насадження страждають від коливання температур узимку. У другій половині січня у плодових рослин закінчується період органічного спокою. Якщо спостерігаються відлиги з температурою +5-+8°C і вище, то

рослини починають рости, втрачають стійкість до низьких температур при зворотних холодах (з некритичними температурами – -18...-20°C), сильно пошкоджуються, особливо генеративні бруньки у кісточкових, які вже майже сформовані. Квіткові бруньки айви зимують у стадії початку диференціації, завдяки чому вони, як правило, не пошкоджуються низькими температурами взимку. В критичні зими пошкодження генеративних бруньок складала від 5-10 до 50-60% [4]. Стійкість генеративних утворень до критично низьких температур узимку є найважливішим показником при культивуванні айви [17, 20, 24].

За стійкістю надземної частини айви до критично низьких температур виділено сорти Дарунок Онуку, Студентка, Марія, №18 Кашенка, Грушовидна Шайдарової. Показники стійкості сортів Академічна, Оранжева дещо нижчі.

Умови лісостепу і Полісся України цілком забезпечують досягання плодів айви. Початок досягання плодів у ранніх форм спостерігається через 115-127 днів після цвітіння, у середніх – через 130-136 днів, у пізніх – через 141-152 дні. Для досягання плодів айви потрібна сума ефективних температур 2100-2500°C [7]. Строки вегетації протягом 50 років змінювалися залежно від погодних умов, але в середньому стабільно цвітіння відбувається у першій-другій декадах травня, а досягання плодів – у першій-третьій декадах вересня. Вегетаційний період складає 190-220 днів. Найбільш продуктивний період у рослин – від 8-12 до 15-40 років. Більшість сортів айви самобезплідні. Частково самоплідними є сорти Академічна і Дарунок Онуку. Кращим запилювачем для сортів Марія, Дарунок Онуку, Студентка є сорт Академічна, для сортів №8 Кашенка, Оранжева, №18 Кашенка, форми 15-17-6 – сорт Студентка [8, 9].

Районований сортимент айви на півночі України представлено окремими місцевими формами та в основному сортами селекції НБС, перспективними для вирощування у північних районах України. П'ять з них у 1999 р. внесено до Реєстру сортів рослин України (табл.).

Таблиця

Характеристика сортів айви звичайної, внесених до Державного реєстру сортів рослин України (середнє за 2003-2008 рр.)

Сорт	Середня маса плоду, г	Середній урожай		Біохімічний склад плодів (на сиру речовину)			
		з 20-річного дерева, кг	товарний, ц/га	сума цукрів, %	сума пектинів, %	каротин, мг/%	вітамін С мг/%
Академічна	250,0	58,7	293,5	8,9	0,78	20,80	118,7
Дарунок Онуку	270,0	70,2	351,0	7,1	0,87	18,0	128,1
Марія	380,0	65,8	329,0	6,8	0,51	17,76	102,1
Студентка	265,0	66,7	333,5	8,8	0,86	30,25	115,5
№18 Кашенка	260,0	61,1	305,5	7,8	0,90	15,30	123,7

Сорти, створені в результаті синтетичної селекції:

Студентка – гібрид між формами айви 19-15 x 17-15, місцевими сіянцями, відселектованими серед сіянців III покоління від вільного запилення кримської айви.

Дарунок Онуку – гібрид між формами 2-12 x №8 Кашенка x 15-17-6.

Грушовидна Шайдарової – гібрид між сортами Болгарський 7 x Марія x Узбецька Ароматна. Підготовлений для передачі у сортовипробування.

Оранжева (4-8-7) – сіянець гібриду 15-17-6 від схрещування форм 19-15 x 17-6. Підготовлений для передачі у сортовипробування.

Сорти аналітичної селекції:

Академічна – сорт виділено із сіянців вільного запилення (1963 р.).

Марія – сорт виділено із сіянців вільного запилення, отриманих з насіння кримської айви.

№ 18 Кащенко – сорт виділено із сіянців вільного запилення, вирощених з насіння кримської айви.

Наші сорти – добре генетичне джерело для подальшої селекції у різних напрямках: на зимостійкість – сорти Академічна, Студентка, Київська ароматна; на зимостійкість і крупноплідність – Грушовидна Шайдарової, Дарунок Онуку, Марія; на раннє досягання – №18 Кащенко [6]. У айви немає генетичних обмежень для виведення зимостійких сортів з крупними плодами: гени, що відповідають за ознаки величини плодів, не зчеплені з генами зимостійкості [10].

Айва добре розмножується вегетативно – щепленням навесні і влітку (окуліруванням), живцями, відсадками, порістю [23, 28]. Кращий спосіб розмноження, за нашими даними, – щеплення вічком (окулірування): вихід стандартних саджанців при цьому становить 85-95%. Добре розмножується айва насінням, що важливо для північних регіонів. Сіянці айви більш зимостійкі і довговічні.

Отже, успішне культивування айви на півночі України зумовлене такими біологічними особливостями:

- щорічним плодоношенням (без періодичності), на відміну від інших зерняткових порід, що зумовлено закладанням генеративних бруньок на однорічному прирості. Кожен однорічний пагін у айви потенційно генеративний;

- високою зимостійкістю генеративних бруньок, що зумовлено низьким ступенем диференціації їх в осінньо-зимовий період;

- пізнім цвітінням, завдяки чому квітки не пошкоджуються весняними приморозками;

- високою регенераційною здатністю: пошкоджені рослини швидко відновлюються за один-два вегетаційних періоди. Здатність швидко регенерувати використовується для формування рослин у вигляді куща з кількома штаблами. Продуктивний період таких рослин становить 50-60 років, щорічний урожай – 80-100 кг з дерева.

Здатність айви адаптуватись у різних ґрунтово-кліматичних умовах свідчить про можливість вирощування її в усіх регіонах України. Наші сорти успішно ростуть і родять у північних областях України (Київській, Сумській, Чернігівській), у Білорусі, Латвії, Литві.

Висновки

1. Проведено монографічне узагальнення біоекологічних особливостей айви звичайної в лісостепу України, обґрунтовано концептуальні положення про розширення її культивованого ареалу, межа якого просунулася на 500 км північніше.

2. Показано, що при інтродукції айви звичайної на основі насінної репродукції на фоні дії природного та штучного доборів з покоління в покоління підвищувалася адаптація рослин та зимостійкість, відбувалися формотворчі процеси, розширювалася селекційна база.

3. Сорти селекції НБС витримали суворі зими 1962-1963, 1969-1970, 1978-1979, 1986-1987, 1988-1989, 2005-2006 рр. В критичні зими були зафіксовані різні пошкодження – від однорічних пагонів до двох- трирічної деревини; незважаючи на це, за всі 50 років спостережень відмічено щорічне плодоношення.

4. Колекція сортів та форм айви звичайної селекції НБС – важливий осередок найзимостійкіших сортів у Лісостепу України, що є базою для поширення її в північніші регіони.

5. Проведено значну селекційну роботу з використанням методів аналітичної та синтетичної селекції. До Державного реєстру сортів рослин України занесено 5 сортів айви звичайної селекції НБС [15]. Розроблено комплекс селекційних та агротехнічних заходів для успішного культивування айви [16].

Список літератури

1. Витковский В.Л. Плодовые растения мира. – СПб.: М.: Краснодар: Лань, 2003. – 590 с.
2. Горин Т.И. Айва. – М.: Госсельхозиздат, 1961. – 182 с.
3. Кашенко Н.Ф. Первые шаги моего акклиматизационного питомника в Киеве // Садоводство. – 1915. – Вып. 13. – С. 11-14.
4. Клименко С.В. Айва обыкновенная. – К.: Наук. думка, 1993. – 285 с.
5. Клименко С.В. Биозкологические основы интродукции *Cydonia oblonga* Mill. и *Cornus mas* L. на севере Украины // Интродукция и акклиматизация растений. – 1986. – Вып. 6. – С. 23-28.
6. Клименко С.В. Айва. Кизил. – Сорта // Атлас перспективных сортов плодовых и ягодных культур Украины / Под ред. В.П. Копаня. – К., 1999. – С. 174-181.
7. Клименко С.В. Формирование коллекционных и селекционных фондов нетрадиционных плодовых растений в Национальном ботаническом саду НАН Украины (1960–2005 гг.) // Матер. міжнар. наук. конф., присвяч. 70-річчю Нац. ботан. саду ім. М.М. Гришка НАН України 19–21 вересня 2005 р. – К., 2005. – С. 38-41.
8. Клименко С.В. Теоретические и практические аспекты аналитической и синтетической селекции нетрадиционных плодовых растений в свете учения Н.И. Вавилова // Интродукція рослин на початку ХХІ століття: досягнення і перспективи. – К.: Фітосоціоцентр, 2007. – С. 31-41.
9. Клименко С.В. Интродукция и селекция нетрадиционных плодовых растений в Украине // Экологические проблемы садоводства и интродукции растений: Сб. науч. трудов. – Ялта, 2008. – Т. 130. – С. 83-95.
10. Масюкова О.В. Научные основы сортоизучения и селекции айвы. – Кишинев: Картя Молдовеняскэ, 1975. – 232 с.
11. Методика государственного сортоиспытания сельскохозяйственных культур. – М.: Сельхозгиз, 1961. – 95 с.
12. Методика фенологических наблюдений в ботанических садах СССР. – М.: Патент, 1975. – 27 с.
13. Петрова В.П., Клименко С.В. Динамика полифенолов в плодах айвы // Биологически активные вещества плодов и ягод. – 1976. – Вып. 5. – С. 122-127.
14. Программа и методика селекции плодовых, ягодных и орехоплодных культур. – Орел: Изд-во ВНИИСПК, 1995. – 503 с.
15. Реєстр сортів рослин України на 2008 р. – К.: Алефа, 2008. – 139 с.
16. Рекомендации по закладке насаждений и выращиванию актинидии, лимонника, облепихи, айвы и кизила. – К.: Главплодвинпром, 1982. – 38 с.
17. Ряднова И.М. Сроки закладки и зимостойкость плодовых почек // Физиология растений. – 1958. – Т. 5, Вып. 3. – С. 18-26.
18. Сапожникова Е.В. Пектиновые вещества плодов. – М.: Наука, 1965. – 182 с.
19. Симиренко Л.П. Помология. Айва. – К.: Урожай, 1973. – Т. 3. – С. 322-323.
20. Смыков В.К. Изучение зимостойкости в условиях Мичуринска // Докл. Всесоюз. акад. с-х. наук им. Ленина. – 1952. – Вып. 9. – С. 37-42.
21. Соловьева М.А. Методика визначення морозостійкості плодовых дерев. – К.: Урожай, 1966. – 22 с.
22. Фрайман И.А. Айва – ценное сырье для консервной промышленности // Садовод., виноград. и виноделие Молдавии. – 1976. – № 6. – С. 61.

23. Хроликова А.Х. Методические указания по культуре айвы в Крыму. – Ялта, 1978. – 17 с.
24. Хроликова А.Х. Повреждения почек айвы морозом и цветков весенними заморозками // Бюл. ГНБС. – 1986. – Вып. 59. – С. 38-41.
25. Шитт П.Г. Учение о росте и развитии плодовых и ягодных растений. – М.: Сельхозгиз, 1958. – 447 с.
26. Adler Michal. Quince (*Cydonia oblonga* Mill.) and its growing and economic descriptions // Fruit growing and viticulture II. Floriculture and medicinal plants and other general themes: Proceedings of 9TH International Conference of Horticulture. Czech Republic, Lednice, 3-6 September 2001 – Brno: Mendel University, 2001. – V. 1. – P. 3-7.
27. Klimenko S. Nowe odmiany roslin sadowniczych na Ukraine // IX Ogólnopolskie Spotkanie Sadowników w Grojcu: Szanse polskich sadowników przed wejściem do Unii Europejskiej, 21–22 stycznia 2004. – Drukarnia: PPHU "Graf-Sad", 2004. – S. 155–160.
28. Friedrich G. Qutte (*Cydonia oblonga* Mill.) // Taschenbuch der Feld und Gartenfer. – Leipzig – Iena, 1960. – 180 p.

ПЕРСПЕКТИВНЫЙ ИСХОДНЫЙ МАТЕРИАЛ И ХАРАКТЕР НАСЛЕДОВАНИЯ УСТОЙЧИВОСТИ К ПАРШЕ В СЕЛЕКЦИИ ГРУШИ

В.Л. БАСКАКОВА

Никитский ботанический сад – Национальный научный центр

Введение

Одной из наиболее вредоносных болезней груши обыкновенной (*Pyrus communis* L.) является парша (возб. – гриб *Venturia pirina* Aderh. с конидиальной стадией – *Fusicladium pirinum* Fckl). Особенно широкое распространение она получила в последние годы в связи со значительными климатическими изменениями, обусловленными природным, антропогенным и сельскохозяйственным загрязнением внешней среды. Стали поражаться сорта, которые 20-30 лет назад считались сравнительно устойчивыми.

Положительный эффект дают применяемые в настоящее время химические меры борьбы, но это приводит к ухудшению экологической среды и удорожанию получаемой продукции. Кроме того, возникает и проблема пищевой безопасности. Главным моментом в решении данного вопроса является использование устойчивых сортов. Создание таковых – одно из приоритетных направлений в селекции груши.

Большую работу в этом плане проводят во многих научно-исследовательских учреждениях в странах дальнего и ближнего зарубежья [1-4, 10, 11]. Но степень поражения болезнью одних и тех же сортов во многом зависит от климатических условий того или иного региона выращивания культуры.

Цель исследования – выявление источников высокой устойчивости к парше среди сортов и форм груши и изучение характера наследования данного признака в гибридном потомстве в условиях степной зоны Крыма.

Объекты и методы исследования

Наблюдения проводили в 1990-2004 гг. Объектами исследования служили 340 интродуцированных и созданных в Никитском ботаническом саду сортов и форм груши и селекционный фонд в количестве 1950 межсортовых гибридов. Деревья в коллекционном саду привиты на клоновом подвое айве А и размещены в саду по схеме 4 х 2 м на черноземных почвах. Из-за нерегулярной химической защиты инфекционный фон насаждений приближался к естественному. Оценка сортов, форм и гибридов груши проводили полевым методом в соответствии с общепринятыми методиками [5-8].

Результаты и обсуждение

Отдельные годы в степной зоне Крыма все чаще характеризуются повышенной влажностью, которая во взаимодействии с температурным режимом создает благоприятные условия для развития парши. Так, в первые десять лет наблюдений (1990-1999) заболевание отмечали трижды: в 1991, 1995 и 1997 гг. Зимы этих лет были достаточно теплыми, весной и в начале лета часто шли дожди. За апрель-июнь 1991 г. выпало 233 мм осадков при норме 120 мм. За те же месяцы 1995 и 1997 гг. – 180 и 227 мм соответственно. Кроме того, росы, туманы также способствовали высокой влагообеспеченности в период, когда происходит развитие возбудителя парши и поражение листьев и плодов.

В течение 2000-2004 гг. заболевание груши паршой отмечено дважды: в 2001 и 2003 гг., при этом 2001 год оказался самым эпифитотийным. В апреле-мае выпало полторы, в июне – две месячные нормы осадков. За три месяца было 40 дней с дождями, 68 – с росами и туманами. В совокупности с температурным режимом сложились самые благоприятные условия для развития парши. Вторая половина весны и начало лета 2003 г. были менее дождливыми (сумма осадков за апрель-июнь составила 67 мм), но в то же время отмечен 61 день с продолжительными росами и туманами (в мае – почти каждый день).

Наблюдения за степенью распространения парши в указанные выше годы показали, что сорта и формы груши характеризуются большой пестротой: от высокой устойчивости до сильной восприимчивости. В значительной степени устойчивость зависит от происхождения сортов. В числе самых восприимчивых к парше преобладали сорта из Средней Азии. Сухой и жаркий климат не способствует развитию грибных заболеваний, в результате чего у сортов, созданных в этой зоне, иммунитет не вырабатывается, поэтому, попадая в другие условия, благоприятные для инфекции, они могут поражаться в сильной степени. Исключением в этой группе является сорт Киргизская Зимняя, который в годы максимального развития болезни имел поражение на 2 балла, в остальные – не поражен.

Слабая устойчивость к парше отмечена и у большинства высококачественных западноевропейских сортов. В годы, благоприятные для развития болезни, они поражаются в средней и сильной степени. В то же время за период исследований не отмечалось признаков болезни ни на плодах, ни на листьях у таких сортов, как Бере Клержо, Вильямс, Триумф Жодуань. Высокой устойчивостью к парше характеризовались также сорта Деканка Буше и Меллина, у которых поражение не превышало 1 балла. Повышенная устойчивость отмечена у сортов Верна, Доктор Жюль Гюйо, Мадам Фавр, Пасс Крассан, Порпората и Фрагранте.

Североамериканские сорта поражаются паршой в годы максимального развития болезни не более, чем на 2-3 балла. Высокоустойчивыми из них являются Дево, Колет и Фертилити Тетраплоид. Сорта Уиллард и Фелпс в каталогах описаны как восприимчивые к данному заболеванию, в условиях степной зоны они поражаются в слабой степени (не более, чем на 2 балла).

Высокоустойчивые сорта выявлены в наибольшем количестве среди китайских и кавказских. Но наряду с этим преимуществом они обладают целым рядом отрицательных качеств и свойств. Те и другие характеризуются слабой зимостойкостью, слабой устойчивостью цветков к весенним заморозкам, так как цветут в очень ранние сроки. По качеству плодов они значительно уступают европейским. Для селекции можно выделить высокоустойчивый к парше сорт Ал-Янаг, который в меньшей степени повреждается низкими зимними температурами, характеризуется высокой урожайностью, продолжительной лежкостью плодов, обладающих сочной сладкой мякотью, высоким содержанием сухих веществ, сахаров и вполне пригодных для употребления в свежем виде и изготовления высококачественных продуктов переработки.

Заслуживает внимания восточноевропейская группа, в которой выделены сорта с высокой устойчивостью к парше. Не более, чем на 1 балл в годы эпифитотий поражались такие сорта и формы, как Есенинская, Орловская Красавица, Тютчевская (ВНИИСПК, г. Орел), Бере Русская, Мраморная (Россошанская опытная станция). Среди сортов, выведенных в Молдове, отличились сорта и формы: Выставочная, Кирилла, Ноябрьская, Сокровище, Триоль Поздняя, Устойчивая; формы: 2-7-14, 3-2-101, 4-15-52. Стабильно высокая устойчивость во все годы наблюдений отмечена у сортов и форм украинской селекции: Буковинка, Вродлива, Виктория, Джанкойская Поздняя, Краснокутская Сладкая, Надежда Степи, Смеричка, Степная Красавица, Тающая, ЕП-32, ЕП-35. Наряду с высокой устойчивостью к парше перечисленные сорта обладают достаточной для условий южной зоны Украины зимостойкостью, хорошей продуктивностью и высококачественными плодами, что имеет большое значение при использовании их в селекционных программах.

Изучение характера наследования устойчивости сортов груши к парше проводили в 2001 и 2003 гг. в потомстве от межсортовой гибридизации в 52 гибридных семьях. В скрещивании участвовали сорта разной степени поражаемости. Полная полевая устойчивость не отмечена ни у одного гибридного сеянца. Наибольшее количество сеянцев со слабой и очень слабой степенью повреждения получено в семьях с устойчивыми и высокоустойчивыми сортами: Надежда Степи x Бере Боск, Надежда Степи x Вильямс, Сокровище x Бере Боск, Ноябрьская x Бере Боск (табл.).

Таблица

Распределение сеянцев груши по устойчивости к парше

Комбинация скрещивания сортов	Родительские сорта		Всего сеянцев	% сеянцев с баллом поражения		
	♀	♂		1-2	3	4-5
1	2	3	4	5	6	7
Фелпс x Мервей Рибе	У	С	138	20,1	42,1	37,8
-//- x Пасс Крассан	У	У	32	39,0	47,5	13,5
-//- x Форель Зимняя	У	М	78	28,4	31,6	40,0
Тающая Рождественская x Жанна Д'Арк	М	М	29	9,2	21,4	69,4
-//- x Мервей Рибе	М	С	122	11,9	27,6	60,5
-//- x Пасс Крассан	М	У	67	31,5	46,0	22,5
-//- x Меллина	М	У	54	26,7	30,4	42,9
Меллина x Мервей Рибе	У	С	62	33,0	30,2	36,8
-//- x Жанна Д'Арк	У	М	37	29,7	37,3	33,0
-//- x Пасс Крассан	У	У	24	40,2	30,5	29,3
Форель Зимняя x Пасс Крассан	М	У	29	36,8	30,8	32,4
-//- x Фелпс	М	У	33	27,7	29,8	42,5
Пасс Крассан x Мервей Рибе	У	С	24	38,0	34,1	27,9
-//- x Тающая Рождественская	У	М	59	24,4	32,5	43,1

Продолжение таблицы

1	2	3	4	5	6	7
Ноябрьская х Бере Боск	В	В	35	59,6	32,0	8,4
-/- х Бере Арданпон	В	М	41	26,8	39,2	34,0
-/- х Отечественная	В	У	27	32,2	35,8	32,0
Надежда Степи х Бере Боск	В	В	38	62,3	25,5	12,2
-/- х Вильямс	В	У	34	47,4	37,9	14,7
Сокровище х Бере Боск	У	В	31	55,8	21,9	22,3
-/- х Ноябрьская	У	В	26	41,2	31,5	27,3
-/- х Отечественная	У	У	27	34,8	31,0	34,2
Киргизская Зимняя х Джанкойская Поздняя	У	В	78	39,2	36,3	24,5
Киргизская Зимняя х Выставочная	У	В	56	33,3	29,4	37,3
Деканка Молдавская х Васса	М	У	28	14,2	29,8	56,0
-/- х Бере Арданпон	М	М	22	6,9	26,4	66,7

Условные обозначения: В – высокая устойчивость к парше, У – сорт устойчив к парше, С – сорт среднеустойчив, М – сорт малоустойчив

Выводы

В результате изучения сортового фонда груши в условиях степной зоны Крыма выделено более 30 сортов и форм, представляющих интерес в качестве исходных форм для селекции на устойчивость к парше.

Сорта Бере Боск, Вильямс, Надежда Степи, Ноябрьская, Пасс Крассан и Сокровище передают потомству признаки высокой и повышенной устойчивости к парше. В семьях от скрещивания двух неустойчивых сортов также отобраны сеянцы со слабой степенью поражения, что свидетельствует о значительных перспективах селекции на устойчивость к парше.

Список литературы

1. Казакова Л.М. Поражаемость гибридов груши паршой в зависимости от исходных сортов: Сб. научных тр. ВНИИС. – Мичуринск, 1980. – № 31. – С. 64-66.
2. Коновалова Н.А., Мясик М.Г. Устойчивость к парше гибридного потомства груши, полученного с использованием сортов народной селекции // Плодоводство: Межведомственный тематический сборник. – Минск: Ураджай, 1989. – Вып. 7. – С. 37-39.
3. Красова Н.Г. Сортовой фонд груши и его использование в селекции // Проблемы оценки исходного материала и подбора родительских пар в селекции плодовых растений: XV Мичуринские чтения, 26-27 октября 1995 г. – Мичуринск, 1996. – С. 94-97.
4. Красуля Т.И., Толстолик Л.Н. Перспективы использования иммунных и устойчивых к болезням сортов яблони и груши в промышленных насаждениях юга степи Украины // Современное плодоводство: состояние и перспективы развития: Межд. науч. конференция, посвященная 80-летию основания Института плодоводства НАН Беларуси // Плодоводство. – Самохваловичи, 2005. – Т. 17, Ч. 2. – С. 124-126.
5. Методика выявления и учета болезней плодовых и ягодных культур. – М.: Колос, 1971. – 23 с.
6. Программа и методика сортоизучения плодовых, ягодных и орехоплодных культур / Под ред. Е.Н. Седова, Т.П. Огольцовой. – Орел: Изд. ВНИИСПК, 1999. – 608 с.
7. Программа и методика селекции плодовых, ягодных и орехоплодных культур / Под ред. Е.Н. Седова. – Орел: ВНИИСПК, 1995. – 503 с.
8. Программа и методика сортоизучения плодовых, ягодных и орехоплодных культур / Под ред. Г.А. Лобанова. – Мичуринск: ВНИИС, 1973. – 495 с.

9. Vondracek J. Breeding of pear cultivars late consumption maturity // Fruit Breeding Hradec Kralove. – 1987. – P. 247-255.

10. Rosati R. et al. Study of some characters in different pear progenies // Proc. Eucarpia Symp. Tree Fruit Breed. – 1979. – P. 83-90.

THE EFFECT OF THE MINERAL CONTENT OF CULTURE MEDIUM AND THE TYPE OF AUXIN ON *IN VITRO* ROOTING OF MICROPROPAGATED PEAR PLANTS

KRASTINA KORNOVA, *Dr.*
Fruit Growing Institute, Plovdiv, Bulgaria

Introduction

In the last years the areas planted with pear trees in Bulgaria have been significantly reducing and they were decreased to the minimum. The reasons were the damages caused by Fire Blight disease (*Erwinia amylovora*) and the inefficient control of the attacks of pear psylla (*Psylla pyri*), as well as the difficult production of grafted planting material. The latter requires grafting on interstocks due to the later incompatibility between some major pear cultivars and the quince rootstock, which makes the production cycle 3-year long and the trees obtained become more expensive. An alternative for avoiding those disadvantages is offered by the *in vitro* method. It provides the impetus for accelerated production of huge amounts of top quality, authentic, virus-free certified planting material.

Micropropagation of the pear crop, including planting material for industrial scale production, was an object of study in a number of investigations [2-4]. The rooting stage of the micropropagated plants required a change in the content of the mineral elements in the nutrient substrate and the inclusion of growth regulators of the group of the auxins. The results in that aspect varied significantly depending on the propagated cultivars and rootstocks. Successful rooting of the cultivars Kaiser, Max Red Bartlett and Williams was achieved when the nutrient medium was supplemented with 1 mg/l IBA [8]. During micropropagation of the frost-resistant pear cultivar Gola, Dwivedi and Bist [5] established very good rooting when the microplants were grown in ½ MS nutrient medium Murasige and Scoog [9] with 1,0–2,0 mg/l of IBA. In that relation, when propagating three pear rootstocks of OH series, Bahri-Sahloul et al. [1] found out that the best rhizogenesis was achieved when adding IBA at a concentration of 10 µM. However, in the studies of Yeo and Red [11], over 80 % of rooting was achieved in the rootstock OH x F230, irrespective of whether IBA or NAA was used, while in OPR 260 the highest percentage of rooting (42,9%) was obtained when using 10 µM NAA. Nadosy [10], established the best rooting of OHF rootstocks, BA-29 quince rootstock, pear seedlings and pear cultivars Clapp's Favourite and Bartlett in the presence of higher concentrations of IBA. In our experiments with 5 *in vitro* propagated pear cultivars [7], the most significant effect on root formation was established in the presence of 2,5-3,0 mg/l IAA added to MS nutrient medium with ¼ strength macrosalts.

A typical characteristic in the process of *in vitro* rooting of the pear crop is the callus formation at the shoot base of the microplants, which is an undesirable factor [3, 6]. Due to that it is necessary to find out the proper auxin, which induces high rhizogenesis and does not provoke callus formation.

The major aim of the study was to establish the effect of the mineral composition of the nutrient substrate, the type of the participating auxin and its concentration on *in vitro* rooting of micropropagated pear plants, avoiding the induction of callus structures at the shoot base.

Objects and methods of investigation

The study was carried out in the Production Laboratory for *in vitro* propagation at the Fruit Growing Institute – Plovdiv with micropropagated plants of the pear cultivar Packham's Triumph. The investigations were directed to two aspects: the effect of the mineral composition in the nutrient medium and the type of the auxin used. In relation to the first aspect two nutrient media were tested – MS modification with a decreased content of ammonium nitrate and added calcium nitrate (medium A) and MS basal medium (medium B). Both media contained a quarter-strength macroelements, MS microelements, Thiamin hydrochloride 0,4 mg/l of the vitamins and FeNaEDTA 36,7 mg/l. IBA and IAA auxins were studied for induction of rhisogenesis in three increasing concentrations – 0,5 mg/l, 1,0 mg/l and 1,5 mg/l, grouped in 12 variants of nutrient media (Table).

The following indices were reported: percentage of rooting, mean number of roots formed; mean length of the rootlets (mm), vital status of the rooted microplants.

The plants were grown in a chamber at a temperature of 24°C, light intensity 3000 Lux provided by white light luminescent lamps and a photoperiod of 16/8 h, day/night.

Mathematical data processing was done by the ANOVA method.

Table

Experimental design

Mineral composition	IBA			IAA		
	mg/l					
	0,5	1	1,5	0,5	1	1,5
Medium A	V1	V2	V3	V7	V8	V9
Medium B	V4	V5	V6	V10	V11	V12

Results and discussion

Referring to the influence of the **mineral elements** in the nutrient medium, a better effect on root formation was observed when growing the microplants on the basal MS medium (medium B) regardless of the type of the auxin added (Fig. 1). The increase of **IBA** in the MS medium with modified mineral elements (medium A) led to an increase of the percentage of rooting from 50% at 0,5 mg/l to 70% at 1,5 mg/l but at the same time callus tissue was formed at the stem base, which is an undesired consequence. The participation of the same auxin in the medium with mineral substances MS (medium B) resulted in better rooting – 95% – 100% (Fig. 1 a) but it induced stronger callus formation.

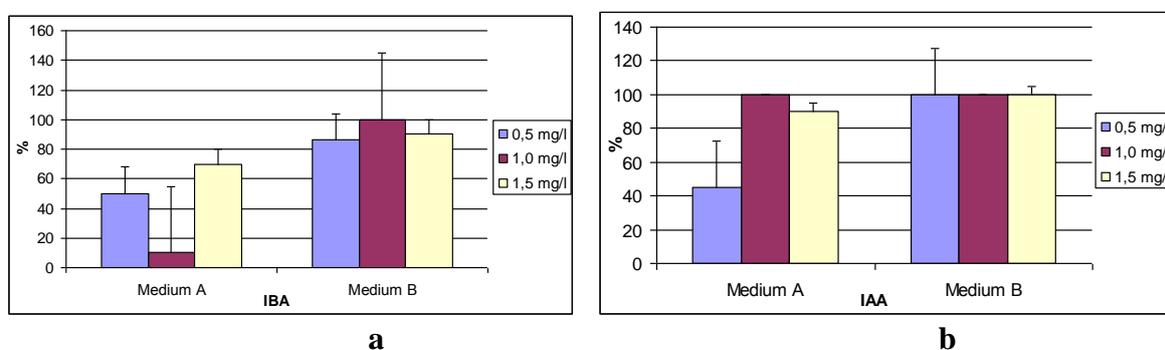


Fig. 1. Percentage of rooting of micropropagated plants, Packham's Triumph cultivar, grown in nutrient media with modified mineral content MS (medium A) and MS only (medium B) at increasing concentrations (0,5-1,5 mg/l) of IBA (a) and IAA (b). The bars show the standard error

Callus structure was not observed only when growing the microplants in the variants of nutrient media with **IAA**. Even more, regardless of the variation of mineral salts, the participation of IAA in both studied media contributed to achieving a very high percentage of rooting, which was within 90% – 100% (Fig. 1 b).

Observations on the **formation of primary roots** at the stem base of the microplants showed once again the better effect of the basal MS medium (Fig. 2). However, the effect of the separate auxins and their concentrations was not uniform. The increase of IBA to concentrations 0,5-1,5 mg/l in medium B caused an increased rootlet induction – 4,8-6,1. (Fig. 2-a). With the participation of IAA in the nutrient medium, the mean number of roots per plant in medium A was quite low – 2 to 3, while in medium B the biggest number of rootlets (6,3) was formed at 1,0 mg/l concentration of auxin (Fig. 2-b).

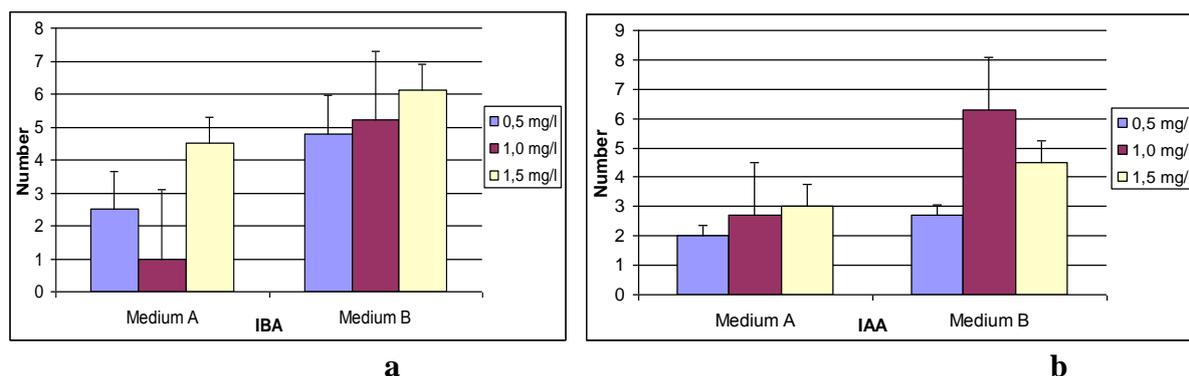


Fig. 2. Mean number of roots per plant, Packham's Triumph cultivar, grown on nutrient media with modified mineral content MS (medium A) and MS only (medium B) at increasing concentrations (0,5 - 1,5 mg/l) of IBA (a) and IAA (b). The bars show the standard error

Analogous results were obtained regarding the mean **length of the formed rootlets**. Again the better development of the roots in general was established when growing the microplants in MS medium without modification of the macroelements (Fig. 3 – medium B). The studied auxins also exerted different effects. When IBA was added to the nutrient medium, the biggest root length was established at the concentration of 0,5 mg/l – 20,8 mm. Increasing the auxin concentration to 1,5 mg/l led to shorter rootlets formed – 6,6 mm. The participation of IAA, regardless of the variation in concentration, induced the formation of longer rootlets – 23,7-25,0 mm.

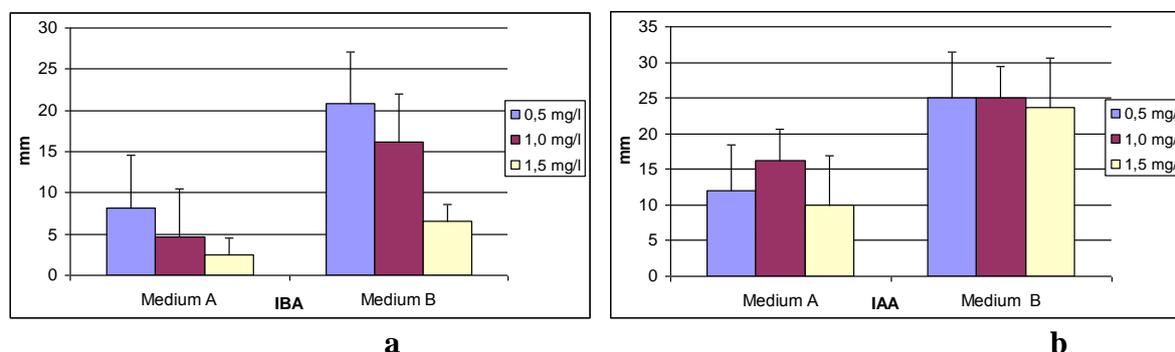


Fig. 3. Average length of the rootlets per plant, Packham's Triumph cultivar, grown on nutrient media with modified mineral content MS (medium A) and MS only (medium B) at increasing concentrations (0,5-1,5 mg/l) of IBA (a) and IAA (b). The bars show the standard error

The **vital status** of the microplants grown in the two nutrient media was good and it

showed an actively growing tip and fresh dark green leaves. The tendency towards a better development of the plants, expressed in a bigger stem height, was established in those grown with the participation of IAA.

The rooted plants in the tested media were successfully planted and adapted to non-sterile *ex vitro* conditions.

Conclusions

MS nutrient medium with ¼-strength macroelements without decreasing the content of the ammonium nitrate and additional inclusion of calcium nitrate, created better conditions for *in vitro* rooting of micropropagated plants of the pear cultivar Packham's Triumph.

The increase of IBA concentration in the nutrient medium led to a higher rooting percentage but at the same time it was accompanied by an increased induction of callus tissue at the stem base.

A high percentage of rooting without callus structure was established when growing the microplants in the variants with the presence of IAA (0,5-1,5 mg/l).

The mean number of rootlets formed per plant and their length, respectively, showed higher values in the MS nutrient medium with mineral elements without modifying them. In the presence of IBA in the medium, the biggest number of rootlets was established at a concentration of 1,5 mg/l (6,1), while in the presence of IAA that characteristic had the highest value at a concentration of 1,0 mg/l.

The participation of the separate auxins exerted an effect on the length of the rootlets formed. The increase of IBA caused the formation of shorter rootlets, while the increase of IAA did not have an effect on the root length and the rootlets induced were of optimal values – 23,7-25,00 mm.

The best development of the microplants concerning their vital status, stem height, number and length of the induced rootlets, can be obtained when growing them in MS medium containing ¼-strength macroelements with IAA.

The presented results gave the grounds to recommend the use of the basal MS nutrient medium at the stage of rooting pear cultivars – a stage of the *in vitro* propagation technological process.

References

1. Micropropagation of three *Pyrus* rootstocks / Bahri-Sahloul, R., Ammar S., Msallem A., Mtar R. // *Advances in Horticultural Science* (Firenze, Italy). – 2005. – V. 19 (1). – P. 21-28.
2. Baviera J., Garsia J., Ibarra M. Commercial *in vitro* micropropagation of pear cv. Conference // *Acta Horticulturae*. – 1989. – N 256. – P. 63-68.
3. A new method for rapid *in vitro* propagation of apple and pear / Bommineni V., Mathews H., Samuel S., Kramer M., Wagner D. // *Hort. Science*. – 2001. – V. 36 (6). – P. 1102-1106.
4. Innovative micropropagation of temperate fruit trees: the case of pear / Damiano C., Caboni E., Frattarelli A., Giorgioni M., Liberali M., Lauri P., D'Angeli S., Cassells A., Doyle B., Curry R. // *Acta Horticulturae*. – 2000. – N 530. – P. 181-185.
5. Dwivedi S., Bist L. *In vitro* propagation of low-chill pear cv. Gola // *Indian Journal of Horticulture*. – 1999. – V. 56, N 3. – P. 189-193.
6. Hutchinson J., Zimmerman R. Tissue culture of temperate fruit and nut trees // *Horticult. Review*. – 1987. – V. 9. – P. 273-349.
7. Kornova K., Popov S. Factors affecting the *in vitro* rooting of pear cultivars // *Journal of Mountain Agriculture on the Balkans*. – 2005. – V. 8, N 6. – P. 915-927.
8. *In vitro* propagation of pear cultivars / Moretti C., Scozzoli A., Pasini D., Paganelli F. // *Acta Horticulturae*. – 1992. – N 300. – P. 115-118.
9. Murashige T., Scoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco

tissue culture // *Physiology Plant.* – 1962. – V. 15. – P. 473-497.

10. Nadosy F. Micropropagation of pear rootstocks // *Horticultural Science Kerteszeti-Tudomany (Hungary).* – 1997. – V. 29 (2). – P. 17-21.

11. Yeo D., Reed B. Micropropagation of three *Pyrus* rootstocks // *American Society for Horticultural Science.* – 1995. – V. 30 (3) – P. 620-623.

ХЕМОСЕЛЕКЦИЯ ВИНОГРАДА НА НАЛИЧИЕ АРОМАТА

С.В. ЛЕВЧЕНКО¹, кандидат сельскохозяйственный наук; В.А. ВОЛЫНКИН¹, доктор сельскохозяйственный наук; Б.А. ВИНОГРАДОВ¹, кандидат технических наук; Н.В. ТОЛКАЧЕВА², кандидат химических наук

¹ Национальный институт винограда и вина «Магарач»

² Никитский ботанический сад – Национальный научный центр

Введение

В ягодах винограда, а также в плодах других культур, имеется особая группа веществ, называемых эфирными маслами. Эти вещества обуславливают аромат и участвуют в образовании букета готовой продукции переработки, в частности, вина. В связи с этим представляют большую ценность для виноделия и могут являться критерием селекционного отбора.

В настоящее время из эфирных масел различных сортов винограда выделено около 1500 соединений, относящихся к спиртам, карбонильным соединениям, кислотам, ацеталам, сложным эфирам и углеводородам. Наиболее ценными ароматобразующими соединениями винограда, несомненно, являются терпеновые соединения. Они представлены углеводородами (мирцен и лимонен), спиртами (линалоол, α -терпинеол, цитронеллол, нерол и гераниол), а также ацетатами этих спиртов. Эти компоненты определяют у ягод винограда и в вине нежный цветочный аромат, которым отличаются мускатные сорта винограда. β -фенилэтиловый спирт, обладающий запахом розы и его ацетат также принимают участие в образовании аромата винограда [2].

По данным некоторых исследователей возможное содержание общих терпенов составляет 0,816-2,0 мг/дм³ в зависимости от сорта и зоны выращивания винограда [1]. Позднее С.И. Краснохиной [4] были изучены некоторые сорта и гибридные сеянцы винограда межвидового происхождения в условиях Нижнего Придонья, и было установлено, что содержание терпеноидных соединений варьировало от 4,0 до 8,6 мг/дм³.

У сортов винограда, не обладающих мускатным ароматом, но также с ароматическими характеристиками, находят эти же терпены, но в значительно более низких концентрациях, порядка 0,2 мг/дм³, но в этом случае терпены также ответственны за специфический аромат винограда. У сортов с менее выраженным ароматом (Совиньон, Мюскадель) присутствуют эти же самые терпены, но в концентрациях 0,05 мг/дм³. Во всех сортах, ягоды которых не имеют выраженной ароматической характеристики, эти терпеновые производные присутствуют как следы [4].

Ранее проведенные исследования показали, что синтез эфирных масел в ягоде винограда происходит до определенного момента, затем он прекращается, и абсолютное количество эфирных масел начинает снижаться. Наивысшая концентрация ароматобразующих веществ наблюдается в период технологической зрелости, а в дальнейшем их содержание в ягодах понижается [3].

Наличие ароматобразующих веществ в ягодах винограда является высоко ценным свойством для сортов всех направлений использования – потребления в свежем виде и переработки на вино и соки. Однако качественный и количественный состав ароматобразующих соединений сортов и форм винограда в связи с их происхождением и

наследованием выраженности аромата как признака, определенного через количественное содержание ответственных за отдельные ароматы и их комплекс химических соединений, практически не изучен.

Исходя из этого, целью наших исследований являлось формирование научных основ хемоселекции винограда по признаку специфичности аромата ягод и вина, которая обуславливается качественным и количественным содержанием ароматобразующих веществ и генетическими закономерностями их наследования.

Объекты и методы исследования

Исследования форм гибридных популяций и исходных форм винограда проводили в 2007-2008 гг. в Национальном институте винограда и вина «Магарач» и Таврическом Национальном университете им. Вернадского. Был изучен гибридный генофонд, полученный от комбинаций скрещивания с участием в качестве родительских форм сортов Цитронный Магарача с мускатно-цитронным ароматом, Спартанец Магарача с ароматом свежести и мускатно-цветочного аромата и Мускат Джим с ярко выраженным мускатным ароматом [3].

Методом газовой хроматографии были проанализированы суслу из урожая сортов винограда Цитронный Магарача и Спартанец Магарача, и 2 сеянцев, полученных от скрещивания этих сортов: М. № 223-96-16-1 и М. № 223-96-16-14.

Экстракт виноградного суслу анализировали на хроматографе Agilent Technology 6890 с масс-спектрометрическим детектором 5973. Компоненты идентифицировали путем сравнения масс-спектров веществ, выявленных на хроматограмме с библиотекой стандартных масс-спектров. Расчет концентраций производили по соотношению площадей пиков пентанола (5мг/дм^3) и идентифицированных пиков летучих веществ без поправочных коэффициентов.

Результаты и обсуждение

В эфирном масле проанализированных образцов было идентифицировано более 50 веществ, среди которых наиболее широко были представлены терпеновые соединения: линалоол и его оксиды, гераниол, лимонен, α -терпинеол, 3,7-диметил-1,5-октадиен-3,7-диол и его изомер 3,7-диметил-1,7-октадиен-3,6-диол (табл. 1). Наибольшее количество терпеновых соединений по их сумме было обнаружено у сорта Цитронный Магарача ($1,86\text{ мг/дм}^3$), наименьшее – у сеянца М. № 223-96-16-1 ($0,40\text{ мг/дм}^3$). В ягодах сорта Цитронный Магарача выделены 9 терпеноидных соединений, и аромат этого сорта в основном определяется наличием лимонена, линалоола (запах ландыша) и его изомеров. В ягодах отмечен его изомер – 3,7-диметил-1,5-октадиен-3,7-диол ($0,12\text{ мг/дм}^3$). У сорта Спартанец Магарача идентифицированы лимонен ($0,64\text{ мг/дм}^3$), характерный для лимона и линалоол ($0,14\text{ мг/дм}^3$). Также, только в этом образце был выделен гераниол, определяющий запах розы ($0,49\text{ мг/дм}^3$). Терпеновые соединения ягод изученных гибридных сеянцев существенно различаются как по количеству соединений, так и по концентрации. У сеянца М. № 223-96-16-1 выделены только 3 компонента: лимонен ($0,17\text{ мг/дм}^3$), α -терпенеол ($0,14\text{ мг/дм}^3$) и 3,7-диметил-1,5-октадиен-3,7-диол ($0,21\text{ мг/дм}^3$). В сеянце М. № 223-96-16-14, выделены 9 компонентов, из которых определяющими аромат оказались линалоол ($0,22\text{ мг/дм}^3$), 3,7-диметил-1,5-октадиен-3,7-диол ($0,35\text{ мг/дм}^3$), а также *транс*-линалоолоксид и *цис*-линалоолоксид.

Из высших ароматических спиртов во всех изученных образцах был выделен только фенилэтиловый спирт, определяющий аромат розы. При этом наибольшее его содержание обнаружено в ягодах сорта Спартанец Магарача ($0,66\text{ мг/дм}^3$) и сеянце М. № 223-96-16-1 ($0,21\text{ мг/дм}^3$). У сорта Цитронный Магарача и сеянца М. № 223-96-16-14 его концентрация составила $0,15$ и $0,14\text{ мг/дм}^3$ соответственно. Также идентифицированы ненасыщенные спирты (изомерные гексенолы), придающие аромат свежескошенной травы. Наибольшая их

концентрация установлена в ягодах сорта Спартанец Магарача (0,87 мг/дм³), что и определяет аромат свежести в винограде, а наименьшая – в гибридах с участием сорта Спартанец Магарача.

Таблица 1

Содержание ароматообразующих соединений в соке ягод различных сортообразцов винограда, мг/дм³

Вещество	Цитрон- ный Магарача	Спартанец Магарача	М. № 223- 96-16-1	М. № 223- 96-16-14
Терпеновые соединения				
лимонен	0,27	0,64	0,17	0,20
<i>транс</i> -линалоолоксид (фуран)	0,08	-	-	0,01
<i>цис</i> -линалоолоксид (фуран)	0,19	-	-	0,03
<i>транс</i> -линалоолоксид (пиран)	0,21	-	-	0,14
<i>цис</i> -линалоолоксид (пиран)	0,47	-	-	0,19
линалоол	0,11	0,14	0,02	0,22
α -терпинеол	0,02	-	-	-
гераниол	-	0,49	-	-
3,7-диметил-1,5-октадиен-3,7-диол	0,40	-	0,21	0,35
3,7-диметил-1,7-октадиен-3,6-диол	0,18	-	-	-
сумма	1,93	1,27	0,40	1,14
всего компонентов	9	3	3	9
Высшие спирты				
Фенилэтиловый	0,15	0,66	0,21	0,14
Ненасыщенные спирты				
<i>транс</i> -2-гексен-1-ол	0,03	0,77	0,16	-
1-октен-3-ол	-	0,10	0,03	0,05
<i>цис</i> -3-гексен-1-ол	-	-	0,03	0,05
сумма	0,03	0,87	0,22	0,10
всего компонентов	1	2	3	2
Альдегиды				
гексаналь	0,50	1,45	0,48	-
нонаналь	0,03	0,08	0,02	0,03
деканаль	0,07	0,12	0,03	0,04
бензальдегид	-	-	0,03	-
фенилацетальдегид	-	-	0,54	0,62
<i>транс</i> -2-гексеналь	-	2,21	0,69	0,36
октаналь	-	0,05	0,02	-
2-октеналь	-	-	-	0,05
2-гептеналь	-	0,10	0,03	0,02
<i>транс, транс</i> -2,4-декадиеналь	-	0,57	0,15	0,05
ванилин	0,38	0,93	0,77	0,78
сумма	0,98	5,51	2,76	1,95
всего компонентов	4	8	10	8

Наибольшее число альдегидов, придающих аромат свежескошенной травы и фруктов, идентифицировано в ягодах сеянца М. № 223-96-16-1 (10), а наименьшее – в ягодах винограда сорта Цитронный Магарача (4). Однако по количественному выражению выделяется сорт Спартанец Магарача, в котором содержание альдегидов достигает $5,51 \text{ мг/дм}^3$, в основном за счет гексаналя, *транс*-2-гексеналя и ванилина. В ягодах сеянца М. № 223-96-16-1 содержание альдегидов составляет $2,76 \text{ мг/дм}^3$, преобладают ванилин, *транс*-2-гексеналь и фенилацетальдегид. В ягодах сеянца М. № 223-96-16-14 также преобладают фенилацетальдегид и ванилин, сумма всех компонентов составляет $1,94 \text{ мг/дм}^3$. В ягодах сорта Цитронный Магарача содержание альдегидов наименьшее – $0,99 \text{ мг/дм}^3$, в основном за счет гексаналя и ванилина.

Методом кластерного анализа (программный пакет STATISTICA 6) выявлена степень сходства между 4 образцами винограда по их характеристикам, в данном случае по критерию содержания химических веществ, определяющих наличие аромата (рис. 1). Эта степень сходства численно определяется евклидовым расстоянием между объектами (сорта винограда и гибридные формы). Все объекты объединены в древо классификации ветвями, длина которых зависит от степени сходства.

Гибридные формы М. № 223-96-16-1 и М. № 223-96-16-14 полученные при скрещивании сортов Цитронный Магарача и Спартанец Магарача объединены в одну группу и располагаются по длине ветвей ближе к Цитронному Магарача, что говорит об их биохимической и генотипической близости между собой и Цитронным Магарача.

Данные кластерного анализа по содержанию ароматобразующих соединений позволили установить, что сорт Спартанец Магарача наиболее далек от гибридных форм. Это свидетельствует о том, что при скрещивании с участием данного сорта выщепляющиеся исследуемые гибриды унаследовали аромат в большей степени от сорта Цитронный Магарача, чем от сорта Спартанец Магарача.

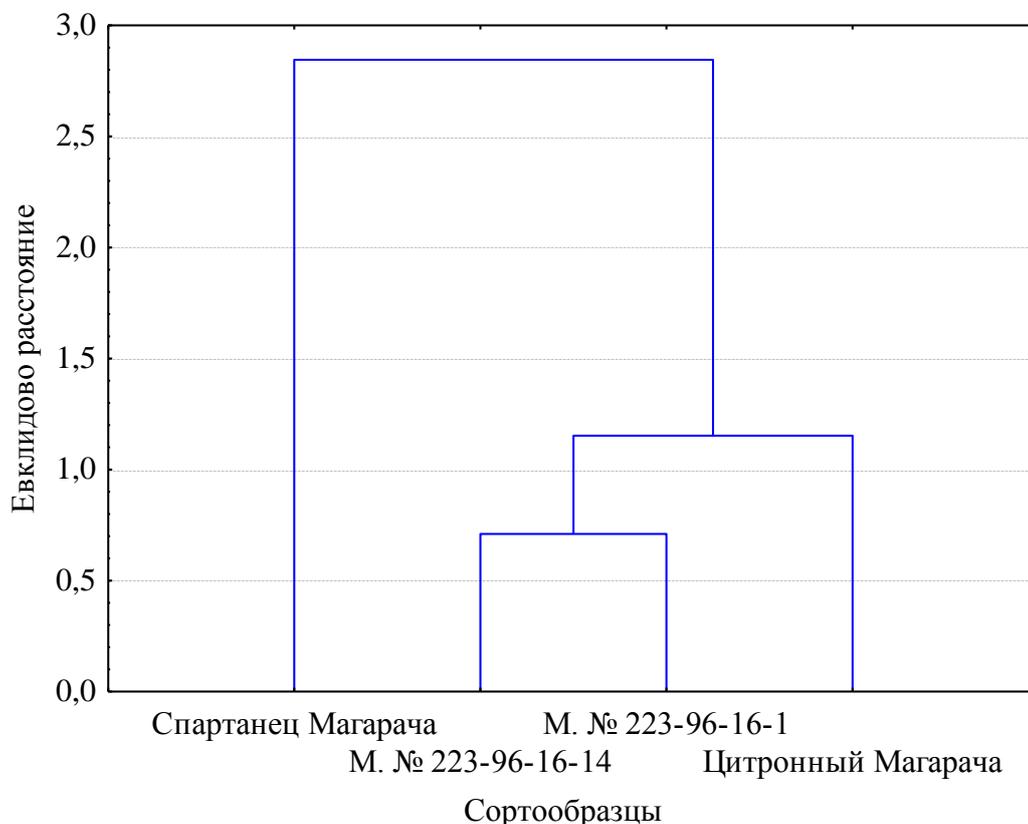


Рис. 1. Дендрограмма кластерного анализа

Выводы

На основании проведенных исследований можно считать установленным, что основными соединениями, определяющими аромат у сортов винограда Цитронный Магарача и Спартанец Магарача, а также у их гибридных форм, являются терпеновые соединения и альдегиды.

В исследованных образцах идентифицированы линалоол и его оксиды, гераниол, лимонен, α -терпинеол, 3,7-диметил-1,5-октадиен-3,7-диол и его изомер 3,7-диметил-1,7-октадиен-3,6-диол.

Среди терпеновых соединений линалоол и лимонен являются основными компонентами в формировании аромата ягоды у изученных сортов винограда и гибридных форм, полученных от скрещивания с ними, а остальные – дополнительными.

Наличие большого количества ненасыщенных спиртов в ягодах сорта Спартанец Магарача определяет выраженный аромат свежести.

Результаты кластерного анализа позволили установить, что гибридные формы М. № 223-96-16-1 и М. № 223-96-16-14 по ароматобразующим показателям ближе к сорту Цитронный Магарача. В целом это позволяет говорить о возможности формирования научных подходов в хемоселекции винограда по признаку специфической ароматики.

Список литературы

1. Датунашвили Е.Н. Исследование эфирных масел некоторых сортов винограда: Автореф. дисс. ... канд. тех. наук: 05.18.08. – Москва: МИПТП, 1959. – 23 с.
2. Красохина С.И. Подбор и селекция сортов винограда с мускатным ароматом для условий Нижнего Придонья: Автореф. дисс. ... канд. с.-х. наук: 06.01.07. – Москва: ТСХА, 2001. – 24 с.
3. Содержание терпеновых спиртов в гибридных сеянцах винограда с мускатным ароматом / Левченко С.В., Воробей С.К., Толкачева Н.В., Волынкин В.А., Рошка Н.А. // Магарач. Виноградарство и виноделие. – 2008. – № 1. – С. 6-8.
4. Теория и практика виноделия / Рибера-Гайон Ж., Пейно Э., Рибера-Гайон П., Сюдро П. М. – М.: Пищевая промышленность, 1979. – Т. 2. – 352 с.

THE RESISTANT BREEDING TO IMIDAZOLINONE HERBICIDE GROUP IN SUNFLOWER (*HELIANTHUS ANNUUS* L.)

YALCIN KAYA, *PhD*; GOKSEL EVCI, *PhD*;

VELI PEKCAN; TAHIR GUCER; MEHMET I. YILMAZ

Trakya Agricultural Research Institute, Edirne, Turkey

Introduction

Sunflower is an essential crop in the rotation system in Blacksea Region and over the 50% of world sunflower areas and production are existed in this region. Broomrape parasite (*Orobanche cernua* Loeffl.) and the weeds are the biggest problems in sunflower production both in Turkey and also in some other countries. The weeds control generally in sunflower production by *trifluralin* as pre emergence applications in Turkey and other countries [4]. However, some weeds such as *Xanthium strumarium* Wallr., *Chenopodium album* L., *Echinochloa crus-galli* L., *Solanum nigrum* L., *Avena sterilis* L., *Amaranthus albus* L., *Datura*

stramonium L. etc. could not be controlled by pre-emergence herbicides and reduce sunflower yield significantly.

The use of Imidazolinone (IMI) herbicide controlling these weeds as post emergence application with IMI resistant hybrids as obtained by classical breeding called CLEARFIELD system use in sunflower and also soybean, corn, wheat and canola in the world but only in sunflower in Turkey [1, 2, 4]. IMI resistant genes firstly discovered in wild plants in US and these genes were transferred to cultural types utilizing backcross method in 1998 [6]. IMI resistance were determined in sunflower, two genes with additive gene effects but both side dominant in the parents increase the level of resistance to herbicide [3, 7].

Broomrape which is a parasite influence seed yield and other yield traits in sunflower until 100%. After developing resistant sunflower cultivars against the broomrape, parasite overcame and new prototypes and races produced. New races of broomrape in sunflower is big problem in Turkey and Spain but these races also started to appear in other Blacksea countries such as Bulgaria, Romania, Ukraine and Russia. Now, the most aggressive races were found in Turkey but parasite were controlling with planting high tolerant hybrids and also by IMI herbicide as post application in sunflower production. Therefore, Due to controlling both broomrape and key weeds together, the IMI herbicide use with IMI resistant hybrids in sunflower production reached about % 50 market share in Trakya Region (European part of Turkey) having over 70% of Turkish sunflower areas in recent years.

Research was covered of breeding works to develop IMI type inbred lines and hybrids in National Sunflower Project conducting by Trakya Agricultural Research Institute (TARI) in Edirne, Turkey in between 2003-2008.

Objects and methods of investigation

The research was conducted in TARI fields between 2003-2008 to develop IMI type inbred lines and hybrids in National Sunflower Project. After getting the IMI herbicide resistant public lines from USDA Sunflower Research Unit at Fargo, ND in 2003 and they were multiplied in first year. Then, they started to cross institute lines firstly to convert them as IMI resistant ones in 2004.

Sunflower has about 120-150 days growing season normally. Therefore, in summer season, plants were planted in April and harvested at September in each year. In winter seasons, plants were planted in October in growth chamber and harvested in January. IMI herbicides (Imazamox + Imazapyr (33+15 g/l)) advised normally to apply 1.25 l / ha to farmers but double dose (2.50 l/ha) applied at 6-8 leaves stage in the research to abstain any double dose application in the sunflower production. Phytotoxicity observations were performed at first and 2nd week after application each breeding stage. P-4223 hybrid from Pioneer Seed Co. as non IMI resistant but broomrape resistant and Sanay as IMI resistant hybrid from Sygenta Seed Co. were existed as control in the research. Herbicide resistance was evaluated of the plants based on 1-9 scale as 1- No damage, 2- Light Green, 3-Yellow Green, 4- Reducing growth, 5- Less deformed plants 6- Mid size deformed plants, 7- Many deformed plants, 8- Some died plants, 9-All plants died [4, 5]. Based on these scale, 1-2 was selected as resistant plants in the research.

Results and Discussions

The research was started under in National Sunflower Project in 2003 after getting the public lines from US. Each year, plants were planted in the pots then selection continued at growth chamber in the winter and similarly the same breeding process continued in the fields in summer seasons.

In earlier generations, selection was performed based phenotype as seed type and plant appearance and also higher oil content. However, in later generations, selection was performed based on combining ability (general and special) of the inbred lines crossing each other one

tester inbred line with producing test hybrids. After applying IMI herbicide, resistant plants were selected and from these ones, the best plants which had other desired characteristics were selected each generation.

In 2007, the 46 breeding lines originated from 0536-R, 01018-R, 01001-R and 3500-R inbred lines, were existed in F4-F7 stages. Only four of them were observed under segregation and others were found as resistant (Table 1). From female inbreds in 2007, breeding lines originated from 2517-B and 2453-B were existed and 42 of these 61 lines was found resistant in F4-F6 stages in the study (Table 2).

Table 1

The IMI herbicide resistance results of restorer lines in 2007

Breeding stage	Originated Inbred line	Number of line	Resistant lines	Segregated	Non resistant
F4	0536-R	9	5	4	-
	01018-R	2	2	-	-
	01001-R	3	3	-	-
F5	0536-R	5	-	-	-
	01018-R	3	-	-	-
	01001-R	5	-	-	-
F6	3500-R	11	-	-	-
F7	3500-R	8	-	-	-

Table 2

The IMI herbicide resistance results of female lines in 2007

Breeding stage	Originated Inbred line	Number of lines	Resistant lines	Segregated	Non resistant
F4	2517-B	3	-	3	-
	2453-B	5	4	1	-
F5	2517-B	48	33	15	-
F6	2517-B	5	5	3	-

On the other hand, the breeding lines were advanced one generation in 2008, so restorer and female lines were existed in F5-F8. From restorer lines only 8 of 79 breeding lines were under segregation and others were found resistant (Table 3). From the 78 females originated from same two inbred lines in 2008, 43 of them were found as resistant, but others were under segregation (Table 4).

Table 3

The IMI herbicide resistance results of restorer lines in 2008

Breeding stage	Originated Inbred line	Number of line	Resistant lines	Segregated	Non resistant
F5	01018-R	10	5	5	-
	01001-R	12	9	3	-
F6	0536-R	18	18	-	-
	01018-R	9	9	-	-
	01001-R	13	13	-	-
F7	3500-R	7	7	-	-
F8	3500-R	10	10	-	-

The breeding process to develop sunflower IMI resistant inbred female and restorer lines in the research were given in Fig. 1, 2 by sunflower growing seasons altering by breeding works in growth chamber at winter and institute fields at summer.

Table 4

The IMI herbicide resistance results of female lines in 2008

Breeding stage	Originated Inbred line	Number of line	Resistant lines	Segregated	Non resistant
F5	2517-B	24	7	17	-
	2453-B	8	2	6	-
F6	2517-B	39	34	5	-
F7	2517-B	7	-	7	-

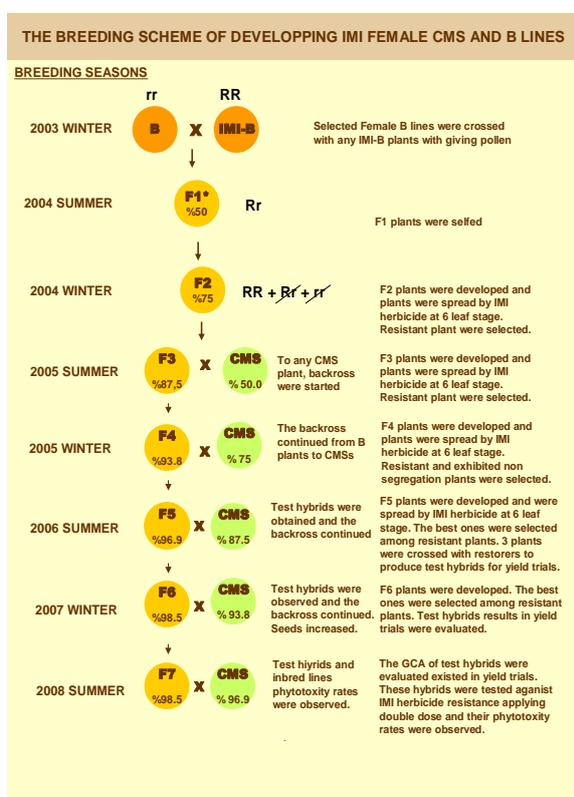


Fig. 1. The breeding scheme of CMS and maintainer lines in the research

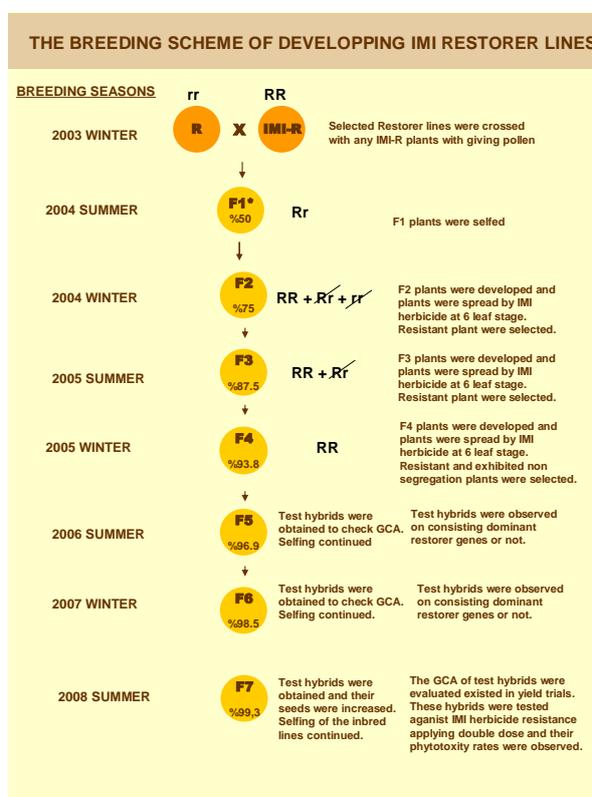


Fig. 2. The breeding scheme of restorer lines in the research

Conclusions

After a long breeding period to convert the insitute lines to IMI herbicide resistant ones utilizing from crossing, selfing and selection process, first resistant lines and hybrids were developed at the end of 2008. However, IMI inbred lines were sent to registration center in 2009 to produce certified seed in this year also. IMI hybrids from these lines will be produced and will send to registration trials in 2009 too.

References

1. Anonymus. BASF Company. 2009. <http://www.clearfieldsystem.com>.
2. Chemical control of broomrape (*Orobanche cernua* Loeffl.) in sunflower (*H. annuus* L.) resistant to imazethapyr herbicide / Alonso L.C., Rodriquez-Ojedo M.I., Fernandez-Escobar J., Lopez-Ruiz-Calero G. // Helia. – 1998. – 29. – P. 45-54.

3. Bruniard J.M., Miller J.F. Inheritance of imidazolinone herbicide resistance in sunflower // *Helia*. – 2001. – 24 (35). – P. 11-16.
4. Kaya Y., Evcı G., Demirci M. Broomrape (*Orobanche cernua* Loeffl.) and Herbicide Resistance Breeding in Sunflower (*Helianthus annuus* L.) in Turkey // *Helia*. – 2004. – 27 (40). – P. 199-210.
5. Malidza G., Jovic S., Skoric D. Weed and broomrape (*O. cernua*) control in Clearfield in Sunflower // Proc. European Weed Research Society 7th Mediterranean Symp. Cukurova Univ., Adana, Turkey, 6-9 May, 2003. – Adana, Turkey, 2003. – P. 51-52.
6. Miller J.F., Al-Khatib K. Development of Herbicide Resistant Germplasm in Sunflower // Proc. of The 15th Int. Sunflower Conf. Toulouse, France, June 12-15, 2000. – Toulouse, France, 2000. – P. 37-41.
7. Sala C.A., Bulos M., Echarte A.M. Genetic Analysis of an Induced Mutation Conferring Imidazolinone Resistance in Sunflower // *Crop Science*. – 2008. – 48. – P. 1817-1822.

ЕКОЛОГО-ГЕНЕТИЧНА МІНЛИВІСТЬ ГЕОГРАФІЧНО ВІДДАЛЕНОГО ВИХІДНОГО МАТЕРІАЛУ ЗЕРНОВИХ КУЛЬТУР

Ю.О. ЛАВРИНЕНКО, доктор сільськогосподарських наук,
Херсонський державний аграрний університет

Вступ

Використання географічно-віддалених форм культурних рослин з метою створення нового вихідного матеріалу має давні позитивні приклади. Аналізуючи причини походження видів, Ч.Дарвін зазначив: «...сам факт того, що численні види одного роду, які перебувають у певній країні, вже вказують на те, що в умовах цієї країни є щось сприятливе для роду...» (стор. 122 [3]). Тому в таких країнах очікувалось і найбільше різноманіття різновидів та мінливості рослин. Одним з засновників широкого використання географічно віддалених форм у науковій селекції зернових був відомий австралійський селекціонер Фаррер. Створені ним сорти Федерейшн, Аврора, які були отримані шляхом схрещувань галицьких, американських, індійських пшениць, протягом десятиріч були провідними в Австралії та європейських країнах (цит. за М.І. Вавиловим [1], стор. 75, 102). Особливо плідне використання географічно віддалених форм у селекції спостерігалось в роботах П.П. Лук'яненка [7] в середині минулого століття.

Метою досліджень було вивчення параметрів мінливості ендеміків Середньоазійського генетичного центру, проведення інтрогресії еколого-географічно віддалених та екзотичних генотипів в елітний генофонд зернових культур південного регіону України.

Об'єкти та методи дослідження

Афганістан належить до Середньоазійського генцентру, який є основним постачальником різноманіття гексаплоїдних пшениць роду *Triticum* L. Микола Іванович Вавилов простежив надзвичайний поліморфізм пшениць гірських систем Гіндукушу, де існують ендемічні види *T. compactum* Host та *T. sphaerococcum* Perc. [2]. Пшениця для Афганістану є традиційною культурою. Вона висівається на площі понад півтора мільйона гектарів, з них 620-630 тис. га – на зрошенні. Кожна наукова експедиція до цієї країни привносить нові висновки про походження, різноманіття та поповнення до генетичної колекції роду *Triticum*. Але відвідання Афганістану з часів М.І. Вавилова і досі залишається для науковців рідкісним явищем. Тому перебування в цій країні стало реальним шансом переконатись у висновках попередників, ознайомитись зі станом

сортових ресурсів Афганістану, поповнити генетичну колекцію новими формами та оцінити селекційну цінність колекції для умов зрошення південного степу України.

Результати та обговорення

В гірській місцевості при осінньому посіві є можливість висівати одночасно озимі та ярі форми. Кліматичні умови провінції Кабул характеризуються досить низькими нічними температурами повітря взимку (короткочасне зниження до -10°C) і плюсовими температурами вдень. За таких умов ярі форми затримують розвиток, а озимі мають змогу пройти стадію яровизації та світлову стадію розвитку. Як свідчать літературні дані, потреба в яровизації для переходу до фази цвітіння сортів озимої пшениці може бути знята шляхом вирощування при короткому дні та при використанні синього і червоного частин спектру [10].

Саме такі умови складаються в умовах високогір'я, що, можливо, сприяє прискореному проходженню стадії яровизації. У той же час, згідно з результатами детальних генетичних дослідів [8, 12], особливості проходження окремих етапів органогенезу пшениці контролюється генами системи *Vrn* та системи *Ppd*, а також різними можливими між ними комбінаціями. Як було відмічено, типово яро-озимі (альтернативні) форми характеризуються присутністю домінантного алелю *Vrn 2*. Показано широке розповсюдження у місцевих форм м'якої пшениці з Азії домінантного алелю *Vrn 4*.

Як було з'ясовано, відмінності у тривалості яровизаційної потреби та фотоперіодичної чутливості м'якої пшениці визначають не тільки темпи розвитку певних генотипів, але й суттєво впливають на показники адаптивності. Що більша потреба в яровизації та фоточутливість, то повільніший розвиток на початкових стадіях і то пізніше відбувається перехід до формування репродукційних органів. Такий вплив виявляється перш за все на рівні морозо- та зимостійкості, тому зниження рівня фоточутливості показало певні селекційні переваги для сприятливих умов вирощування. Активне включення слабочутливих генотипів у селекційні програми призводить до зниження фоточутливості у сучасних сортів. У той же час зниження фоточутливості може автоматично відбитися частковим скороченням тривалості потреби в яровизації, що впливає негативно на рівень параметрів адаптивності.

За роки перебування в Афганістані було зібрано колекцію пшениць з провінцій Кабул, Кундуз, Балх та Нангархар. Колекція нараховувала більш ніж дві тисячі зразків місцевих популятивних сортів, які вирощувались на полях дехкан (селян) і на дослідних станціях Бодамбог, Дар-Уль-Аман, Мазарі-Шеріф, Джелалабад, Кундуз.

Зібрані зразки з 1989 р. вивчались за комплексом ознак та за їх комбінативною здатністю з місцевими селекційними формами при зрошенні в Інституті зрошеного землеробства (м. Херсон). Кількість зразків, їх таксон і селекційна цінність наведені в табл. 1. В цьому плані було б також цікаво перевірити висновки Ч.Дарвіна, що «...мінливість залежить головним чином від зміни умов існування...і в більшості випадків зміна умов, можливо, діє невизначено, викликаючи різноманітні варіації...» (с. 768 [4]).

Як видно з даних табл. 1, дуже незначний відсоток генетичних ресурсів пшениць Афганістану пройшов крізь сито комплексної оцінки на адаптивну здатність до нових умов вирощування. Більшість зразків, безумовно, були носіями і донорами окремих господарсько-цінних ознак. Це такі ознаки, як: короткостебловість, висока якість зерна, стійкість до обсіпання зерна та до вилягання, добра озерненість колоса, скоростиглість, холодостійкість (для ярих форм), висока щільність колоса. Але основними їх недоліками були: дуже низька стійкість до грибних захворювань (борошнистої роси та бурої іржі), низька зимостійкість, неодноразовість проходження фаз онтогенезу (зокрема перехід до фази цвітіння). Більшість зразків, які становили цінність для селекції, походили з Європи

і належали до таксономічних груп, які не є ендемічними для Середньої та Центральної Азії.

Таблиця 1

Динаміка використання колекції пшениць Афганістану в умовах зрошення південного степу України

Таксони роду <i>Triticum</i> L.	Кількість зразків в селекційній роботі за роками									
	1989	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998-2006
Всього зразків	2157	165	98	56	29	23	22	20	17	16
у т.ч. <i>T. compactum</i> Host.	192	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>T. aestivum</i> L.	1498	141	94	56	29	23	22	20	17	16
var. <i>erythrospers</i> Koern.	735	78	67	34	18	15	14	12	9	9
var. <i>graecum</i> Korn.	78	0	0	0	0	0	0	0	0	0
var. <i>hostianum</i> Clem.	56	0	0	0	0	0	0	0	0	0
var. <i>ferrugineum</i> Alef.	112	0	0	0	0	0	0	0	0	0
var. <i>caesium</i> Alef.	47	6	5	5	0	0	0	0	0	0
var. <i>lutescens</i> Alef.	314	63	27	22	11	8	8	8	8	7
var. <i>albidum</i> Alef.	156	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>T. durum</i> Desf.	155	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>T. turgidum</i> L.	42	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Інші	270	24	4	0	0	0	0	0	0	0

Таким чином, первинний генетичний центр може характеризуватись досить великим різноманіттям ендемічних форм, проте селекційно-цінні зразки серед них займають незначну частку. Донори та носії окремих господарських та адаптивних ознак більш поширені у вторинних центрах, серед яких найбільш впливові – це центри, які формуються в зонах розташування селекційно-дослідних установ. І знову ж таки, знаходимо підтвердження цього висновку у роботах Ч.Дарвіна, який попереджав, що наявність великої різноманітності не обов'язково пов'язана з різноманітністю корисних для людини форм, а більшість корисних різновидів присутня в тих країнах, де вони пройшли тривалий добір людиною: «Якщо вимагались століття або тисячоліття для того, щоб довести більшість наших рослин до того ступеня корисності, яким вони відрізняються зараз, то нам стає зрозумілим, чому не Австралія, ні мис Доброї Надії, ні яка інша країна, де мешкають зовсім нецивілізовані племена, не дали нам жодної рослини, яка могла б дати корисні види...» (с. 108, [3]).

Генетичні ресурси пшениць Афганістану в умовах зрошення південного степу України мали дуже низький рівень адаптивності з причини відсутності стійкості до грибних захворювань. Селекційна цінність була вищою серед озимих форм, але в більшості випадків це зразки з Балкан, які потрапили до Афганістану завдяки міжнародній сітці екологічного випробування.

З часів Ferrier (1857 р.) і Вавилова (1924 р.) Афганістан став більш досяжним і передбаченим, але він залишився таким же самотнім, непокірливим і одночасно бажаним для дослідників. Наукові експедиції до Гіндукушу, Регістану, Сулейманових гір і до цього часу залишаються рідкісними, але кожна з них завершується новими винаходами і незабутніми враженнями. Другою за значимістю культурою Афганістану є кукурудза, яка вирощується з давніх часів та займає належне місце в рослинницькій галузі країни. Була проведена спроба проаналізувати генетичні ресурси другої за

значимістю культури Афганістану – кукурудзи, зробити добори та розширити спектр нового вихідного матеріалу за рахунок географічно віддалених форм.

Кукурудза вирощується тільки при зрошенні. Загальна площа зрошення становить 2,5-2,6 мільйона гектарів, однак урожайність зерна порівняно низька і становить 13,4-17,2 ц/га. Для Афганістану кукурудза є традиційною та давньою культурою. Серед місцевого населення поширена думка, що вона споконвічно висівається на цих землях і є автохтонним видом. Така думка є досить поширеною в країнах Азії та Африки. Це пов'язано з тим, що для людей східної цивілізації історія розповсюдження кукурудзи характеризується стрімкими темпами, зразу ж після відкриття Колумбом Нового Світу. Народи Старого Світу, сприйнявши спочатку кукурудзу як садову декоративну рослину, швидко визначили її продовольчі та кормові якості. Протягом кількох років цей вид розповсюдився у Франції, південно-східній Європі, проник до Африки. Зразки кукурудзи, що знайдені на березі річки Євфрат, датовані 1574 роком. Португальці розповсюдили кукурудзу вздовж західного узбережжя Африки на початку XVI століття, і в цей час вона потрапила до східної Індії. Приблизно у 1575 р. кукурудзу було завезено до західного Китаю. І хоч китайці і визнали її новою рослиною, але згодом зарахували кукурудзу до місцевих культур. Феноменальна швидкість розповсюдження кукурудзи призвела навіть до дискусій відносно походження виду. Ботаніки, що вперше описували кукурудзу на початку XVI століття, відносили її до азійських рослин. Але такі висновки склалися під уявленням того, що відкриті Колумбом землі є Азією, якої він досяг з іншої сторони. Подальше накопичення матеріалів про американський континент сприяло розвитку гіпотези двох родів кукурудзи: азійської та індійської. Описана на початку XX століття восковидна кукурудза з Китаю, Бірми, Філіппін спочатку вважалась ендемом Азії, що її в Америці не існує. Проте, як було встановлено пізніше, в Старому Світі не було знайдено жодної специфічної форми, яка не була б представлена в Америці, і всі вони є мутантами звичайних форм [9].

В Афганістані генетична різноманітність кукурудзи переважно представлена підвидами зубоподібним та кременистим. Зрідка зустрічається розлусна, але походження її чітко визначається американським континентом навіть у місцевій назві – “por corn”. Більшість посівів цієї культури були представлені місцевими популяціями, переважно середньостиглої групи. Використання сортів з більш подовженим вегетаційним періодом було пов'язане з ризиком недополиву, а в жорстких кліматичних умовах цього регіону (в літні місяці іноді зовсім відсутні дощі) це закономірно призводило до значних втрат врожаю. Дефіцит поливної води (низький гідромодуль арикових систем) не дозволяв використовувати більшу зрошувальну норму. Надходженню нового селекційного матеріалу сприяли поставки з Індії, Пакистану, Мексики. Здебільшого це були сорти-популяції, які проходили через дослідні станції з позначками Syn і відповідним реєстраційним номером. У подальшому вони досить швидко втрачали генетичні особливості за рахунок перехресного запилення, а в виробництві іноді залишались оригінальні назви популяцій, незважаючи на ведення насінництва на основі масового добору.

Було зібрано колекцію місцевих форм кукурудзи (переважно в провінції Кабул), яка нараховувала 67 зразків. Більшість зразків було представлено зубоподібними формами. З 1989 р. зібрана колекція вивчалась в Інституті зрошуваного землеробства на предмет генетичної різноманітності та селекційної цінності при гетерозисній селекції. Вивчення кращик за врожайністю зразків у порівнянні зі стандартами показало, що перевищити кращі районовані гібриди в умовах зрошення афганським місцевим формам не вдалось.

Кращі зразки кукурудзи Афганістану істотно поступались за врожайністю зерна стандартам, що використовувались на той час, за окремими групами ФАО в Інституті зрошуваного землеробства. Тому нами було проведено ряд самозапилень на кращик

зразках кукурудзи Афганістану з метою їх використання в гетерозисній селекції. Кількість зразків, що використовувалась у процесі самозапилення для створення нового вихідного матеріалу для гетерозисної селекції, у розрізі підвидів та різновидів наводиться в табл. 2.

Таблиця 2

Динаміка використання зразків кукурудзи Афганістану для створення нового вихідного матеріалу у розрізі підвидів та різновидів

Підвиди, різновидності	Кількість самозапилення по роках						
	1989	1990	1991	1992	1993	1994	1995
<i>Zea mays indurata</i> Sturt.							
var. <i>alba</i> Korn.	2	20	36	68	8	8	-
var. <i>vulgata</i> Korn.	11	110	228	260	124	36	12
var. <i>alboflava</i> Korn.	3	30	75	62	44	32	4
<i>Zea mays indentata</i> Sturt.							
var. <i>leucodon</i> Korn.	4	40	124	112	65	48	6
var. <i>xantodon</i> Korn.	3	30	130	108	36	36	2
var. <i>flavorubra</i> Korn.	39	390	156	156	48	46	11
<i>Zea mays everta</i> Sturt.	4	20	40	8	8	8	-

Слід зауважити, що в перші роки самозапилення проводились на усіх зразках, а потім, після S_2 , проводився жорсткий добір за основними господарськими ознаками. Основними недоліками самозапиених родин були низька продуктивність, висока ураженість стебловими гнилями, пухирчастою сажкою. Тому після жорсткого бракування родин з низькою адаптивністю до умов зрошення залишилась досить незначна кількість ліній, що підлягала випробуванню на комбінаційну здатність.

Комбінаційна здатність вивчалась з різними гетерозисними плазмами, що поширені в сучасних селекційних дослідженнях [5].

Результати вивчення тесткросів показали, що зразки кукурудзи не належали до основних гетерозисних груп і мали у деяких випадках достатньо високу комбінаційну здатність, що давало їм змогу перевищити стандарти за врожайністю зерна.

Проте взагалі конкурсний гетерозис гібридів за участю вихідного матеріалу з Афганістану поступався новим перспективним гібридам та кращим національним стандартам. Процес самозапилення було продовжено, але рівень комбінаційної здатності цього вихідного матеріалу був значно нижчим, ніж у нових елітних комерційних ліній.

Таке явище пояснюється значним досягненням гетерозисної селекції. У провідних селекційних установах Європи та Америки при доборі компонентів схрещування важливим моментом є належність їх до тієї чи іншої гетерозисної групи. Весь генетичний фонд ліній (а їх створено понад мільйон) поділено на конкретні генетичні плазми і змішування їх вимагає великих зусиль для досягнення позитивного результату [11].

Взагалі створення нового вихідного лінійного матеріалу на базі зразків з невідомим родоводом є досить складним і довготривалим процесом. І хоч існує достатньо наукових повідомлень про складність і неперспективність створення ліній на базі сортів у зв'язку з сильною депресією при самозапиленні та низьким виходом цінних ліній [5], проте генетична різноманітність місцевих сортів може бути селекційним джерелом багатьох цінних ознак.

Таким чином, генетична колекція зразків кукурудзи Афганістану може становити селекційну цінність за умов ретельного вивчення за окремими ознаками. Значну селекційну цінність може мати генетичний матеріал, який формується навколо науково-дослідних селекційних установ. У межах конкретних ґрунтово-кліматичних та агроекологічних зон формується селекційно-генетичний пул окремих культур, у яких природний та штучний добір сформував певний комплекс адаптивних властивостей, але які можуть значно знижувати експресію при перенесенні в іншу неспоріднену географічну зону. Селекційно-генетичний рівень досліджень у розвинених країнах створив певний розрив у селекційних досягненнях у порівнянні з країнами азійського регіону. Основні переваги гетерозисної селекції базуються на генетичній базі інбредних ліній, які чітко згруповані за показниками комбінаційної здатності та генетичної плазми. Створення нового вихідного матеріалу на базі місцевих сортів-популяцій вимагає великих витрат на збільшення обсягів самозапилення, тестування на визначення комбінаційної здатності, подовженого терміну переведення генотипу в гомозиготний стан. Створення перспективних генотипів на базі місцевих сортів обмежено високою конкурентоспроможністю вихідного матеріалу, який створено довгостроковими науковими програмами в провідних світових селекційних центрах. Місцеві азійські зразки кукурудзи не належать до визначених селекційних плазм, проте вони можуть бути носіями окремих цінних ознак (у даному випадку – багатокачанність). Для ефективного використання місцевих сортозразків у гетерозисній селекції необхідно залучати до схрещувань добре відпрацьовані сучасні тестери, які дозволять досягти рівня конкурсного гетерозису.

На основі результатів вивчення еколого-генетичної мінливості кількісних ознак географічно віддалених форм зернових культур можна зробити такі висновки.

Висновки

Теоретичні положення Чарльза Дарвіна є фундаментальними в селекційно-генетичних дослідженнях і не втратили актуальності в теперішній час.

Первинний генетичний центр може характеризуватись досить великим різноманіттям ендемічних форм, проте селекційно-цінні зразки серед них займають незначну частку.

Донори та носії окремих господарських та адаптивних ознак більш поширені у вторинних центрах, серед яких найбільш впливові – це центри, які формуються в зонах розташування селекційно-дослідних установ.

Список літератури

1. Вавилов Н.И. Научные основы селекции пшеницы // Избранные произведения. – Л.: Наука, 1967. – Т. 11. – С. 7-259.
2. Вавилов Н.И. Пять континетов. – М.: Мысль, 1987. – 174 с.

3. Дарвин Чарлз. Происхождение видов. – М.: ГИСХЛ, 1952. – 483 с.
4. Дарвин Чарлз. Изменения домашних животных и культурных растений. – М.: Изд. АН СССР, 1951. – 883 с.
5. Дзюбецький Б.В., Черчель В.Ю., Антонюк С.П. Селекція кукурудзи // Селекція і генетика в Україні на межі тисячоліть. Том 2. – К.: Логос, 2001. – С. 571-589.
6. Жуковский П.М. Культурные растения и их сородичи. – Л.: Колос, 1971. – 750 с.
7. Лукьяненко П.П. Избранные труды. – М.: Колос, 1973. – 448 с.
8. Ригин Б.В., Гончаров Н.П. Генетика онтогенеза пшеницы // Итоги науки и техники ВИНТИ. Сер. Генетика и селекция возделываемых растений, 1989. – 148 с.
9. Узэруокс П., Рандольф Л.Ф. История и происхождение кукурузы // Кукуруза и ее улучшение. – М.: Иностранная литература, 1957. – С. 7-53.
10. Чайлахян М.Х. Регуляция цветения высших растений. – М.: Наука, 1988. – 559 с.
11. Hallauer A.R. Methods used in developing maize inbreds // *Maydica*. – 1990. – V. 5, N 1. – P. 1-16.
12. Stelmakh A.F. Genetic systems regulating flowering response in wheat // *Euphytica*. – 1998. – N 100. – P. 359-369.

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ В ПОЛУЧЕНИИ МЕЖВИДОВЫХ ГИБРИДОВ С МЯГКОЙ ПШЕНИЦЕЙ

Н.А. ХАЙЛЕНКО, доктор биологических наук
ДГП «Институт биологии и биотехнологии растений» РГП «НЦБ РК» КН МОН РК,
Алматы, Республика Казахстан

Введение

Повышение урожайности и устойчивости пшеницы к стрессам и болезням является главной задачей генетиков и селекционеров Казахстана, а создание гибридной пшеницы для одного из регионов республики на основе цитоплазматической или генной мужской стерильности помогло бы разрешить множество проблем, в том числе и проблему *генетически чистого производства* зерновой продукции. В последнее время в процессе выведения новых сортов для придания растениям полезных признаков начаты исследования *эпигенетических* изменений у мягкой пшеницы.

В целом *эпигенетикой* называют раздел биологии о причинных взаимодействиях между генами и их продуктами, образующими фенотип. Эпигенетическая теория предполагает, что эволюционное изменение начинается тогда, когда популяция попадает в непривычные условия существования, а далее реализуется онтогенезом вне зависимости от внешних условий. Сейчас эпигенетика – широкое понятие, отражающее онтогенетические, физиологические, молекулярные и эволюционные аспекты регуляции активности генов [1].

Эпигенетическая теория эволюции широко обсуждается во всех странах мира, однако конкретных законов наследования признаков, таких как в классической генетике, пока не выработано.

Большинство исследователей до сих пор считают, что у гибридных организмов, полученных при отдаленной гибридизации растений, наследование признаков определяется классическими законами генетики, но к настоящему времени часть исследователей склоняется к мысли о том, что у живых организмов, в частности у растений, существует система эпигенов, проявление которых не подчиняется общепризнанным законам генетики, а в результате их действия и проявляются явления различного типа стерильности гибридного материала, апомоксиса, пистиллоидности, нарушения в функционировании женского гаметофита [2].

На факты гибели гибридных зерновок на различных стадиях эмбриогенеза у растений F_1 – F_3 и беккроссов, полученных при межвидовых скрещиваниях пшеницы, ученые указывали еще в прошлом веке [2, 3].

Целью исследований являлось получение *in vitro* регенерантов, выращенных из незрелых и зрелых зародышей от межвидовых скрещиваний пшеницы с использованием видов – носителей мужской стерильности и полноценных растений из регенерантов; разработка способов выращивания растений с помощью метода эмбриокультуры.

Объекты и методы исследования

Объектами для исследований служили виды пшениц: *T. aestivum* L. (A^uA^uBBDD) (сорта Ленинградка и Саратовская-29), *T. compactum* L. (A^uA^uBBDD), гибриды F_1 *T. compactum* x Ленинградка.

Посев производили на полях КазНИИЗиР АО «Казагроинновация» МСХ РК. Все родительские формы, расщепляющиеся популяции гибридов, линии выращивали в поле с площадью питания растений 5 x 30 см. Во всех полевых опытах соблюдали режим агротехнических мероприятий, общепринятый для данного региона. Скрещивания всех видов и сортов проводили по общепринятым методам с некоторыми модификациями [2]. Кастрировали и опыляли по 5-10 колосьев каждой комбинации. Опыляли с помощью твел-метода, с подрезанием или без подрезания чешуй колосьев материнских сортов. Опыление проводили по мере созревания рылец в цветках, 2-3 раза, в течение 10-15 суток. Перед опылением проверяли фертильность пыльцы в цветках гибридных растений.

В ходе эксперимента использовался следующий метод стерилизации зерновок: 70%-ный этиловый спирт – 10 мин.; 0,1%-ный раствор сулемы – 1 мин.; хлорка – 5 мин.; бидистиллированная H_2O – 15 мин.; промывали 3 раза, каждый раз в свежей порции. В результате эксперимента подтверждено, что метод стерилизации зерновок (обработка семян 70%-ным этиловым спиртом – экспозиция 10 мин.) является оптимальным для дальнейшей работы.

На искусственные питательные среды были посажены незрелые 15-суточные зародыши вида *T. compactum*, сортов Саратовская-29 и Ленинградка, а также гибридные 15-суточные зародыши комбинации *T. compactum* x Ленинградка. Каллусы получали из зародышей, изолированных на 15-тые сутки после опыления. Зерновки освобождали от цветковых и колосковых чешуй, зародыши изолировали в стерильных чашках Петри с помощью препаровальных игл под бинокулярной лупой МБС-9. Выделенные зародыши помещали щитком вверх на питательную среду Гамборга (B5) и на среду Мурасиге и Скуга (МС), содержащую 2 мг/л 2,4-Д, в стерильных условиях ламинарного бокса. До появления побегов экспланты выдерживались в термостате в темноте при 25°C, затем переносились на свет в условия культуральной комнаты, обеспечивающей температуру 25°C, 16-часовой фотопериод с интенсивностью освещения 5-10 клк и влажность 75-80%. Через каждые 4-5 недель каллусы пересаживали на свежую питательную среду. При появлении каллусов с зачатками побегов их переносили на среду без фитогормонов, а затем культивировали на свету при 16-18-часовом фотопериоде.

Результаты и обсуждение

Опыты по получению межвидовых гибридов пшеницы, в частности с использованием видов-носителей стерильности, а также видов-восстановителей фертильности, проводились нами в течение 1988-2008 гг. В связи с тем, что завязываемость гибридных зерновок, как правило, была недостаточно высокой, в 2006-2008 гг. нами были запланированы и проведены опыты по искусственному выращиванию гибридных зародышей на питательных средах с помощью методов биотехнологии, прежде всего для того, чтобы снять эффект воздействия гибридного эндосперма на развитие зародыша, а также для восполнения гибридных растений F_1 с

целью их дальнейшего использования в генетических анализах. К настоящему времени нами получены как регенеранты видов и сортов пшеницы, так и гибридные растения.

Наблюдения за развитием зародышей на искусственных питательных средах в течение 2 месяцев показали, что зародыши родительских форм – вида *T. compactum*, сортов Саратовская-29 и Ленинградка, хорошо развиваются и растут – от каллусов до растений с 2 - 3 листьями, а зародыши гибридных комбинаций отличаются друг от друга как по каллусогенезу, так и по росту и развитию регенерантов. В комбинации *T. compactum* x Ленинградка наблюдали образование каллусов (рис. 1) у 33% эксплантов (на 105 незрелых зародышей) и развитие регенерантов – у 28% (на 146 незрелых зародышей). У части каллусов отмечали появление проростков. Регенеранты пересаживали в горшки с почвой в условиях теплицы (зима 2006-2007 гг.). Весной 2007 г., во время кушения растения высаживали на экспериментальный участок института. Как показали наши исследования, процент выращенных растений на искусственных питательных средах был небольшим. В полевых условиях все растения развивались и были фертильными (рис. 2, 3).



Рис. 1. Каллусы из незрелых зародышей растений комбинации *T. compactum* x Ленинградка



Рис. 2. Регенеранты, полученные из незрелых зародышей растений вида *T. compactum*, на экспериментальном участке института



Рис. 3. Регенеранты, полученные из незрелых зародышей растений комбинации *T. compactum* x Ленинградка, на экспериментальном участке института

При фенологических наблюдениях за ростом и развитием пересаженных растений было отмечено, что все растения вида, сортов и гибридов развивались после пересадки нормально несмотря на то, что гибридные формы к моменту пересадки отставали в своем развитии – не столь активно кустились, как родительские формы. Выход в трубку, колошение и цветение растений были стандартными и регенеранты, полученные из 15-суточных зародышей, ничем не отличались от растений, выращенных из семян. Пыльники у всех растений имели нормальную форму, пыльцевые зерна были фертильными, выброс пыльцы происходил нормально.

Однако визуальные наблюдения во время цветения показали, что часть цветков имела пыльники, характерные для признака ЦМС, и цветки оставались неопыленными, особенно на верхушках колосьев. Созревание зерновок также было нормальным, созревшие зерновки были хорошо выполненными, имели развитый зародыш и эндосперм.

В таблице представлены результаты полевого эксперимента по выращиванию потомств незрелых зародышей, полученных от межвидовых скрещиваний. Процент завязавшихся зерен у всех без исключения регенерантов, полученных из незрелых зародышей, был удовлетворительным – он колебался от 39 до 59%. Растения вида *T. compactum* и сортов Ленинградка и Саратовская-29 на полях КазНИИЗиР завязывают 89-95% зерен. Гибридные же растения F₁ комбинации *T. compactum* x Ленинградка и на полях КазНИИЗиР завязывали в разные годы от 35 до 75% зерен, и, таким образом, растения, полученные из незрелых зародышей, ничем не отличались по данному признаку от обычных растений. Установить в этом эксперименте наследование признака мужской стерильности или фертильности не представилось возможным, поскольку опыт был заложен как модельный, с небольшим числом растений. Однако уже сейчас, сопоставляя полученные данные с результатами предыдущих лет по проценту образовавшихся зерновок у обычных растений, можно отметить, что, во-первых, качество сформированных зерен у регенерантов, полученных из незрелых зародышей вида *T. compactum* и сортов Ленинградка и Саратовская-29, немного отличается от качества образовавшихся зерен у обычных растений (по уровню накопления в зерне крахмала); во-вторых, маркерный признак ЦМС у данной гибридной комбинации не всегда проявляется в F₁ и на полях КазНИИЗиР.

Таблица

Формирование зерен у регенерантов, полученных из 15-суточных незрелых зародышей

Вид, сорт, комбинация скрещивания	Поколение	Количество выживших растений, шт.	Количество, шт.		Процент сформированных зерен
			цветков	зерен	
<i>T. compactum</i>	-	2	140	74	52,9
Ленинградка	-	1	76	42	55,3
<i>T. compactum</i> x Ленинградка	F ₁	2	200	93	46,5
<i>T. compactum</i> x Ленинградка	F ₁	1	76	29	38,2
Саратовская-29	-	1	152	89	58,6

Семена контрольных и гибридных растений, полученные от регенерантов комбинаций Саратовская-29, Ленинградка, вида *T. compactum* и комбинации *T. compactum* x Ленинградка, выращенных на экспериментальном участке института в 2007 г., были высажены в озимом посеве на поле КазНИИЗиР. Фенологические наблюдения за растениями F₂ показали, что они прекрасно кустились и колосились, пыльники были нормальной формы, а формирование зерен у них колебалось в пределах от 45 до 55%. При анализе созревших растений отметили несколько интересных фактов: во-первых, растения не расщеплялись по морфологическим признакам; во-вторых, образование зерен у них осталась на уровне урожайности 2007 г. (табл.); в-третьих, изменился вид зерен – и гибридные, и контрольные зерновки были стекловидными, прозрачно-розовыми, имели гладкий эндосперм (в 2007 г. в зерне были крупные и мелкие крахмальные пятна, что снижало качество зерна).

Выводы

Получены *in vitro* регенеранты, выращенные из незрелых и зрелых зародышей от межвидовых скрещиваний пшеницы с использованием видов – носителей мужской

стерильности; получены полноценные фертильные и полуфертильные растения из регенерантов, пересаженных в условия *in situ*; получен семенной материал у всех растений, выращенных из регенерантов.

Способ выращивания растений с помощью эмбриокультуры оказался эффективным для межвидовых гибридов, созданных при скрещиваниях пшеницы, с использованием видов – носителей мужской стерильности.

Список литературы

1. Гродницкий Д.Л. Эпигенетическая теория эволюции как возможная основа нового эволюционного синтеза // Журнал общей биологии. – 2001. – Т. 62, № 2. – С. 99-109.
2. Хайленко Н.А. Цитогенетические и цитозембриологические закономерности формирования межвидовых и межсортовых гибридов пшеницы и риса: Автореф. дисс.... доктора биол. наук: 03.00.15 и 03.00.05. – Алматы, 2004. – 58 с.
3. Хайленко Н.А. Цитоплазматическая мужская стерильность у некоторых гибридов тетра- и гексаплоидной пшеницы // Вестник КазНУ. Серия биол. – 2008. – № 2 (37). – С. 69-74.

ПРИМЕНЕНИЕ СОВМЕСТНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КАЛЛУСНЫХ КУЛЬТУР ПШЕНИЦЫ (*TRITICUM AESTIVUM* L.) С ПАТОГЕННЫМИ ГРИБАМИ В ИССЛЕДОВАНИИ МЕХАНИЗМОВ ФИТОИММУНИТЕТА

Л.Г. ЯРУЛЛИНА, доктор биологических наук;
Н.Б. ТРОШИНА, доктор биологических наук;
О.Б. СУРИНА, кандидат биологических наук;
И.В. МАКСИМОВ, доктор биологических наук

Учреждение Российской академии наук Институт биохимии и генетики Уфимского
научного центра РАН, Уфа, Россия

Введение

Одной из первоочередных проблем современной биологии является выявление путей формирования устойчивости растений к фитопатогенам. Известно, что устойчивые растения ограничивают распространение фитопатогенов путем формирования зоны некроза, в которой происходит усиление продукции активных форм кислорода [13]. Пути образования активных форм кислорода в растениях многообразны и активно обсуждаются в научной литературе [9, 10]. Так, показано, что накопление перекиси водорода (H_2O_2) в растительных тканях возможно за счет окисления щавелевой кислоты оксалатоксидазой [7] в результате специфического ингибирования каталазы и пероксидазы салициловой кислотой (СК) [8], индукции экспрессии ряда генов окислительных ферментов под воздействием производных хитина.

Удобной моделью для изучения механизмов формирования защитных реакций растений к фитопатогенам могут служить совместные культуры растительных клеток с возбудителями болезней. Такая культура у нас была получена с использованием каллусов пшеницы и спор возбудителя твердой головни *Tilletia caries* Tul., причем обнаружены различия в степени инфицируемости грибом различных участков каллуса: грибок успешно развивался в межклеточном пространстве рыхло расположенных паренхимоподобных клеток и не инфицировал зоны организованного роста каллусов и ризоиды [3]. Нами также были выявлены морфологические различия между каллусами восприимчивого и устойчивого к возбудителю твердой головни образцов пшеницы. Если каллусы восприимчивых образцов характеризовались наличием небольшого количества плотных участков, то в каллусах устойчивых образцов плотных участков было значительно больше. Эти данные навели нас на мысль о сходстве некоторых механизмов

индукции морфогенетических и защитных реакций растительных клеток и об участии в данных процессах перекиси водорода.

Целью настоящего исследования было выявление особенностей влияния известных индукторов устойчивости, таких как салициловая кислота (СК), хитоолигосахариды (ХОС), иммуностимулятор «Бисол 2», системный фунгицид «Байтан», на устойчивость различных клеток каллусов пшеницы к возбудителю твердой головни.

Объекты и методы исследования

В качестве эксплантов для получения каллусов использовали незрелые зародыши пшеницы *Triticum aestivum* L. сорта Жница. Изолированные зародыши высаживали на среду Мурасиге и Скуга (МС) и культивировали при 26°C в темноте. В опытных вариантах каллусы культивировали в присутствии 4-х индукторов устойчивости: СК, ХОС, «Билол 2», «Байтан». На 3 сутки от начала 2 пассажа часть каллусов инфицировали телиоспорами возбудителя твердой головни *Tilletia caries* (DC.) Tul. В качестве контрольных каллусов использовали не подверженные воздействию исследуемых индукторов устойчивости и не инфицированные патогеном каллусы.

Для определения активности оксалактоксидазы каллусы растирали в 10 мМ фосфатно-солевом буферном растворе, рН 6.0. Гомогенат центрифугировали (5000 g, 20 мин.) и в супернатанте оценивали активность цитоплазматической фракции оксалактоксидазы. Для выделения из осадка ионно-связанной с клеточными стенками оксалактоксидазы использовали 1 М NaCl. Активность оксалактоксидазы в изучаемых фракциях определяли микрометодом [12]. Генерацию H₂O₂ оценивали по окислению хромогенного субстрата 3,3-диаминобензидина (ДАБ) [6]. После окрашивания каллусы фиксировали в смеси этанолуксусная кислота (3:1). Срезы подкрашивали 1% метиленовым синим.

В каждом варианте фиксировали по 10 идентичных образцов каллуса. В табл. и на рис. представлены средние значения из 3 биологических повторов и ошибка средней.

Результаты и обсуждение

Наблюдения за морфологическими изменениями каллусов пшеницы, растущих на среде МС с добавлением индукторов устойчивости, показали сходство действия исследуемых соединений. Так, если в контроле каллусы характеризовались относительной однородностью клеток и были неморфогенными (гомогенными, без уплотненных участков), то при добавлении в среду культивирования СК, ХОС, «Бисола 2» и «Байтана» каллусы становились рассыпчатыми, мелкоглобулярными, с небольшими плотными участками и ризоидами. При просмотре срезов морфогенных каллусов пшеницы (среда МС) было обнаружено, что основными клетками каллуса были рыхло расположенные паренхимоподобные клетки, среди которых располагались проэмбриогенные клеточные комплексы (ПЭКК), находящиеся на разных стадиях развития (рис. 1). На срезах каллусов были видны и немногочисленные ризоиды. В контроле генерацию H₂O₂ наблюдали только в ризоидах, причем окрашенными оказались 41-47% их поверхностных клеток.

Введение СК в среду культивирования каллусов инициировало увеличение числа плотных участков, что видно на срезах каллусов (рис. 1).

Во всех вариантах опыта мы не наблюдали существенного возрастания числа клеток, окрашенных ДАБ, расположенных по периферии ризоидов. Можно предположить, что наличие большого числа клеток, окрашенных ДАБ, среди периферических клеток ризоидов уже в контроле определяет их устойчивость при инфицировании. Таким образом, неморфогенные каллусы пшеницы, растущие на средах с добавлением индукторов устойчивости, характеризовались появлением структур, присущих морфогенному каллусу за счет уменьшения доли рыхлого каллуса. Влияние изучаемых соединений на морфогенез каллусов пшеницы можно объяснить их способностью воздействовать на гормональный баланс каллусной ткани, так же, как это показано для интактных растений [4, 5].

Инфицированные каллусы отличались от контрольных наличием единичных ризоидов (рис. 2). Это, по-видимому, было связано со способностью возбудителя твердой головни к синтезу и секреции в растительные ткани индолилуксусной кислоты [1]. Интересно, что на инфицированных каллусах, растущих на средах с ХОС, «Бисолом 2» и «Байтаном», число ризоидов возрастало.

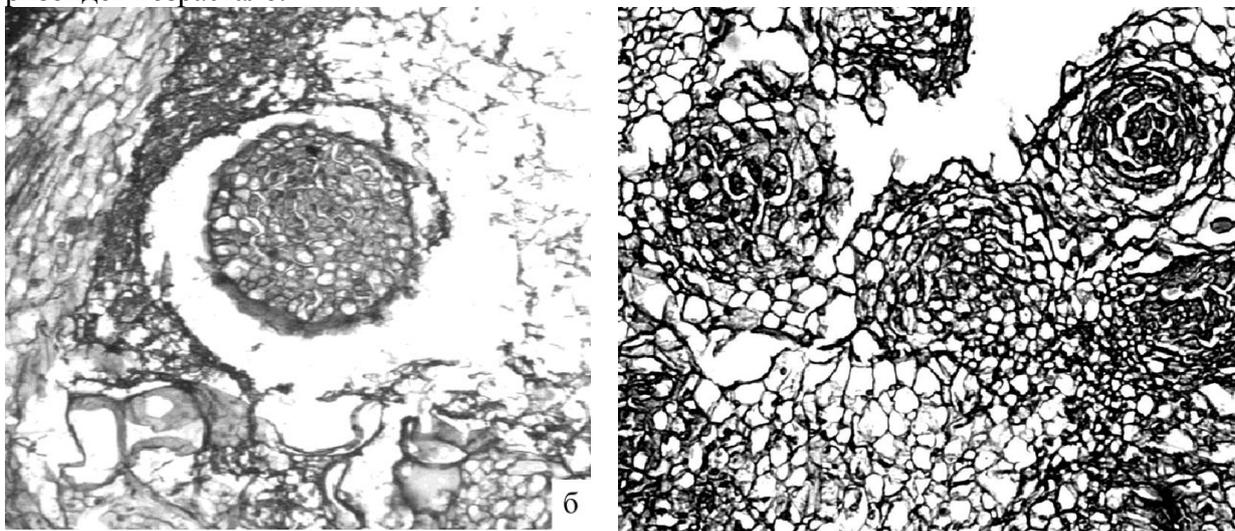


Рис. 1. МЭЗ (слева) и индукция МЭЗ меристемоподобных зон в каллусах *T. aestivum* сорта Жница (20 суток культивирования на среде МС+СК x 200)

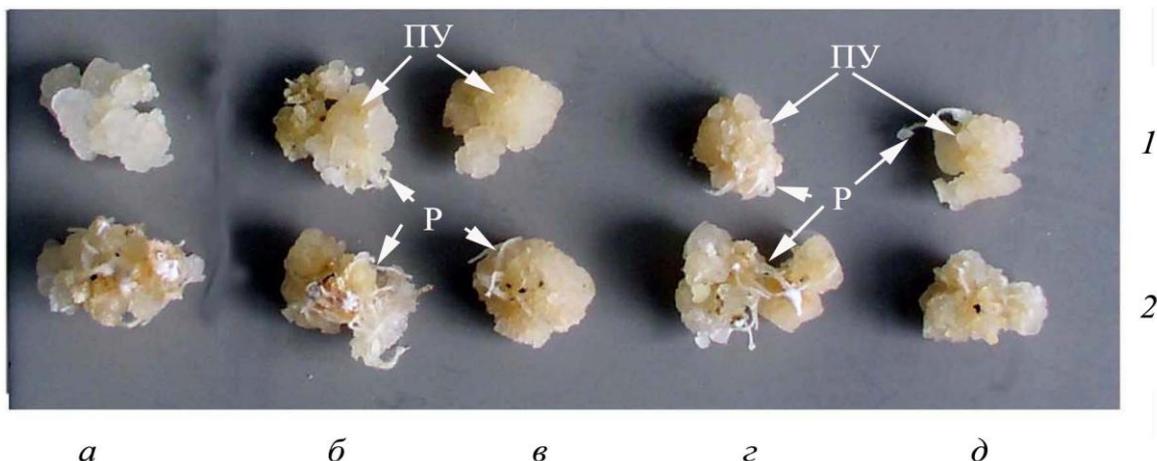


Рис. 2. Неинфицированные (1) и инфицированные *T. caries* (2) каллусы *T. aestivum* сорта Жница: а – на среде МС (контроль); б-д – на среде МС в смеси с «Бисолом 2» в концентрациях 10 мг/л (б) и 100 мг/л (в) или «Байтана» в концентрациях 0.1 мг/л (г) и 1.0 мг/л (д), соответственно

Прорастание спор гриба на каллусах, растущих на среде МС, происходило через 11 сут после их нанесения, а через 20 сут после инокуляции мицелий гриба равномерно покрывал до 25% их поверхности. При введении в среду культивирования индукторов устойчивости гриб распространялся по поверхности каллусов фрагментарно, не заселяя плотные участки и ризоиды. В литературе отмечено медленное проникновение и распространение возбудителей фитофтороза на морфогенном каллусе картофеля и ржавчины на каллусе пшеницы [2] по сравнению с неморфогенным.

В инфицированных каллусах мицелий гриба обнаруживался в межклетниках рыхло расположенных паренхимоподобных клеток и не наблюдался в ризоидах и в меристемоподобных клетках. Инфицирование не влияло на число продуцирующих H_2O_2 клеток ризоидов. Однако в зоне роста гриба, среди паренхимоподобных клеток,

выявлялись клетки (25%), в цитоплазме и на поверхности которых регистрировалась генерация H_2O_2 . В меристемоподобных клетках как неинфицированных, так и инфицированных возбудителем твердой головни каллусов образования H_2O_2 с участием оксалактоксидазы нами не выявлено, что соответствует данным об отсутствии экспрессии генов оксалактоксидазы в меристематических клетках растений [6].

Результаты биохимического анализа показали, что инфицирование каллусов сопровождалось повышением активности оксалактоксидазы в цитоплазматической фракции и снижением активности во фракции, связанной с клеточными стенками. Введение в среду для культивирования инфицированных каллусов индуктора устойчивости ХОС приводило к активации оксалактоксидазы, особенно во фракции, связанной с клеточной стенкой (табл.), что свидетельствует об усилении продукции H_2O_2 клетками каллусов в этих условиях.

Таблица

Влияние ХОС на активность оксалактоксидазы в каллусах пшеницы, инфицированных возбудителем твердой головни *T. caries*

Концентрация ХОС, мг/л	Активность оксалактоксидазы (ед. на 1 г сырой массы) во фракции					
	цитоплазматической			ионно-связанной		
	6 сут	9 сут	12 сут	6 сут	9 сут	12 сут
Каллусы неинфицированные <i>T. caries</i>						
0	10,3±0,8	11,2±0,7	12,7±0,8	0,94±0,06	0,86±0,04	1,05±0,08
0,1	23,0±0,7	26,8±0,8	28,4±0,6	1,52±0,06	1,66±0,08	1,70±0,09
Каллусы инфицированные <i>T. caries</i>						
0	16,7±1,1	15,8±1,0	18,0±1,0	0,73±0,05	0,78±0,04	0,70±0,04
0,1	26,4±1,1	29,8±1,3	30,9±1,6	1,41±0,05	1,68±0,05	1,87±0,05

Таким образом, в результате изучения совместного культивирования каллусов пшеницы с возбудителем твердой головни обнаружено, что защитный ответ паренхимоподобных клеток каллусов мог быть обусловлен генерацией H_2O_2 , в том числе за счет активации оксалактоксидазы. Вместе с тем, образование под влиянием препаратов участков с плотно расположенными паренхимоподобными клетками уменьшало долю рыхло расположенных клеток каллуса, то есть снижало число потенциально поражаемых клеток.

Выводы

1. Введение в среду культивирования неморфогенных каллусов пшеницы индукторов устойчивости инициировало образование многочисленных зон организованного роста и ризоидов, не поражаемых возбудителем твердой головни.

2. Устойчивость ризоидов к патогену определялась наличием поверхностных клеток, генерирующих H_2O_2 .

3. Среди рыхло расположенных паренхимоподобных клеток генерация H_2O_2 выявлялись только при инфицировании, в зонах роста гриба.

4. Появление в каллусах плотных участков, усиление ризогенеза под влиянием ХОС было сопряжено с активацией оксалактоксидазы в области клеточной стенки.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ №08-04-90259-узб.

Список литературы

1. Влияние твердой головни на рост проростков и каллусов пшеницы / Максимов И.В., Трошина Н.Б., Хайруллин Р.М., Сурина О.Б., Ганиев Р.М. // Физиология растений. – 2002. – Т. 49, № 5. – С. 767-772.

2. Смирнова Т.В., Плотникова Ю.М., Молчанова О.И. Влияние физиологического состояния каллусов на развитие ржавчинных грибов // Физиология растений. – 1996. – Т.

43, № 5. – С. 685-691.

3. Развитие возбудителя твердой головни *Tilletia caries* (DC.) Tul. на эмбрионном каллусе пшеницы / Трошина Н.Б., Максимов И.В., Сурина О.Б., Хайруллин Р.М. // Цитология. – 2000. – Т. 42, № 6. – С. 556-559.

4. Чижова С.И., Павлова В.В., Прусакова Л.Д. Содержание абсцизовой кислоты и рост растений ярового ячменя под действием триазолов // Физиология растений. – 2005. – Т. 52, № 1. – С. 108-114.

5. Новые аспекты в изучении механизмов действия индукторов устойчивости пшеницы к твердой головне / Яруллина Л.Г., Трошина Н.Б., Исаев Р.Ф., Ганиев Р.М., Хайруллин Р.М. // Агрехимия. – 2001. – Т. 5. – С. 63-66.

6. Caliskan M., Cuming A. C. Spatial specificity of H₂O₂ –generating oxalate oxidase gene expression during wheat embryo germination // Plant J. – 1998. – V. 15. – P. 165-171.

7. Dumas B., Freyssinet G., Pallet R.E. Tissue-specific expression of germin-like oxalate oxidase during development and fungal infection of barley seedlings // Plant Physiol. – 1995. – V. 107. – P. 1091-1096.

8. Durner J., Klessing D.F. Salicylic acid is a modulator of tobacco and mammalian catalase // J. Biol. Chem. – 1996. – V. 271. – P. 28492-28501.

9. Kawano T. Roles of the reactive oxygen species-generating peroxidase reactions in plant defense and growth induction // Plant Cell Rep. – 2003. – V. 21. – P. 829-837.

10. Mittler R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance // Trends in Plant Science. – 2002. – V. 7. – P. 405-410.

12. Vuletic M., Sukalovich V.H. Characterization of cell wall oxalate oxidase from maize roots // Plant Sci. – 2000. – V. 157. – P. 257-263.

13. Wang H., Li J., Bostock R.M., Gilchrist D.G. Apoptosis: a functional paradigm for programmed cell death induced by a host-selective phytotoxin and invoked during development // Plant Cell. – 1996. – V. 8. – P. 375-391.

ПОВРЕЖДАЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ АБИОТИЧЕСКИХ СТРЕССОВ НА РАСТИТЕЛЬНЫЕ КЛЕТКИ ЗЕРНОВЫХ ЗЛАКОВ

Н.В. ТЕРЛЕЦКАЯ, кандидат биологических наук

Институт биологии и биотехнологии растений НЦБ РК, Алматы, Казахстан

Введение

Растения в естественных условиях подвержены многочисленным стрессам, что сказывается на их росте, развитии и продуктивности. Устойчивость к стрессам формируется на разных уровнях биологической организации. Для отбора перспективных толерантных форм как правило применяются различные провокационные фоны, эффективность которых возрастает при комплексном подходе. А наибольшая производительность отбора может быть достигнута при проведении оценок на прорастающем зерне, в культуре клеток или при гаметофитном отборе [13].

Способность растений на начальных этапах развития эффективно использовать влагу – важнейший биологический и хозяйственно ценный признак, а ростовая реакция проростков на стрессовые условия – один из наглядных показателей изменения их метаболизма [5]. Культуры *in vitro*, позволяющие манипулировать с большим количеством единичных клеток и клеточных агрегатов, чрезвычайно перспективны и как эффективная модель для изучения, и как система отбора толерантных форм, причем устойчивость в данном случае может наследоваться как проявление доминирующего ядерного гена [9]. А гаметофитная фаза, несмотря на небольшой срок прохождения, играет немаловажную роль в передаче генетической информации. В этой фазе

экспрессируется значительная часть генома растений, что дает принципиальную возможность проводить оценку и отбор. Мужских гамет растение формирует на несколько порядков больше, чем женских, и они более подвержены воздействию внешних факторов [2]. Совершенствование методов отбора на уровне проростков, пыльцевых зерен и клеток *in vitro* в составе комплексного отбора может повысить эффективность селекционного процесса и сократить время, необходимое для создания сорта.

Клетка, как единица растительного организма и основа его жизнедеятельности, является тем универсальным уровнем, на котором в минимальном количестве связей и отклонений проявляется все разнообразие функций, присущих биосистемам любой сложности [1]. Поэтому целью данной работы было выявление особенностей реакции клеток зерновых злаков (пшеницы – *Triticum aestivum* L. и ячменя – *Hordeum vulgare* L.) на действие абиотических стрессов (засуха и засоление) на разных уровнях растительной организации *in vivo* и *in vitro*.

Объекты и методы исследования

Объектами исследований служили корешки 7-дневных проростков, пыльцевые зерна и каллусы различных по засухо- и солеустойчивости форм пшеницы и ячменя.

При оценке проростков за основу были взяты методики Удовенко Г.В. и Терлецкой Н.В. и др. [4, 10]. Проростки выращивали в водной культуре. Стрессовые условия создавали добавлением сахарозы (17,6%) или NaCl (1,68%).

Введение зародышей в культуру *in vitro* и культивирование каллусов осуществляли по методике Гапоненко А.К. [3]. После двухмесячного культивирования, каллусы подвергали воздействию абиотических стрессов путем добавления в питательную среду полиэтиленгликоля (ПЭГ)-6000 (20%) или NaCl (1,5%). Экспозиция 1 месяц.

Фертильность и жизнеспособность пыльцы оценивали по Транковскому Д.А. [8]. Цитологические исследования тканей проводили на давленных препаратах по Паушевой З.П. [7]. Наблюдения вели на микроскопе «Micros MX-300» с видеонасадкой JL-vision.

Результаты и обсуждение

По определению E. Varlow [11], осмотическое регулирование – это приспособление клетки к изменяющимся условиям, которое достигается без изменения в тургоре и без уменьшения водного содержания. Солевой стресс, как и засуха, несет в себе осмотическую компоненту. Солетолерантные виды, благодаря способности создавать низкий внутриклеточный осмотический потенциал, могут проявлять устойчивость и в зонах водного стресса [12].

Визуально действие стресса в первую очередь проявляется в снижении ростовых характеристик. Существенное замедление роста может быть вызвано действием осмотического стресса на зоны деления и роста клеток кончика корня [14]. В условиях осмотического и солевого стрессов нами выявлено большое количество клеток корня со сгустившейся, «сжатой» цитоплазмой, а у менее устойчивых образцов – мертвых клеток (рис. 1). Отмечено снижение интенсивности деления клеток. Наблюдаемые цитологические реакции клеток первичных корешков на осмотический и солевой стресс были схожими.

Критическим периодом в водопотреблении у зерновых злаков является мейоз в микроспорангиях пыльника и формирование пыльцы. Поэтому наш интерес вызвала реакция на абиотические стрессы клеток генеративной сферы.

Выявлено, что высокий процент фертильности пыльцы (пыльца окрашена) сохранялся у злаков длительное время. Но при стрессах существенно изменялись осмотические характеристики пыльцевых зерен (рис. 2).

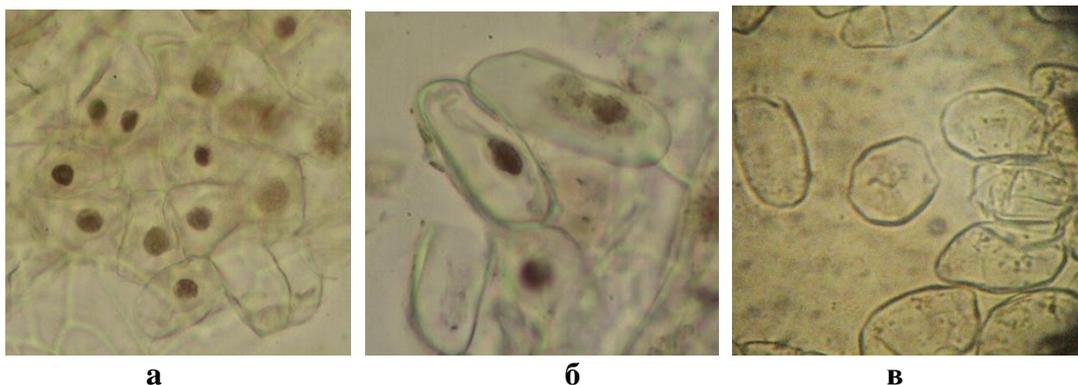


Рис. 1. Клетки корневого чехлика 7-дневных проростков ячменя: а – контроль; б – начало процесса плазмолиза (стресс); в – мертвые клетки (стресс) (ув. х 40)

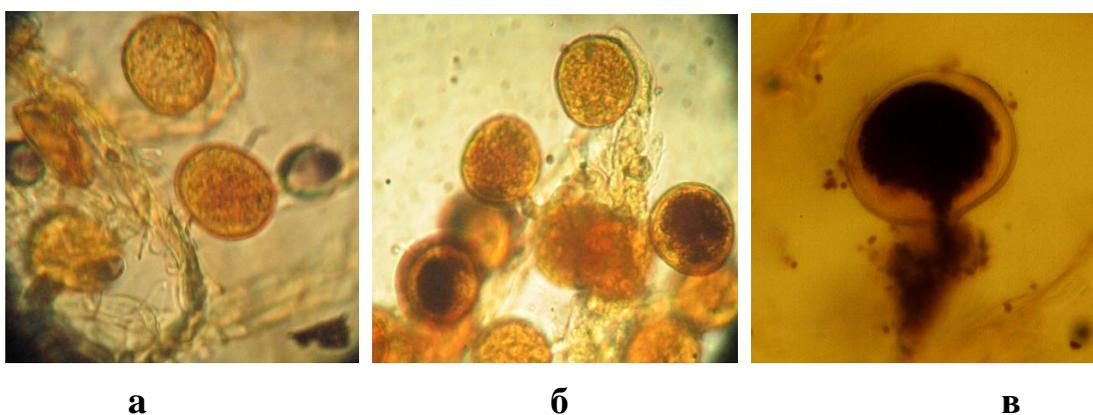


Рис. 2. Пыльцевые зерна зерновых злаков: а – рост пыльцевой трубки ячменя, контроль; б – плазмолиз в пыльцевых зернах ячменя, стресс (ув. х 10); в – лопающееся пыльцевое зерно пшеницы, стресс (ув. х 40)

В то время как в контроле пыльцевые зерна нормально проросли на рыльцах пестика, в условиях 1,5-3 часового воздействия стресса мы наблюдали плазмолиз, выражающийся в неравномерной окраске пыльцевых зерен и «сжатии» цитоплазмы. У менее устойчивых форм происходило лопанье пыльцевых зерен с вытеканием содержимого. При этом отмечено, что плазмолиз развивался идентичным образом у пшеницы и ячменя, но быстрее в пыльце колосьев, подвергнутых искусственной засухе нежели засолению.

Наблюдаемое в процессе исследований снижение жизнеспособности пыльцы зерновых злаков в условиях солевого и осмотического стрессов может привести к бесплодию цветков и череззернице в колосе. Мы считаем, что показатель развития процесса плазмолиза в стрессовых условиях может стать основой для цитологической характеристики и отбора соле- и засухоустойчивости зерновых злаков на уровне сформированной пыльцы. Устойчивыми или умеренно устойчивыми к засухе и засолению в наших исследованиях были формы, у которых плазмолиз пыльцевых зерен при их подсчете составил менее 50% по отношению к контролю.

В эксперименте *in vitro* рассмотрено действие осмотического и солевого стрессов на клетки каллусов пшеницы и ячменя.

Эмбриогенные каллусы, состоящие из мелких изодиаметрических клеток с плотной, богатой органеллами цитоплазмой и мелкими вакуолями, связанных в тканях с более крупными, сильно вакуолизированными клетками, формировали в контрольном варианте типичную меристематическую ткань. Действие стресса цитологически

проявлялось в том, что количество крупных вакуолизированных клеток значительно снижалось, развивался процесс плазмолиза. Наблюдалось насыщенное окрашивание клеток. Ядра сдвигались к периферии, цитоплазма сжималась, происходили дистрофические изменения клеточных структур – паранекроз. У неустойчивых форм отмечена массовая гибель клеток меристематической ткани, свидетельствующая о развитии процессов некробиоза и некроза. Соответственно сами каллусы уплотнялись, прекращалось нарастание биомассы, шли некротические преобразования, которые можно было наблюдать визуально (рис. 3).

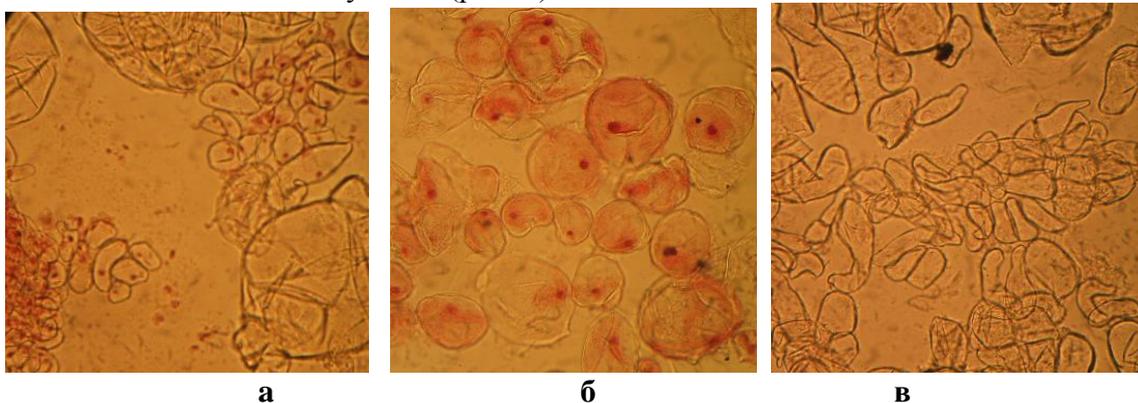


Рис. 3. Клетки меристематической ткани каллусов: а – контроль (ув. x 10); б – плазмолиз в условиях солевого стресса; в – мертвые клетки (ув x 40)

Наблюдаемые процессы реагирования на осмотический и солевой стрессы были идентичными.

Еще в 1940 г. Д.Н. Насоновым и В.Я. Александровым была сформулирована теория о неспецифической реакции клеток на повреждение, постулирующая тезис о том, что каким бы ни был повреждающий агент и на какие бы клетки он ни действовал, ответ клеток по ряду показателей будет одинаковым [6]. Результаты наших экспериментов *in vivo* и *in vitro* также показывают общность цитологических механизмов реагирования растительных клеток на действие абиотических стрессов.

Выводы

Особенностью патологических изменений в различных растительных клетках в ответ на рассмотренные абиотические стрессы является их сходство. Происходят нарушения, приводящие к ухудшению функционирования ткани и органа в целом – паранекрозу (помутнение цитоплазмы, вакуолизация, появление грубодисперсных осадков, усиление проникновения в клетку различных красителей). Если часть клеток погибла, а часть продолжает функционировать – наблюдается некробиоз, при тотальной гибели клеток – некроз. У генотипов, менее устойчивых к стрессу, эти изменения выражены сильнее.

На основании полученных результатов можно говорить о необходимости более активного использования цитологических методов в селекционном процессе для диагностики и отбора стрессоустойчивых форм важнейших сельскохозяйственных культур.

Список литературы

1. Арронет Н.И. Растительная клетка // Жизнь растений. В 6-и т. / Гл. ред. акад. А.Л. Тахтаджян. – М.: Просвещение, 1980 – Т. 1 – С. 25-48.
2. Быстров Р.А., Коваль В.С. Изменение солеустойчивости ячменя в результате выращивания гетерогаметной популяции на провокационном фоне // Генетика. – 1996. – Т. 32, № 12. – С. 1657-1660.

3. Гапоненко А.К., Маликова Н.И., Охрименко Г.Н., Созинов А.А. Получение соматоклональных линий у злаков (*Triticum aestivum* L. и *Hordeum vulgare* L.) // Докл. АН СССР. – 1985. – Т. 283. – С. 1471-1475.
4. Диагностика устойчивости растений к стрессовым воздействиям: Методическое руководство / Под ред. Удовенко Г.В. – Л.: ВИР, 1988. – 227 с.
5. Изучение засухоустойчивости мирового генофонда яровой пшеницы для селекционных целей: Методическое руководство / Составитель Кожушко Н.Н. – Л.: ВИР, 1991. – 90 с.
6. Насонов Д.Н., Александров В.Я. О причинах коллоидальных изменений протоплазмы и увеличения сродства ее к красителям под влиянием повреждающих воздействий // Арх. анат. гистол. эмбриол. – 1939. – Т. 22, № 1. – Сер. С. – С. 1-43.
7. Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. – М.: Колос, 1992, – 267 с.
8. Практикум по анатомии растений: Учеб. пособие для вузов / Под ред. Д.А. Транковского. – 3-е изд. – М.: Высш. школа, 1979. – 224 с.
9. Сергеева Л.Е. Изучение клеточных линий табака, устойчивых к солевому и водному стрессам, и регенерантов из них: Автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.13 / Ин-т физиологии растений и генетики АН УССР. – К., 1991. – 20 с.
10. Терлецкая Н.В., Жамбакин К.Ж., Исаков А.Р. К лабораторно-практическим занятиям по изучению засухоустойчивости растений: Методические указания. – Алматы: КазГАУ, 2003. – 16 с.
11. Barlow E.W.R. Water relations of expanding leaves // Aust. J. Plant Physiol. – 1986. – V. 13. – P. 45-58.
12. Farooq S. T., Farooq E.-A. Co-existence of salt and drought tolerance in Triticeae// Hereditas. – 2001. – V. 135, N 2-3. – P. 203-210.
13. Koval V.S., Bystrov R.A. Gametophytic selection for salt tolerance in barley // J. Exp. Bot. – 1996. – V. 47. – P. 52.
14. Shimazaki Y., Ookawa T., Hirasawa T. The Root Tip and Accelerating Region Suppress Elongation of the Decelerating Region without any Effects on Cell Turgor in Primary Roots of Maize under Water Stress // Plant Physiology. – 2005. – V. 139. – P. 458-465.

РОЗРОБКА УМОВ *IN VITRO* ДЛЯ ПРОГНОЗУВАННЯ ТОЛЕРАНТНОСТІ М'ЯКОЇ ПШЕНИЦІ ДО ГРИБІВ РІЗНИХ ВИДІВ РОДУ *ALTERNARIA* NEES

Т.В. ДЕНИСКО, С.О. ІГНАТОВА, доктор біологічних наук

Південний біотехнологічний центр в рослинництві УААН, Одеса

О.В. БАБАЯНЦ, кандидат біологічних наук

Селекційно-генетичний інститут – Національний центр насіннезнавства та сортовивчення

Вступ

Пшениця має надзвичайно важливе продовольче значення. Безумовно, від якості насіння залежить майбутній врожай, а від якості зерна, відповідно, продукти його переробки. Позаяк нині населення планети неухильно зростає, а площі сільськогосподарських угідь скорочуються, зараженість пшениці грибовими патогенами стає нагальною проблемою, яка привертає увагу вчених всього світу.

Результати 15-річних досліджень видового складу мікобіоти колосся озимої пшениці на півдні України, здійснені відділом фітопатології та ентомології (СПГ–НЦНС), показали, що видовий склад мікроміцетів, які заселяють колосся озимої пшениці, зазнає значних змін у зв'язку з кліматичними умовами, що складаються. Доведено, що за 2005-2007 рр. відбулось загальне збільшення кількості високопатогенних мікроміцетів сапрофітних видів,

у тому числі значно збільшилась частота виявлення видів роду *Alternaria* Nees у порівнянні з попередніми роками. Дослідження показали, що види роду *Alternaria* є одними з основних патогенів на зерні та насінні озимої пшениці в Україні на сьогоднішній день. Відмічено тенденцію щодо підсилення патогенних властивостей всередині роду *Alternaria* і прогнозується підсилення їх у подальшому [1, 5].

Alternaria – це досить поширений рід дейтеромицетів. У нормі види *Alternaria* є патогенами рослин (здебільшого овочевих культур) чи сапротрофами на органічних залишках, переважно рослинного походження. Види роду *Alternaria* є збудниками «чорного зародку» і листової плямистості зернових культур у багатьох країнах світу [4].

Основна небезпека, яку приховує в собі присутність видів *Alternaria* в зерні, – «забруднення» сільськогосподарської продукції вторинними метаболітами гриба, токсичними для рослин, тварин і людини. Токсини *Alternaria spp.* можуть бути тератогенними, токсичними для ембріонів, викликати гематологічні захворювання. В першу чергу такі метаболіти, як альтернаріол, монометилловий ефір альтернаріолу і теназолінова кислота, було виявлено в зерні пшениці в Європі, Північній Америці, Китаї та Австралії [3].

Існує ряд способів створення генетичного різноманіття рослин, та їх реалізація на практиці дозволить ефективно керувати ценозом пшениці з метою оптимізації його фітосанітарного стану. Стійкі до абіотичних та біотичних впливів сорти сільськогосподарських культур повністю вирішують задачі енерго- та ресурсозбереження, охорони біосфери від забруднення пестицидами та керування фітосанітарним станом агроєкосистем культур.

Одним із шляхів боротьби із захворюваннями сільськогосподарських культур є створення стійких до збудників хвороб сортів із використанням нетрадиційної селекції, заснованої на біотехнологічному доборі *in vitro* толерантних біотипів, які виникають адаптивно в ході мікроеволюційних процесів, що відбуваються в популяціях. При цьому досягається збереження чистоти екосистеми та отримання стійких сортів рослин, що виключає застосування хімічних засобів боротьби із захворюваннями.

Важливим етапом створення стійких сортів є можливість проведення експрес-оцінки пшениці на стійкість до альтернаріозу, що дозволяє в лабораторних умовах прискорено оцінити селекційний матеріал на стійкість до грибів роду *Alternaria* та виявити рослини з підвищеною стійкістю до цього патогену [6].

Метою даної роботи було проведення первинного скринінгу ізолятів грибів роду *Alternaria* із колекції лабораторії фітопатології СГІ-НЦНС на токсигенність для подальшої розробки методологічних підходів до побудови *in vitro* біотехнології оцінки та добору форм м'якої пшениці, стійких до альтернаріозу.

Об'єкти та методи дослідження

До роботи було залучено 11 ізолятів грибів роду *Alternaria*, які належать до видів *A. tenuissima*, *A. triticina*, комплексу видів *A. infectoria*, та фільтрати культуральної рідини цих ізолятів (ФКР). Біотестування проводили на двох біологічних системах – зрілому насінні та зародках, виділених із нього. В якості тест-об'єктів використовували сорти озимої м'якої пшениці селекції СГІ-НЦНС, що контрастно різняться за польовою фітопатологічною оцінкою рівня стійкості до грибного патогену: толерантний до альтернаріозу – сорт Скарбниця, чутливий – сорт Сирена.

Токсигенні властивості ізолятів вивчали у подвійній культурі (зріле насіння + культура гриба та ізольовані зародки зрілого насіння + культура гриба). Фітотоксичну дію фільтратів культуральної рідини у концентрації 30 та 50% від об'єму середовища тестували на ізольованих зрілих зародках пшениці. Насіння для дослідів стерилізували 70% спиртом 10 хв, 2,5% розчином гіпохлориту натрію (комерційний засіб «Білизна») – 20 хв, після чого промивали розчином 0,01-н НСІ протягом 10 хв та дистильованою водою (4 рази). Для

виділення зрілих зародків та підготовки цільного насіння для досліду чашки Петрі зі стерильним насінням попередньо вміщували на добу до холодильника за температури 2°C.

У процесі отримання подвійної культури один мікологічний гачок 7-денних культур ізолятів грибів роду *Alternaria*, які вирощували за 24°C на поживному середовищі Чапека, висівали в чашки Петрі на агаризовану (8 г/л агар-агару) поверхню без додаткових елементів. Одночасно з ізолятами висівали насіння та ізольовані зародки. Дослідні біосистеми (насіння + культура гриба та ізольовані зародки + культура гриба) культивували за температури 24°C у темряві протягом 10 діб – від проростання до формування паростків.

Для отримання ФКР ізоляти грибів роду *Alternaria* культивували на рідкому середовищі Чапека з половинним вмістом глюкози (15г/л). Потім рідину відділяли від міцелію гриба та стерилізували, використовуючи фільтр Millipore (діаметр пор – 0,22 мкм). Стерильні ФКР додавали до поживного середовища MS із половинним вмістом всіх складових елементів у концентрації 30 та 50% від об'єму. Ізольовані зародки культивували на середовищах із ФКР 10 діб за температури 24°C.

Оскільки рівень схожості є важливим індикатором життєздатності насіння, його можна використовувати як первинний показник реакції зародка на дію факторів у культурі *in vitro* та як показник рівня токсигенності ізоляту патогена. Критеріями для оцінки реакції зародків на вплив патогенів та ФКР були рівень пророслих (на третю добу культивування) зародків, довжини частин паростка (корінець, колеоптіль) у досліджуваних зразків пшениці відносно цих показників у контролі.

Результати та обговорення

Дві системи подвійної культури (зріле насіння + культура гриба та ізольовані зародки зрілого насіння + культура гриба) є однаково інформативними щодо рівня пророслих на третю добу культивування зародків. На рис. 1 наведено дані щодо рівня пророслих на третю добу культивування ізольованих зародків зрілого насіння сортів Сирена та Скарбниця при кокультивуванні з 11 ізолятами грибів роду *Alternaria*.



Рис. 1. Проростання ізольованих зародків пшениці в умовах подвійної культури з ізолятами грибів роду *Alternaria* (% щодо контролю)

Показник проростання зародків стійкого до альтернаріозу сорту Скарбниця – у середньому 52%, що є на 20% вище від показника чутливого сорту Сирена (у середньому 32%). 6 із 11 досліджуваних ізолятів виявились високотоксигенними (показник проростання зародків чутливого сорту Сирена – 9-26%, стійкого сорту – 27-43%). Показник рівня пророслих на 3 добу зародків в умовах подвійної культури виявляє відповідність толерантності паростків фітопатологічній оцінці модельних генотипів, що дозволяє прогнозувати використання цієї системи для експрес-оцінки пшениці на стійкість до альтернаріозу.

Дані про довжини частин паростка (корінець, колеоптіль) наведено на рис. 2, 3.

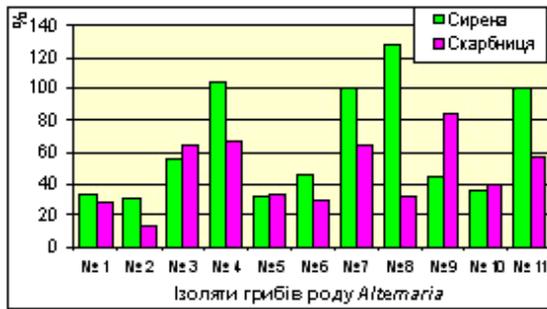


Рис. 2. Вплив грибів роду *Alternaria* на ріст колеоптиля (% щодо контролю)

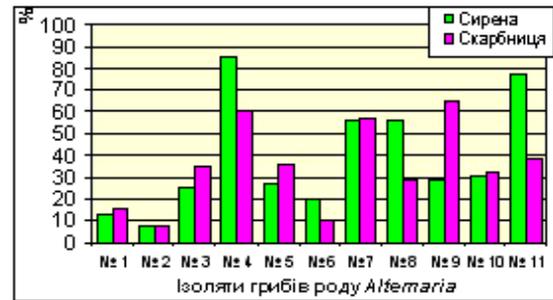


Рис. 3. Вплив грибів роду *Alternaria* на ріст головного корінця (% щодо контролю)

Критерій оцінки довжини частин 10-денного паростка в системі ембріокультура + патоген є інформативним для скринінгу ізолятів, але не для оцінки пшениці на стійкість, хоча свідчить, за даними Шакірової [7], про особливості патогенезу гемібіотрофних грибів.

ФКР усіх ізолятів у концентрації 30 та 50% від об'єму живильного середовища виявляли фітотоксичну активність щодо паростків пшениці чутливого сорту Сирена. Для стійкого сорту Скарбниця токсичною виявилась концентрація 50% (рис. 4, 5).

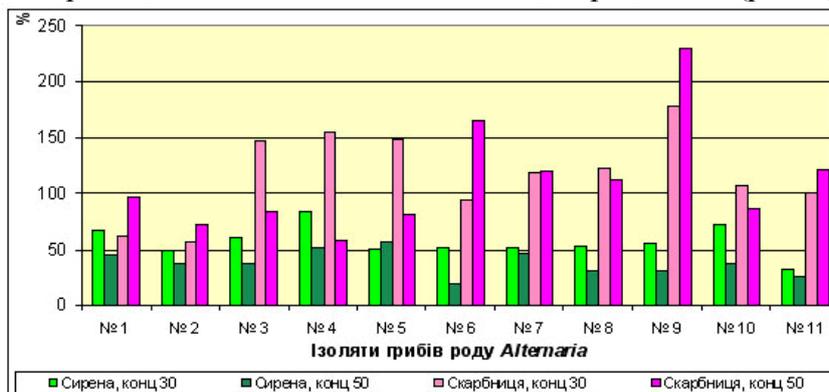


Рис. 4. Вплив ФКР ізолятів грибів роду *Alternaria* у концентрації 30 та 50 % на ріст колеоптиля (% щодо контролю)

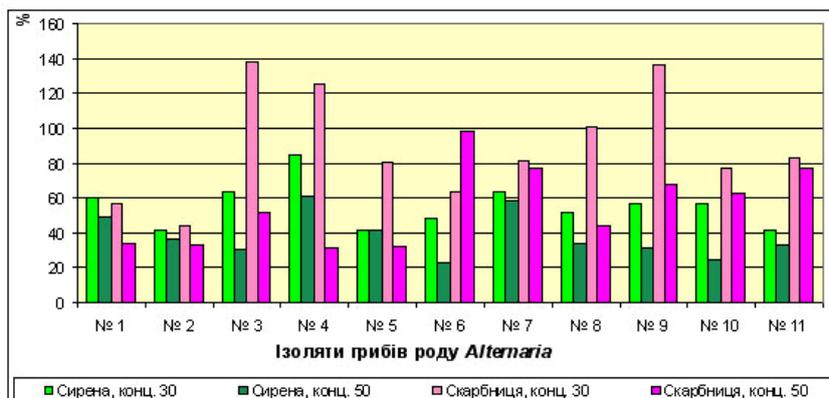


Рис. 5. Вплив ФКР ізолятів грибів роду *Alternaria* у концентрації 30 та 50 % на ріст головного корінця (% щодо контролю)

Аналіз та узагальнення отриманих даних дозволяє рекомендувати дану систему як для оцінки токсигенності ізолятів, так і для оцінки толерантності експлантів до дії ФКР. Селективною концентрацією його може служити концентрація 30%.

Висновки

Результати даних досліджень можна використовувати для побудови тест-системи *in vitro* для первинного скринінгу ізолятів грибів роду *Alternaria* на токсигенність та добору толерантних до альтернативу форм озимої м'якої пшениці. Було розроблено умови проведення роботи *in vitro* та відібрано для подальших досліджень найбільш токсигенні ізоляти.

Список літератури

1. Бабаянц О.В. Видовой состав и вредоносность микробиоты колосьев озимой пшеницы южной степи Украины // Актуальные проблемы иммунитета и защиты сельскохозяйственных культур от болезней и вредителей: Тез. докл. Междунар. научно-практической конференции СГІ-НЦНС, 11-14 вересня 2007 р. – Одеса: КП ОМД, 2007 р. – С. 42.
2. Ганнибал Ф.Б., Левитин М.М. Видовое и внутривидовое разнообразие токсигенных грибов рода *Alternaria* // Успехи медицинской микологии: Материалы IV Всероссийского конгресса по медицинской микологии. – М.: Национальная академия микологии, 2006. – Т. VII. – С. 7-8.
3. Ганнибал Ф.Б. Токсигенность и патогенность грибов рода *Alternaria* для злаков // Лаборатория микологии и фитопатологии им. А.А. Ячевского ВИЗР. История и современность / Под ред. А.П. Дмитриева. – СПб: ВИЗР, 2007. – С. 82-93.
4. Ганнибал Ф.Б. Виды рода *Alternaria* в семенах зерновых культур в России // Микология и фитопатология. – 2008. – Т. 42, Вып. 4. – С. 359-368.
5. Никифорова Е.А. Фитопатологическое состояние семян озимой мягкой пшеницы в зоне южной степи Украины // Актуальные проблемы иммунитета и защиты сельскохозяйственных культур от болезней и вредителей: Тез. докл. Междунар. научно-практической конференции СГІ-НЦНС, 11-14 вересня 2007 р. – Одеса: КП ОМД, 2007 р. – С. 17.
6. Ткачёва А.А., Поляков А.В., Бирюкова Н.К. Усовершенствованный метод оценки селекционного материала огурца на устойчивость к фузариозному увяданию // Проблемы научного обеспечения овощеводства юга России: Матер. Междунар. научно-практической конференции КНИИОКХ РАСХН, 4-7 сентября 2004 г. – Краснодар, 2004 г. – С. 70-75.
7. Шакирова Ф.М. Неспецифическая устойчивость растений к стрессовым факторам и её регуляция. – Уфа: Гилем, 2001. – 160 с.

ОЦЕНКА УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ ПШЕНИЦЫ К ФИТОПАТОГЕНАМ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СОВМЕСТНЫХ КУЛЬТУР

И.В. МАКСИМОВ, доктор биологических наук;

О.Б. СУРИНА, кандидат биологических наук;

Н.Б. ТРОШИНА, доктор биологических наук

Учреждение Российской академии наук Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, Уфа, Россия

Введение

Сложность оценки устойчивости растений к патогенам в полевых условиях связана с их многообразием. В связи с этим в исследованиях фитоиммунологов используются способы культивирования конкретных патогенов на растениях, поражаемых органах и каллусной культуре. Причем сроки оценки устойчивости растений с начала опыта могут занимать длительный период, связанный как с онтогенезом растений, так и с периодом вегетации. Например, возбудители твердой и пыльной головки пшеницы развиваются в растениях бессимптомно вплоть до формирования у них генеративных органов, что

приводит к полному уничтожению потенциального урожая с инфицированных участков. Отсутствие симптомов болезней на растениях вызывает трудности не только в изучении физиологии взаимодействия растений с этими патогенами, но и в поиске новых средств защиты против них. Кроме возбудителей головни проблемными патогенами в современном растениеводстве на пшенице являются различные возбудители болезней, проявляющиеся в период вегетации растений. До сих пор наиболее эффективным, но, в то же время, экологически небезопасным методом защиты от патогенов, является обработка семян различными протравителями, а посевов – фунгицидами.

Для решения проблем селекции зерновых культур на устойчивость к патогенам уже давно используются каллусные культуры, растущие на фоне культурального фильтрата грибов [2, 7, 15]. Сведений о результатах совместного культивирования каллусов злаковых с грибными фитопатогенами в литературе очень мало. Одна из известных работ – исследование Каур с соавторами [11], получившими совместную культуру каллуса пшеницы с возбудителем карнальской (индийской) головни.

Салициловая кислота (СК) и препараты хитоолигосахариды (ХОС) являются признанными индукторами устойчивости растений [4, 6, 12, 13, 17], с чем, в частности, связывают реализацию индуцированной системной приобретенной устойчивости [14, 16]. Можно полагать, что повышение устойчивости растений, предобработанных СК и ХОС, связано с индукцией в них накопления H_2O_2 [3, 8]. Воздействие этих соединений на устойчивость растений и каллусов пшеницы к ряду патогенов почти не исследовано.

Цель этой работы – анализ полученных нами в лаборатории данных по формированию совместных культур клеток и тканей пшеницы с наиболее вредоносными болезнями.

Объекты и методы исследования

В качестве эксплантов для получения каллусов использовали незрелые зародыши пшеницы *Triticum aestivum* L. сорта Жница и пшеницы *T. timopheevii* Zhuk. (образец К-58666 из коллекции Всесоюзного НИИ растениеводства им. Н.И. Вавилова, С-Петербург). Зародыши пшеницы изолировали через 12-15 сут после начала цветения растений из сформировавшихся зерновок. Изолированные зародыши высаживали на среду Мурасиге и Скуга (МС) и культивировали при 26°C в темноте. Через 30 сут образовавшиеся каллусы весом 200 ± 10 мг пересаживали на свежую питательную среду МС без фитогормонов.

Для получения совместной культуры каллусов пшеницы и возбудителей головневых грибов каллусы спустя 3 сут после 2-го пассажа инфицировали телиоспорами грибов *T. caries* Tul. или *U. tritici* Jens. Инфекционная нагрузка на каждый из исследуемых каллусов составила по 80-100 телиоспор грибов. В случае *T. caries* для инициации прорастания спор, инфицированные каллусы культивировали при температуре 10-12°C в течение 3 сут, после чего каллусы культивировали при комнатной температуре. В случае *U. tritici* это не требовалось. Морфологическую оценку совместных культур каллусов с грибами проводили в течение 60 суток. Интенсивность развития гриба в каллусах оценивали по площади поверхности каллусов, покрытой мицелием гриба, по глубине проникновения гриба в каллус (% от диаметра каллуса) и по количеству образуемых спор.

Оценку развития септориоза проводили на отрезках листьев 7-суточных проростков мягкой пшеницы сорта Жница после инокуляции суспензией пикноспор *S. nodorum* (10^6 спор/мл)

С целью повышения устойчивости растений и каллусов пшеницы к возбудителям грибных болезней использовали препарат 0,1 мг/л ХОС (М.м. 7,5 кД, степень ацетилирования 65 %), 0,05 мМ СК.

Генерацию H_2O_2 в растениях и каллусах пшеницы оценивали по количеству клеток,

окрашенных 3,3-диаминобензидином (ДАБ). Для этого растительный материал переносили в раствор ДАБ (1,5 мг/мл) с добавлением 2,5 мМ щавелевой кислоты по методикам, приведенным в работах [9, 10, 18].

Результаты и обсуждение

Споры *T. caries* и *U. tritici* прорастали исключительно на участках рыхлого каллуса (рис. 1 а, г). Мицелий грибов рос не только по поверхности каллусов, но и в межклеточных пространствах рыхло расположенных паренхимоподобных клеток (рис. 1 б, д), однако плотные участки каллусов и ризоиды патогенами не инфицировались. Развитие грибов на участках рыхлого каллуса с большими межклеточниками и предопределило, вероятно, успех в создании совместных культур каллуса пшеницы с возбудителями головневых. Через 60 сут после инокуляции в каллусах образовывались споры грибов (рис. 1 в, е). Таким образом, в созданной нами совместной культуре каллуса пшеницы с возбудителями твердой и пыльной головни прослежен полный цикл развития грибов от прорастания спор до образования новых спор.

Нами была оценена устойчивость каллусов образца *T. timopheevii*, иммунного к возбудителю твердой головни, и каллусов мягкой восприимчивой пшеницы сорта Жница к грибу *T. caries*. Обнаружено различие в скорости роста гриба в каллусах этих образцов пшеницы. Так, в каллусах восприимчивого образца споры начинали прорастать через 5 сут после инокуляции, а в каллусах иммунного образца – через 12 суток. Более того, глубина проникновения гриба в каллусы иммунного образца в ходе инфицирования была заметно меньшей, чем в каллусы восприимчивого сорта (табл.).

Аналогичные результаты были получены и при анализе развития на каллусах воздушного мицелия *T. caries* (см. табл.). Медленное развитие гриба *T. caries* в каллусах *T. timopheevii* завершалось образованием небольшого количества спор в отличие от восприимчивого образца (рис. 2).

Нами установлено, что в каллусах не только восприимчивого, но и иммунного образцов пшеницы возбудитель твердой головни проходит полный цикл развития вплоть до образования спор. Это говорит об организменном уровне организации защиты растений пшеницы от головневых. Однако, в связи с тем, что скорость роста гриба *T. caries* в каллусах восприимчивой пшеницы в ходе совместного культивирования значительно превышала таковую в каллусах иммунной, данная модель может быть использована для сравнительной оценки устойчивости образцов этой культуры к головневым.

Важно подчеркнуть, что по количеству паренхимоподобных клеток, генерирующих H_2O_2 , инфицированные каллусы восприимчивого и иммунного образцов пшеницы различались. Так, если каллусы восприимчивого образца *T. aestivum* сорта Жница характеризовались относительно низким значением этого показателя (26% клеток), то у каллусов иммунного образца пшеницы *T. timopheevii* К-58666 он составил 38% клеток. Следовательно, полученные результаты обнаруживают некую аналогию в развитии ответных реакций у клеток паренхимы нативных растений и подобных им клеток каллусов пшеницы.

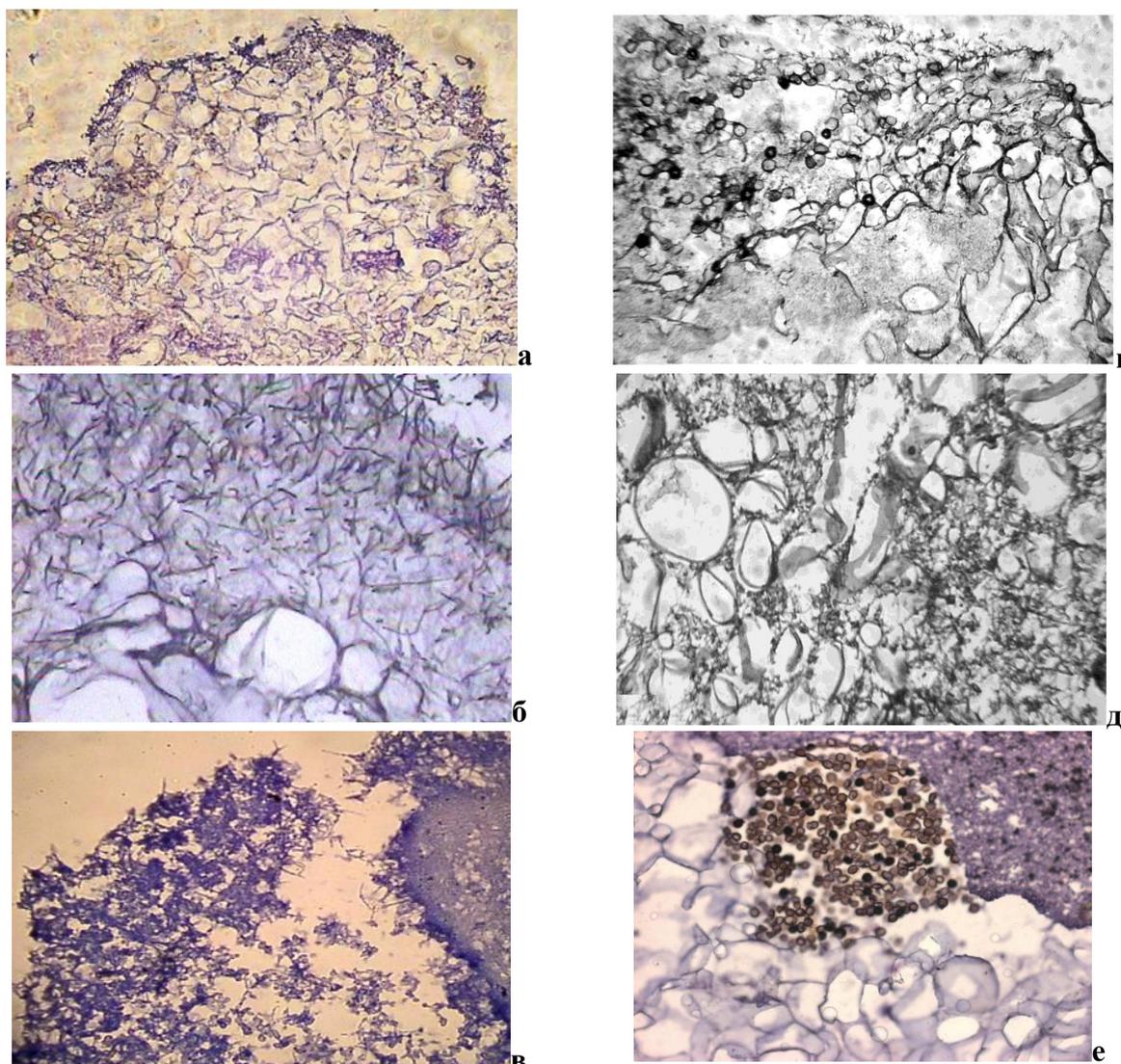


Рис. 1. Рост и развитие *U. tritici* (а-в) и *T. caries* (г-е) на каллусах *T. aestivum* сорта Жница: а, г – прорастание спор, 10 сут после инокуляции; б, д – распространение грибов по межклетникам паренхимоподобных клеток, 30 сут после инокуляции; в, е – образование новых спор грибов, 60 сут после инокуляции. Окрашивание метиленовым синим. Увеличение а – х 200; б-е – х 400

Таблица
Параметры роста и развития *T. caries* в каллусах пшеницы в разные сроки после инокуляции

Параметр роста гриба	Время после инокуляции, сут	Каллус <i>T. aestivum</i> сорт Жница	Каллус <i>T. timopheevii</i> к-58666
Размер инфицированных зон, % к диаметру каллуса	20	14.5±1.2	11.0±0.9
	40	29.3±2.0	18.4±1.2
	60	51.1±3.7	22.6±1.8
Толщина воздушного мицелия, % к диаметру каллуса	20	6.6±0.6	3.8±0.7
	40	10.2±1.0	8.7±0.5
	60	15.7±1.3	10.2±0.8

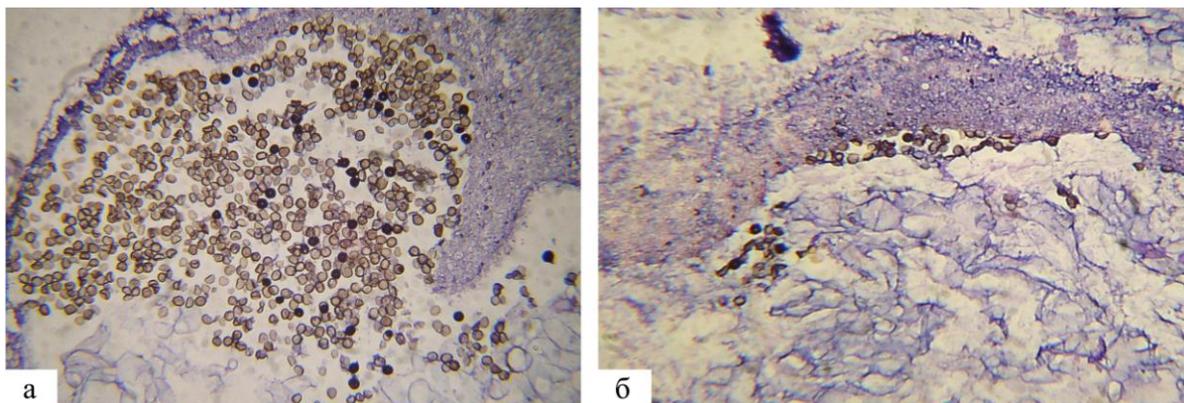


Рис. 2. Образование спор *T. caries* в каллусах *T. aestivum* сорта Жница (а) и образца *T. timopheevii* К-58666 (б). 60 суток опыта, увеличение х 400

Была проведена оценка влияния СК и ХОС на устойчивость каллусов и листьев пшеницы сорта Жница, инфицированных возбудителями головни и септориоза в связи с продукцией в них H_2O_2 .

Введение в среду для культивирования ХОС индуцировало в каллусах ризогенез (рис. 3 I-б), что подтверждает их способность усиливать корнеобразование [5]. Культивирование каллусов на среде, содержащей СК, приводило к уменьшению их диаметра за счет увеличения числа плотных участков (рис. 3 I-в, I-д) и уменьшения рыхлых (рис. 3 I-в, I-д). Инфицирование каллусов также инициировало ризогенез. Это может быть обусловлено выявленной ранее нами способностью головневых грибов к продукции ИУК-подобных соединений [2]. Мицелий грибов рос на каллусах довольно быстро, при этом введение в среду для культивирования каллусов каждого из изучаемых нами индукторов устойчивости приводило к замедлению роста мицелия в каллусах (рис. 3, II-б, II-в, II-д).

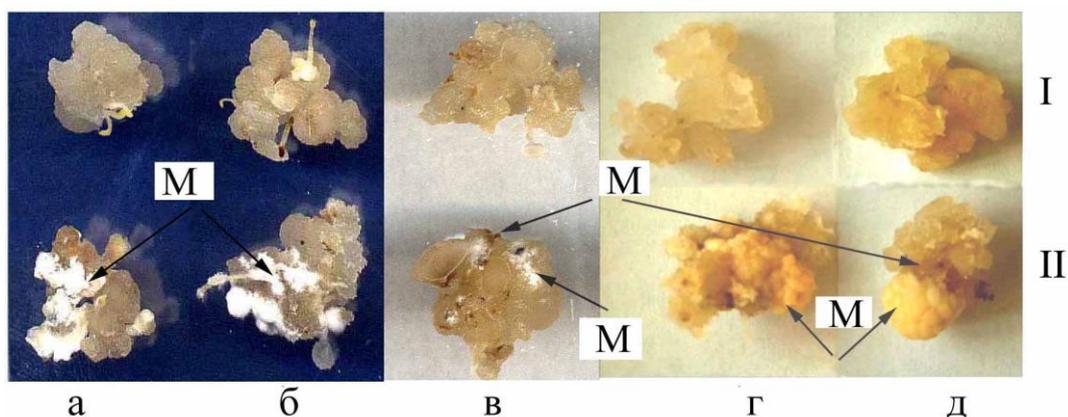


Рис. 3. Влияние хитоолигосахаридов и салициловой кислоты на устойчивость каллусов *T. aestivum* сорта Жница, инфицированных возбудителем твердой головни *T. caries* (а-в) и возбудителем пыльной головни *U. tritici* (г, д): I – контроль, II – инфицирование; а, г – среда МС, б – МС+ХОС; в, д – МС+СК (20 сут после инокуляции, М – мицелий грибов)

В инфицированных грибом *T. caries* паренхимоподобных клетках каллусов, расположенных рыхло, в отличие от таковых в контроле, регистрировали генерацию H_2O_2 (30% клеток). При инкубировании каллусов на среде МС в присутствии СК и ХОС и последующем инфицировании патогеном количество клеток, генерирующих H_2O_2 , увеличилось до 50%. Это коррелировало с подавлением роста мицелия гриба на каллусах. Таким образом, культивирование каллусов пшеницы в присутствии

индукторов устойчивости и последующее их инфицирование способствовало усилению генерации H_2O_2 в паренхимоподобных клетках, подавлению роста мицелия головневых и иницированию появления не поражаемых патогенами плотных участков и ризоидов.

Анализ интенсивности генерации АФК клетками листьев пшеницы, инфицированными грибом *S. nodorum*, показал, что в контроле генерацию H_2O_2 обнаруживали только в зоне сосудистых пучков, а при инфицировании регистрировали и в зоне нанесения пикноспор гриба *S. nodorum* (рис. 4 А).

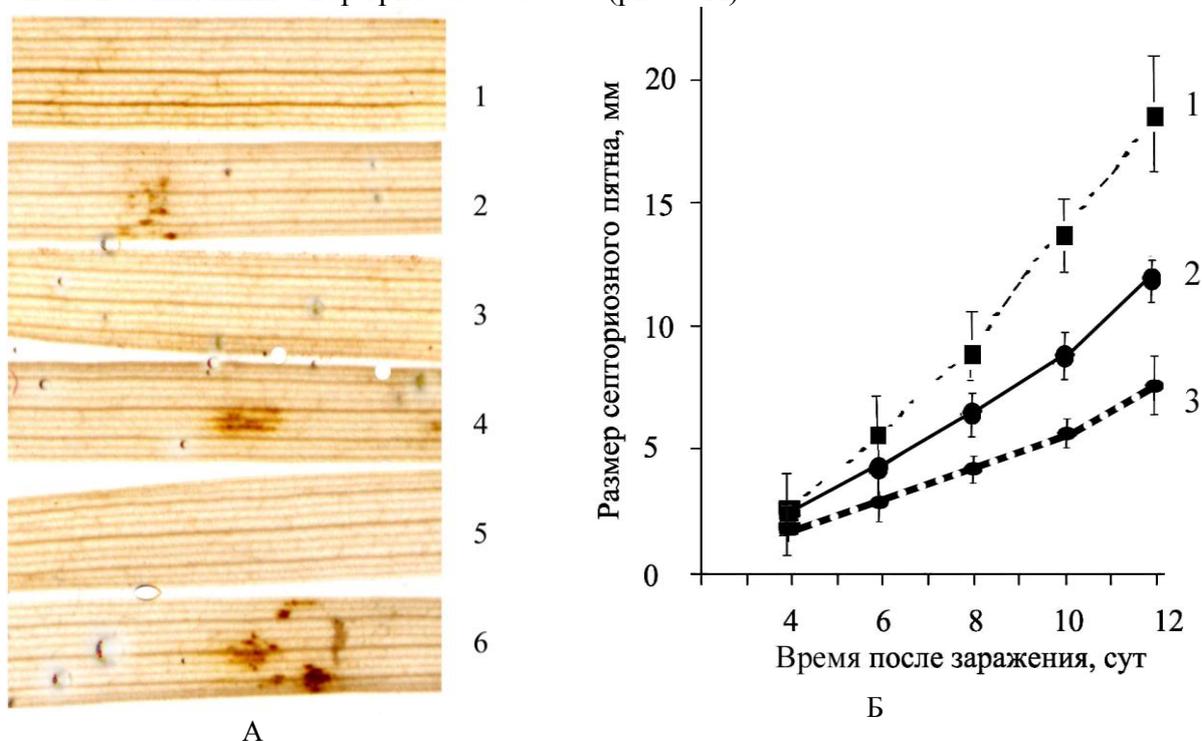


Рис. 4. Влияние салициловой кислоты и хитоолигосахаридов на интенсивность генерации H_2O_2 в листьях пшеницы *T. aestivum* сорта Жница, инфицированных *S. nodorum*: (А) 1 – контроль; 2 – *S. nodorum*; 3 – СК; 4 – СК+*S. nodorum*; 5 – ХОС; 6 – ХОС+*S. nodorum*. Окраска 3,3 – диаминобензидином DAB) и развитие симптомов септориоза (Б) 1 – *S. nodorum*, 2 – СК+*S. nodorum*, 3 – ХОС+*S. nodorum*

Предобработка индукторами устойчивости приводила к возрастанию количества клеток мезофилла, продуцирующих H_2O_2 . Это коррелировало с эффектом снижения в листьях степени развития симптомов септориоза (рис. 4 Б). Таким образом, продукция H_2O_2 в клетках растений пшеницы, обнаруживаемая в зоне роста возбудителей грибных болезней, является одним из факторов, защищающих растения от патогенов.

Выводы

Нами разработаны и усовершенствованы методы культивирования патогенных грибов, вызывающих септориоз и головню злаковых на каллусных культурах и отрезках листьев. Показана возможность длительного совместного культивирования каллусов пшеницы с возбудителями твердой (*T. caries*) и пыльной головни (*U. tritici*). Прослежен полный цикл развития грибов от прорастания спор до формирования новых как на листьях, так и на каллусах пшеницы. Обнаружено подавление под влиянием индукторов устойчивости гипертрофированного роста каллусов, вызванного биотрофами, а также получены данные об индукции активности генерации H_2O_2 в тканях растений и каллусах. Таким образом, совместные культуры клеток и тканей растений пшеницы с возбудителями грибных болезней следует рассматривать как удобную модель для скрининга защитных препаратов.

Список литературы

1. Карабаев М.К., Джардемалиев Ж.К. Культивируемые клетки пшеницы и кукурузы. Морфогенез и толерантность // Физиология растений. – 1994. – Т. 41, № 6. – С. 807-814.
2. Влияние твердой головни на рост проростков и каллусов пшеницы / Максимов И.В., Трошина Н.Б., Хайруллин Р.М., Сурина О.Б., Ганиев Р.М. // Физиология растений. – 2002. – Т. 49, № 5. – С. 767-772.
3. Влияние салициловой кислоты на активность пероксидазы в совместных культурах каллусов пшеницы с возбудителем твердой головни *Tilletia caries* (DC.) Tul. / Максимов И.В., Черепанова Е.А., Сурина О.Б., Сахабутдинова А.Р. // Физиология растений. – 2004. – Т. 51, № 4. – С. 534-540.
4. Озерецковская О.Л., Роменская И.Г. Олигосахарины как регуляторные молекулы растений // Физиология растений. – 1996. – Т. 43, № 5. – С. 843-852.
5. Поликарпова Ф.Я., Паворва А.Ю., Борисова А.А. Влияние лактата хитозана на индукцию ризогенеза в стеблевых черенках садовых культур // Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана. – М.: ВНИРО, 2003. – С. 108-111.
6. Шакирова Ф.М. Неспецифическая устойчивость растений к стрессовым факторам и ее регуляция. – Уфа: Гилем, 2001. – 160 с.
7. Шаяхметов И.Ф., Асфандиярова Р.Р. Влияние фитотоксичных метаболитов *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) SH. на рост каллусной ткани и регенерацию растений пшеницы // Физиология растений. – 1991. – Т. 38, № 2. – С. 399-405.
8. Alvarez M.E. Salicylic acid in the machinery of hypersensitive cell death and disease resistance // Plant Mol. Biol. – 2000. – V. 44. – P. 429-442.
9. Caliskan M., Cuming A.C. Spatial specificity of H₂O₂-generating oxalateoxidase gene expression during wheat embryo germination // Plant J. – 1998. – V. 15. – P. 165-171.
10. Ganesan V., Thomas G. Salicylic acid response in rice: influence of salicylic acid on H₂O₂ accumulation and oxidative stress // Plant Sci. – 2001. – V. 160. – P. 1095-1106.
11. Coculture of wheat callus and cell suspension with *Neovossia indica* / Kaur S., Malhotra A., Aujla S.S., Gill K.S. // Ind. J. Exp. Biol. – 1990. – V. 28. – P. 193-194.
12. Kauss H., Jeblick W. Influence of salicylic acid on the induction of competence for H₂O₂ elicitation. Comparison of ergosterol with other elicitors // Plant Physiol. – 1996. – V. 111. – P. 755-763.
13. Kawano T. Roles of the reactive oxygen species-generating peroxidase reactions in plant defense and growth induction // Plant Cell Rep. – 2003. – V. 21. – P. 829-837.
14. Kawano T., Furuichi T. Salicylic acid as a defense-related plant hormone: Roles of oxidative and calcium signaling paths in salicylic acid biology // Salicylic acid: A plant Hormone / Ed. Hayat S., Ahmad A. – Springer Netherlands, 2007. – P. 277-322.
15. Plazek A., Skrzypek E., Zur I. The change of heat emission and phenolic compound level in *Hordeum vulgare* L. and *Festuca pratensis* Huds. calli treated with *Bipolaris sorokiniana* Sacc. Shoem. pytotoxins // J. Agronomy and Crop Science. – 2000. – V. 184. – P. 17-21.
16. Ryals J.A., Neuenschwander U.H., Willits M.G. Systemic acquired resistance // Plant Cell. – 1996. – V. 8. – P. 1809-1819.
17. Shakirova F.M., Sakhabutdinova A.R., Bezrukova M.V. Changes in hormonal status of wheat seedlings induced by salicylic acid and salinity // Plant Sci. – 2003. – V. 164. – P. 317-322.
18. Vierheilig H., Schweiger P., Brundrett M. An overview of methods for the detection and observation of arbuscular mycorrhizal fungi in roots // Physiol. Plant. – 2005. – V. 125. – P. 393-404.

РАЗРАБОТКА МЕТОДА ЭФФЕКТИВНОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ ЯЧМЕНЯ (*HORDEUM VULGARE* L.) С ПОМОЩЬЮ *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*

И.В. ТАНАСИЕНКО; А.И. ЕМЕЦ, кандидат биологических наук;
Я.Б. БЛЮМ, доктор биологических наук

Институт пищевой биотехнологии и геномики НАН Украины, Киев

Введение

К наиболее широко используемым методам генетической трансформации растений относятся методы прямого переноса ДНК и *Agrobacterium*-опосредованная трансформация, хотя каждый из них имеет как свои недостатки, так и преимущества. Методы прямого переноса ДНК, в частности биолисточеская трансформация, не являются видоспецифичными, в то время как агробактериальная трансформация используется в основном для усовершенствования конкретных генотипов двудольных растений. Однако с момента успешной трансформации риса в 1994 г. [6] метод агробактериальной трансформации начали все шире использовать для трансформации злаковых, которые не являются такими же восприимчивыми к *A. tumefaciens*, как двудольные [15]. Преимущество агробактериального метода трансформации также состоит в переносе ограниченного количества вставок ДНК в геном реципиента [17] по сравнению с биолисточеской трансформацией, для которой характерно встраивание большого количества копий гена-«интереса» [10], что может приводить к так называемому «молчанию генов».

После получения в 1997 г. первых трансформированных фертильных растений ячменя (*Hordeum vulgare* L.) с помощью метода агробактериальной трансформации [15] данный метод стал успешно применяться для улучшения хозяйственных характеристик данной культуры [13]. Однако до сих пор не разработан универсальный протокол генетической трансформации ячменя, который был бы применим не только для трансформации модельных, но и коммерческих сортов. Одна из причин, усложняющих процесс разработки подобного протокола, состоит, прежде всего, в генотипической зависимости регенерационного потенциала ячменя [9]. В связи с этим для разработки эффективной методики агробактериальной трансформации нами ранее было протестировано восемь элитных сортов ячменя, районированных на территории Украины [2].

Целью данной работы была разработка эффективного протокола агробактериальной трансформации ячменя с дополнительным использованием ультразвука и вакуум-инfiltrации.

Объекты и методы исследования

Растительный материал. В качестве эксплантов использовали зрелые зародыши семян ячменя сорта Гетьман, любезно предоставленного Институтом земледелия УААН Украины. Стерилизацию растительного материала проводили в соответствии с ранее описанной методикой [2]. Изолированные щитки ячменя высаживали на среду для индукции каллусообразования [2]. Экспланты культивировали в условиях рассеянного освещения при температуре 24-26°C и 16-часовом фотопериоде. Экспланты, достигшие размеров 0,5-0,8 см, использовали для дальнейшей трансформации.

***Agrobacterium*-опосредованная трансформация.** Для агробактериальной трансформации использовали супервирулентный штамм *A. tumefaciens* ЕНА 105, который содержал плазмиду pVECKS.GUSint, несущую репортерный *gus*-ген под контролем 35S промотора. Бактерию выращивали в течение двух суток на среде LB [11] с добавлением 50 мг/л рифампицина, 100 мг/л карбенициллина и 100 мг/л

спектиномицина при температуре 28°C и постоянном качании на орбитальном шейкере. Перед началом трансформации в бактериальную суспензию добавляли 200 мкМ ацетосерингона.

Для достижения оптимальных условий трансформации тестировали влияние таких дополнительных физических параметров, как: ультразвук (1-3 с), вакуум-инфильтрация (20 мин), последовательное воздействие ультразвука (1-3 с) и вакуум-инфильтрации (20 мин). В качестве контроля использовали инокуляцию эксплантов бактериальной суспензией без дополнительных обработок.

Гистохимический анализ. Для подтверждения переноса плазмидной ДНК в клетки-мишени на вторые сутки после трансформации проводили GUS-тест на наличие транзientной экспрессии гена β -глюкуронидазы в клетках эксплантов. Для этого осуществляли гистохимический анализ с использованием раствора X-Gluc [7]. Эффективность трансформации определяли по количеству образовавшихся синих точек на эксплант, подсчет которых проводили под бинокляром.

Статистическую обработку данных проводили согласно методу Лакина [1].

Результаты и обсуждение

Известно, что важной предпосылкой для создания успешной системы трансформации какого-либо определенного вида растений является наличие высокоэффективной системы регенерации побегов в культуре *in vitro*. Ранее для определения регенерационного потенциала районированных в Украине сортов ячменя отечественной и зарубежной селекции нами была проведена оценка их способности к каллусогенезу и регенерации растений в условиях *in vitro* [2] (рис. 1). Был отобран ряд генотипов, обладающих высоким регенерационным потенциалом. Поскольку одним из таких сортов оказался сорт Гетьман, характеризующийся высоким эмбриогенным и регенерационным потенциалом, он был избран в качестве основного объекта для последующей разработки эффективного метода агробактериальной трансформации ячменя.

Для улучшения эффективности трансформации ячменя с помощью *A. tumefaciens* в нашей работе было исследовано влияние ультразвука и вакуум-инфильтрации на этот процесс. Ранее уже проводились эксперименты по изучению этих факторов на эффективность трансформации [3, 5, 13, 16]. Обработка нами каллусных тканей ячменя ультразвуком приводила к увеличению эффективности транзientной экспрессии *GUS*-гена, что проявлялось в образовании значительно большего количества синих точек на поверхности каллусной ткани (19,3 точек на эксплант) по сравнению с контролем (14,2 точек на эксплант) (рис. 2), что совпадает с ранее полученными результатами для различных видов растений [16].

Исследования, проведенные в ряде лабораторий по изучению причин повышения эффективности трансформации с помощью ультразвука, показали возникновение микроповреждений на поверхности обработанных растительных тканей [12, 14]. В результате появления таких микроповреждений образовывался индуктор *vir*-генов, что приводило к активации переноса T-ДНК в клетки-мишени [16]. На эффективность ответа обработанных тканей влияло и время обработки ультразвуком, так как длительная обработка приводила к необратимым нарушениям клеточной стенки и к гибели клеток [16]. Согласно полученным данным, наиболее эффективная продолжительность обработки ультразвуком составляет 0,5-2 секунды [12]. Однако в некоторых случаях обработка тканей ячменя ультразвуком приводила к снижению эффективности его генетической трансформации, что может объясняться особенностью структуры клеточной стенки различных сортов [5].

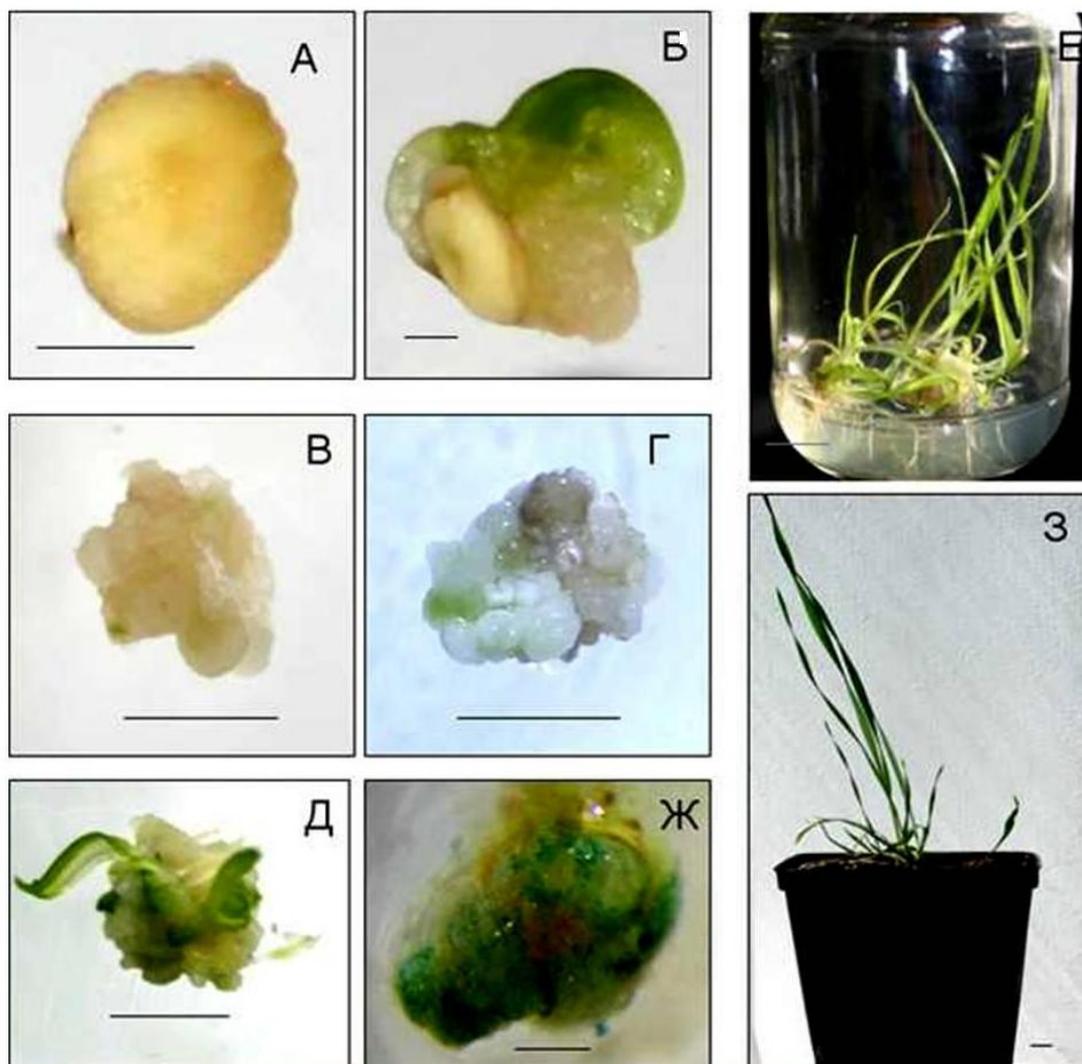


Рис. 1. Введение в культуру *in vitro* ячменя (*H. vulgare*): А – изолированный щиток; Б – прорастание зрелого зародыша; В – образование первичного каллуса; Г – образование эмбриогенного каллуса; Д, Е – регенерация побегов, Ж – GUS-экспрессия после *Agrobacterium*-опосредованной трансформации. Масштаб (А-Д) – 5 мм, (Е) – 1 см, (Ж) – 1,6 мм, (З) – 1 см

Нам удалось достичь увеличения эффективности *GUS*-экспрессии почти в два раза (27,6 точек на эксплант) при трансформации ячменя с помощью вакуум-инfiltrации (рис. 2). Вакуум-инfiltrацию также ранее использовали для агробактериальной трансформации тканей некоторых видов растений [3, 4] и, в частности, ячменя [13]. Например, в исследованиях по трансформации незрелых зародышей ячменя было показано повышение уровня *GUS*-экспрессии с 17,6 до 47,3% при увеличении длительности обработки вакуумом от 1 до 15 минут [13]. Увеличение же времени действия вакуума до 30 мин и выше приводило к сильному бактериальному заражению эксплантов и, как следствие, к снижению жизнеспособности трансформированных тканей [13]. Повышение эффективности трансформации при использовании вакуум-инfiltrации может быть объяснено тем фактом, что сильное разрежение воздуха сначала сопровождается его выходом из межклеточного пространства, а затем под давлением вновь впущенного воздуха бактериальные клетки эффективнее туда проникают. Таким образом, значительно повышается площадь обработки тканей бактериальной культурой, что может приводить к повышению уровня трансформации.

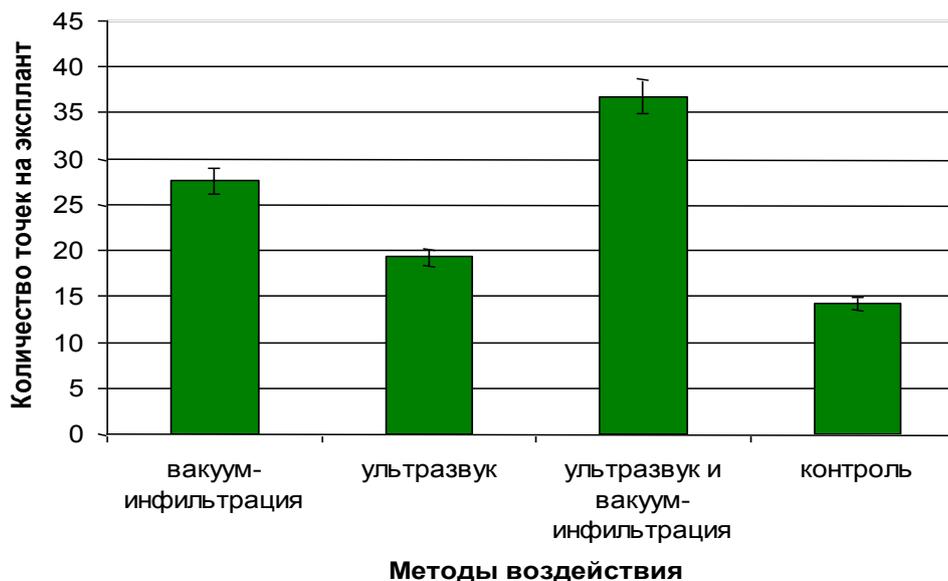


Рис. 2. Среднее количество *GUS*-точек на эксплант на поверхности каллусной ткани ячменя после трансформации *GUS*-геном

Последовательное же использование нами обоих факторов – ультразвука (1-3 с) и вакуум-инфильтрации (20 мин) еще значительно повышало эффективность трансформации, что проявлялось в увеличении транзиторной *GUS*-экспрессии в 2,6 раза (36,8 точек на эксплант) (см. рис. 2). Полученные данные свидетельствует о высокой эффективности совместного использования ультразвука и вакуум-инфильтрации для агробактериальной трансформации, что ранее никем не изучалось.

Выводы

В результате проведенных исследований было изучено влияние таких физических факторов, как ультразвук и вакуум-инфильтрация, при их раздельном и совместном использовании на эффективность агробактериальной трансформации ячменя. Установлено значительное повышение уровня транзиторной экспрессии *GUS*-гена после соответствующей обработки этими факторами. Значительнее всего на эффективность агробактериальной трансформации оказывала влияние последовательная обработка ультразвуком и вакуумом, что отражают данные транзиторной экспрессии *GUS*-гена.

Список литературы

1. Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Высшая школа, 1990. – 352 с.
2. Танасиенко И.В., Емец А.И., Блюм Я.Б. Оценка эффективности каллусообразования и регенерации ярых сортов ячменя, районированных на территории Украины // Цитол. и генетика. – 2009. – Том 43, № 4. – С. 12-19.
3. Bechtold N., Ellis J., Pelletier G. In planta *Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants // C.R. Acad. Sci. Paris. – 1993. – V. 316. – P. 1194-1199.
4. Haq I. *Agrobacterium*-mediated transformation of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) via vacuum infiltration // Plant Mol. Biol. Rep. – 2004. – V. 22. – P. 879-288.
5. Efficient generation of transgenic barley: The way forward to modulate plant-microbe interactions / Hensel G., Valkov V., Middlefell-William J., Kumlehn J. // J. Plant Physiol. – 2008. – V. 165. – P. 71-82.

6. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA / Hiei Y., Ohta S., Komari T., Kumashiro T. // *Plant J.* – 1994. – V. 6. – P. 271-282.
7. Jefferson R.A., Bevan M.W., Kavanagh T.A. The use of the *Escherichia coli* beta-glucuronidase as a gene fusion marker for studies of gene expression in higher plants // *Biochem. Soc. Trans.* – 1987. – V. 15. – P. 17-18.
8. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant.* – 1962. – V. 15. – P. 473-479.
9. Comparison of GFP and GUS reporter genes / Murray F., Brettell R., Matthews P., Bishop D., Jacobsen J. // *Plant Cell Rep.* – 2004. – V. 22. – P. 397-402.
10. Inheritance of *gusA* and *neo* genes in transgenic rice / Peng J.Y., Wen F.J., Lister R.K., Hodges T.K. // *Plant Mol. Biol.* – 1995. – V. 27. – P. 91 - 104.
11. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*, second ed. – Cold Spring Harbor Laboratory Press. – Cold Spring Harbor: NY, 1989. – 1659 p.
12. Sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean immature cotyledons: optimization of transient expression / Santarem E.R., Trick H.N., Essig J.S., Finer J.J. // *Plant Cell Rep.* – 1998. – V. 17. – P. 752-759.
13. Shrawat A.K., Becker D., Lorz H. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of barley (*Hordeum vulgare* L.) // *Plant Sci.* – 2007. – V. 172. – P. 281-290.
14. Tang W. Additional virulence genes and sonication enhance *Agrobacterium tumefaciens* mediated loblolly pine transformation // *Plant Cell Rep.* – 2003. – V. 21. – P. 555-562.
15. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated barley transformation / Tingay S., McElroy D., Kalla R., Fieg S., Wang M., Thornton S., Brettell R. // *Plant J.* – 1997. – V. 11. – P. 1369-1376.
16. Trick H.N., Finer J.J. SAAT: sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation // *Transgenic Res.* – 1997. – V. 6. – P. 29-36.
17. *Agrobacterium*-mediated stable transformation of cell suspension cultures of barley (*Hordeum vulgare*) / Wu H., McCormac A.C., Elliott M.C. Chen D.-F. // *Plant Cell Tis. Org. Cult.* – 1998. – V. 54. – P. 161-171.

ЭКСПРЕССИВНОСТЬ МНОЖЕСТВЕННЫХ ФОРМ ПЕРОКСИДАЗЫ В ОНТОГЕНЕЗЕ СОИ

Л.Ф. ДЬЯЧЕНКО, кандидат биологических наук;
В.Н. ТОЦКИЙ, доктор биологических наук;
В.А. ТОПТИКОВ, кандидат биологических наук
Одесский национальный университет им. И.И. Мечникова
В.И. СИЧКАРЬ, доктор биологических наук
Селекционно-генетический институт УААН, Одесса

Введение

Наряду с каталазой и супероксиддисмутазой пероксидаза (ПО) входит в ферментативную антиоксидантную систему растений и обладает способностью реагировать на любые воздействия внешней среды изменениями наборов изоформ и/или экспрессивности отдельных изоформ этого фермента [1, 2, 7]. Не исключено, что на разных стадиях развития растений адаптивная роль отдельных изоформ ПО не одинакова, однако убедительных доказательств дифференцированной экспрессии генов пероксидазы в онтогенезе многих растений, в частности сои, мы не нашли. В связи с этим цель настоящей работы состояла в изучении экспрессивности отдельных изоформ пероксидазы на разных стадиях развития растений сои, отличающихся

продолжительностью периода вегетации. Последняя в значительной степени детерминируется серией аллелей генов фотопериодизма [8]. Таким образом, результаты работы содержат новую информацию не только о функциональном состоянии изоформ ПО на разных стадиях развития растений, но и о взаимодействии генов ПО с генами, контролирующими продолжительность вегетации сои.

Объекты и методы исследования

Материалом служили 20 сортов сои, из которых 9 условно обозначили как «скороспелые» (Устя, Медея, Юг-30, Диона, Л-2 (Орел), Валентиа, Блискавица, Аннушка, Спринт – период вегетации 85-95 дней), а 11 – «раннеспелые» (Аметист, Елена, Марьяна, Селекта, Киевская 98, Припять, Рось, Романтика, Степовичка, Ксения, Георгина) – продолжительность вегетации 95-110 дней.

Листья для экстракции ПО отбирали на трех стадиях развития растений: I – появление первого тройчатого листа, II – начало цветения, III – начало созревания бобов. Для исключения влияния фактора старения листа для анализа фермента отбирали самый последний развернутый лист. Экстрагирование, разделение в полиакриламидном геле и визуализацию ПО проводили по ранее описанным методикам [5]. Анализ электрофореграмм проводили по компьютерной программе АнаИС, с помощью которой для каждой изоформы определяли площадь и интенсивность окрашивания соответствующих полос в условных единицах. Статистическую обработку данных проводили в Excel.

Результаты и обсуждение

Электрофоретическое разделение ПО показало, что количество изоформ фермента в листьях варьирует в зависимости от стадии развития растений. Наименьшее количество наблюдали в начале цветения (15 изоформ), наибольшее – в начале созревания бобов (18 изоформ).

В начале цветения растений (стадия II) в листьях сои определяется 15 изоформ пероксидазы разной экспрессивности и относительной подвижности. Относительная подвижность форм фермента колеблется в достаточно широком диапазоне R_f – от 0,05 до 0,77. Самой высокой экспрессивностью (определяли по интенсивности окрашивания полос на электрофореграммах) характеризовались малоподвижные изоформы № 14, № 13, № 11 и среднеподвижная изоформа № 6.

Экспрессивность формы № 6 сильно варьирует у разных сортов сои. Она выражена сильнее в листьях растений сортов Медея, Марьяна, Валентиа, Селекта, Георгина, чем в листьях растений других сортов. В листьях лишь одного сорта – Юг-30 – наблюдается высокая экспрессивность изоформы № 3.

На более ранней стадии развития растений (первый тройчатый лист) ПО представлена 16 молекулярными формами, т.е. на одну изоформу больше, чем в начале цветения (ее обозначили как № 8а). Наличием /отсутствием именно этой изоформы пероксидазы отличаются листья растений двух указанных этапов развития. По сравнению с другими изоформами ПО более высокая экспрессивность свойственна изоформам № 14 (особенно у сортов Устя и Медея), № 13 (у сорта Степовичка), № 6 (примерно у половины исследованных сортов), № 2 (сорта Юг-30, Елена, Марьяна, Валентиа, Аннушка, Спринт, Степовичка, Георгина).

В начале созревания бобов (стадия III) количество изоформ фермента составляет 18 (рис. 1). По сравнению со стадией II на стадии III наблюдаются изоформы № 5а, № 8а и № 9а. Из перечисленных форм ПО изоформа № 8а выявлена в листьях на ранней стадии онтогенеза сои, на II стадии ее экспрессивность резко снижается и практически не выявляется, а на стадии III экспрессивность этой формы снова увеличивается. Изоформы

№ 5а и № 9а свойственны листьям только поздней (III) стадии онтогенеза растений сои. На электрофореграмме интенсивнее других, кроме полос № 15-12, окрашиваются полосы № 4, 2, 1. Две последние изоформы заметно слабее экспрессируются в листьях растений на предыдущих, более ранних, стадиях развития сои.

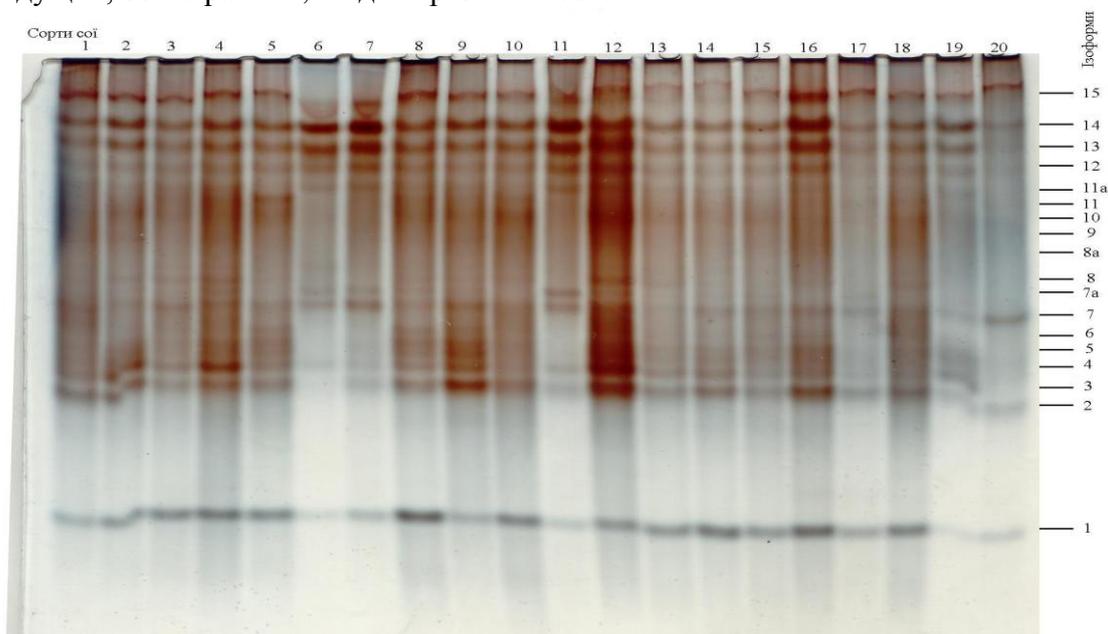


Рис. 1. Множественные молекулярные формы пероксидазы исследуемых сортов сои при анализе листьев на стадии III:

1 – Устя, 2 – Медея, 3 – Юг-30, 4 – Диона, 5 – Л-2 (Орел), 6 – Аметист, 7 – Елена, 8 – Марьяна, 9 – Валентиа, 10 – Блискавица, 11 – Селекта, 12 – Киевская 98, 13 – Припять, 14 – Рось, 15 – Аннушка, 16 – Спринт, 17 – Романтика, 18 – Степовичка, 19 – Ксения, 20 – Георгина

В табл. 1 представлены величины экспрессивности изоформ пероксидазы в условных единицах (средние по 20 сортам сои). Видно, что преобладающее количество форм ПО выявляется на всех трех этапах онтогенеза сои. Всего таких форм 15, изоформа ПО № 8а является общей для листьев на этапах I и III, а формы № 5а и 9а выявляются только на III этапе развития сои. В табл. 1 отмечены формы, экспрессивность которых в листьях сои на II и III стадиях развития достоверно изменяется по сравнению с I стадией. На стадии начала цветения по сравнению со стадией первого тройчатого листа таких изоформ фермента пять.

У трех из них (№ 3, 12, 13) экспрессивность на этапе II, у двух (№ 6, 10) – увеличивается на 16 и 48%.

Экспрессивность пероксидазы листьев сои на стадии созревания бобов наиболее существенно отличается от ее экспрессивности в листьях, собранных на двух более ранних стадиях развития растений. Достоверные количественные изменения экспрессивности на этапе III по сравнению с этапом I наблюдаются у семи форм фермента: у трех из них она снижается (снижение колеблется в пределах 25-43%), у четырех – возрастает (в пределах 19-25%). Сравнительно с этапом II на этапе III достоверно изменяется экспрессивность восьми форм. В результате указанных изменений общая экспрессивность пероксидазы листьев в период созревания бобов на 17% выше этого показателя в период цветения ($P \leq 0.05$).

Таблица 1

Экспрессивность пероксидазы листьев на разных этапах развития растений сои

№ изоформы	I стадия	II стадия	III стадия
1	19,41 ± 0,88	20,59 ± 0,64	24,37**^ ± 1,2
2	27,56 ± 1,53	30,16 ± 1,41	34,66**^^ ± 2,55
3	25,16 ± 1,09	19,6** ± 0,92	25,36 ^ ± 2,26
4	25,67 ± 1,26	23,86 ± 1,08	19,66**^ ± 1,65
5	25,07 ± 1,07	23,61 ± 0,69	20,25*^ ± 1,51
5a	0	0	22,64 ± 1,62
6	34,29 ± 1,34	39,75* ± 1,63	26,37** ± 1,07
7	25,6 ± 1,22	25,2 ± 0,97	18,9 ± 0,93
8	27,86 ± 1,04	29,8 ± 1,13	22,44 ± 1,07
8a	28,93 ± 0,93	0	26,23 ± 0,91
9	31,92 ± 0,97	33,13 ± 1,15	33,06 ± 1,53
9a	0	0	33,16 ± 2,16
10	23,96 ± 1,04	35,63** ± 1,19	24,46 ± 1,21
11	30,93 ± 1,3	31,86 ± 1,13	23,05**^^ ± 1,43
12	28,51 ± 0,85	25,46* ± 1,08	29,43 ± 1,72
13	36,64 ± 1,08	29,18** ± 1,3	37,91^ ± 2,82
14	48,68 ± 2,39	43,0 ± 2,34	44,81 ± 2,36
15	32,09 ± 1,54	29,1 ± 1,71	45,93**^^ ± 2,31
∑	472,31 ± 13,31	439,93 ± 12,78	515,7^ ± 22,18

Примечание: n = 20 сортов, * - $P \leq 0.05$, ** - $P \leq 0.005$ при сравнении с такой же изоформой на I стадии, ^ - $P \leq 0.05$, ^^ - $P \leq 0.005$ при сравнении с такой же изоформой на II стадии, ∑ - суммарная экспрессивность ПО

В табл. 2 представлены величины экспрессивности изоформ ПО листьев двух групп сортов сои, отличающихся длительностью периода вегетации приблизительно на 10 дней. Эти группы сортов сои практически не отличаются экспрессивностью ПО на стадии первого тройчатого листа (I стадия не показана). В начале цветения растений (II стадия) экспрессивность изоформы № 7 в группе «скороспелых» сортов достоверно отличается от экспрессивности аналогичной изоформы ПО в группе «раннеспелых», различие составляет 16% в пользу последних.

В начале созревания бобов (стадия III) указанных двух групп сортов сои достоверное различие экспрессивности наблюдается уже не у одной, а у трех изоформ ПО. Это форма № 5a, у которой достоверное снижение экспрессивности у «раннеспелых» сортов составляет 23%, формы № 6 и 1 – уменьшение на 14 и 19% соответственно. Таким образом, различия между «скороспелыми» и «раннеспелыми» группами исследованных сортов сои наблюдаются лишь на поздних стадиях развития растений.

Представленные данные убедительно свидетельствуют о том, что в процессе онтогенеза растений сои происходит постоянное перераспределение экспрессивности ПО между отдельными множественными молекулярными формами. В целом в течение исследуемого периода развития растений сои достоверные изменения экспрессивности на том или ином этапе наблюдались у 11 изоформ фермента. Таким образом, только у части изоформ ПО экспрессия поддерживается на одном стабильном уровне, тогда как экспрессивность большей части изоформ в процессе онтогенеза находится в динамическом состоянии. Полученные данные вполне согласуются как с данными

литературы [4], так и с результатами, полученными нами при исследовании влияния различных стрессовых условий на динамику изоформ пероксидазы пшеницы [3, 6].

Таблица 2

Экспрессивность изоформ пероксидазы листьев растений сортов сои с разным вегетационным периодом

№ изоформы	II стадия		III стадия	
	<i>Длительность вегетации (дни)</i>			
	85-95	95-110	85-95	95-110
1	20,72 ± 1,04	20,48 ± 0,84	27,22 ± 1,38	22,03* ± 1,6
2	29,19 ± 1,43	30,95 ± 2,31	42,55 ± 2,65	33,65 ± 3,8
3	19,99 ± 1,61	19,27 ± 1,09	28,62 ± 2,08	22,7 ± 3,64
4	23,72 ± 1,39	23,98 ± 1,65	21,12 ± 1,12	18,47 ± 2,89
5	22,98 ± 1,0	24,13 ± 0,96	23,1 ± 1,37	17,92 ± 2,34
5a	0	0	25,89 ± 1,3	19,98* ± 2,53
6	40,9 ± 2,83	38,82 ± 1,93	28,62 ± 1,03	24,53* ± 1,59
7	23,14 ± 0,76	26,89* ± 1,5	19,98 ± 1,01	18,02 ± 1,46
8	28,42 ± 1,29	30,93 ± 1,74	23,17 ± 1,02	21,85 ± 1,79
8a	0	0	28,03 ± 1,49	24,75 ± 0,96
9	31,41 ± 1,0	34,54 ± 1,86	35,55 ± 1,92	31,02 ± 2,17
9a	0	0	35,58 ± 1,73	31,18 ± 3,64
10	33,29 ± 1,88	37,54 ± 1,34	25,28 ± 1,18	23,79 ± 2,01
11	31,11 ± 1,98	32,48 ± 1,33	21,48 ± 1,2	24,33 ± 2,4
12	24,06 ± 1,26	26,61 ± 1,64	27,7 ± 1,67	30,85 ± 2,81
13	28,37 ± 1,68	29,84 ± 1,98	35,69 ± 2,3	39,73 ± 4,82
14	41,65 ± 3,95	44,1 ± 2,89	41,08 ± 1,73	47,87 ± 3,9
15	28,6 ± 1,25	29,52 ± 2,8	47,07 ± 1,95	44,99 ± 3,97
Σ	427,54 ± 14,69	450,07 ± 20,0	537,73 ± 19,62	497,67 ± 37,1

Примечание: * - $P \leq 0.05$ при сравнении «скороспелых» (85-95 дней) и «раннеспелых» (95-110 дней)

Выводы

1. Электрофоретические спектры пероксидазы тканей листьев сои представлены 15-18 изоформами разной подвижности и экспрессивности.
2. Наиболее заметные изменения экспрессивности пероксидазы наблюдаются в тканях листьев сои в начале стадии созревания бобов по сравнению с более ранними стадиями развития.
3. Экспрессивность значительной части изоформ пероксидазы динамично изменяется в зависимости от этапа онтогенеза растений сои.
4. Сорты сои с периодом вегетации 85-95 дней достоверно отличаются от сортов с периодом вегетации 95-110 дней экспрессивностью одной изоформы ПО на стадии II и трех изоформ фермента на стадии III.

Список литературы

1. Андреева В.А. Фермент пероксидаза: Участие в защитном механизме растений. – М.: Наука, 1988. – 128 с.
2. Воронков Л.А., Живописцева И.В. Изучение каталитических свойств

пероксидазы хлоропластов // Физиология и биохимия здорового и больного растения. – М.: Изд-во МГУ, 1970. – С. 305-311.

3. Множинні форми деяких ферментів у тканинах рослин озимої пшениці з контрастною стійкістю до бурої листової іржі / Дьяченко Л.Ф., Тоцький В.М., Топтіков В.А., Бабаянц Л.Т. // Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології. – К.: ЛОГОС, 2007. – Т. 1. – С. 23-27.

4. Легкобит М.П., Хадеева Н.В. Изоферментные спектры кислых пероксидаз у представителей рода *Stachys* // Генетика. – 2001. – Т. 37, № 7. – С. 930-934.

5. Сафонов В.И., Сафонова М.Р. Исследование белков и ферментов растений методом электрофореза в полиакриламидном геле // Биохимические методы в физиологии растений. – М.: Наука, 1971. – 113 с.

6. Сопряженность устойчивости озимых мягких пшениц к *Fusarium graminearum* Schwabe и множественных молекулярных форм некоторых ферментов / Топтиков В.А., Мирось С.Л., Дьяченко Л.Ф., Тоцкий В.Н., Залогина М.А. // Цитология и генетика. – 2002. – Т. 36, № 3. – С. 3-11.

7. Хуссейн И.А., Кочиева Е.З., Хадеева Н.В. Изменение спектров пероксидаз у регенерантов *Stachys sieboldii* в результате гормональных и мутагенных воздействий // Генетика. – 2000. – Т. 36, № 8. – С. 1093-1099.

8. Cober E.R., Madill J., Voldeng H.D. Early tall determinate soybean genotype E1E1e3e3e4e4dt1dt1 sets high bottom pods // Can. J. Plant Sci. – 2000. – V. 80, N 3. – P. 527-531.

ИЗУЧЕНИЕ ВНУТРИВИДОВОГО И МЕЖВИДОВОГО КОНСЕРВАТИЗМА ЛОКУСОВ МИКРОСАТЕЛЛИТОВ (SSR)

А.В. ЗЛАЦКАЯ, кандидат биологических наук;

Ю.В. ШИТИКОВА; Л.В. КОРОЛЬ

Украинский институт экспертизы сортов растений, Киев

Введение

Локусы микросателлитных (SSR) последовательностей ДНК растений в настоящее время занимают одну из ключевых позиций в исследовании их геномов, картировании и маркировании локусов хозяйственно ценных признаков, идентификации интрогрессии чужеродного генетического материала переданного от вида-донора в геном вида-реципиента и изучении организации определенных регионов растительного генома. Ценность локусов SSR для исследований заключается в том, что они относительно равномерно распространены по всему геному растения, а также для большинства культурных растений, в том числе мягкой пшеницы, созданы генетические карты сцепления SSR [13]. В последнее время значительный интерес представляют работы по исследованию организации геномов культурных растений, изучение богатых генами регионов [11], коллинеарность порядка расположения генов при межвидовых сравнениях в пределах родов, порядков и классов [4], а также выявлении консервативных локусов. Последнему направлению способствовала серия работ по сравнению расположения локусов EST у мягкой пшеницы и арабидопсиса, мягкой пшеницы и риса [10].

Кроме теоретической ценности данные работы позволяют решить и ряд прикладных задач. Например, микросателлитные маркеры, идентифицированные в геноме мягкой пшеницы, использовали в исследованиях близкородственных видов семейства *Triticeae* (<http://wheat.pw.usda.gov>), что дало возможность увеличить число

маркерных локусов у менее изученных видов и насытить их генетические карты сцепления [1, 2, 7, 12].

В связи с этим основной целью данной работы было изучение полиморфизма 107 SSR мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L. (AABBDD)), расположенных на всех хромосомах этого вида у растительного материала с разной степенью генетического родства: двух сортов этой культуры Кавказ и Безостая 1, которые происходят из одного селекционного центра, и у пшеницы группы *timopheevii* – *Triticum militinae* Zhuk. & Migush (A^bA^bGG) – отличающейся от *T. aestivum* по происхождению двух геномов, у *Aegilops tauschii* Coss. (DD) – эволюционного донора субгенома DD *T. aestivum*, а также у двух сортов сахарной свеклы *Beta vulgaris* L. Два сорта сахарной свеклы были выбраны для исследования по двум причинам: с одной стороны как образцы представителя генетически отдаленного вида, а с другой – с целью идентификации новых микросателлитных маркеров. Поскольку в отличие от большинства культурных злаков, для которых идентифицировано огромное количество SSR маркеров и информация о которых находится в свободном доступе (<http://wheat.pw.usda.gov>), для сахарной свеклы количество идентифицированных маркеров SSR очень мало [5, 6, 9], кроме того информация о их последовательностях является, за редким исключением, закрытой [5].

Объекты и методы исследования

Объектом для исследования послужили два сорта озимой мягкой пшеницы *T. aestivum* Кавказ и Безостая 1, по одному образцу *T. militinae* и *A. tauschii*, и два сорта сахарной свеклы Япола и Ахат.

Экстракцию ДНК проводили из проростков пшеницы, егилопса и сахарной свеклы, с использованием СТАВ-метода [8]. ПЦР и визуализацию продуктов амплификации проводили согласно методике [13]. Список исследованных SSR-маркеров представлен в табл. 1. При массовом анализе продукты амплификации разделяли в 2%-ном агарозном геле, а визуализацию проводили в ультрафиолетовом свете с использованием бромистого этидия. Точный размер ампликона определяли методом капиллярного электрофореза на базе лаборатории John Innes Centre (Великобритания).

Результаты и обсуждение

Наименьший уровень полиморфизма был зафиксирован между двумя сортами *T. aestivum*: из 107 SSR 22 оказались полиморфными, причем менее полиморфными были SSR субгенома D. Из 36 исследованных SSR этого субгенома лишь один маркер *barc143* (табл. 1) обнаружил полиморфизм между двумя сортами. Наивысший уровень полиморфизма между сортами был установлен при помощи SSR субгенома B (31%), т.е. 11 маркеров из 36 оказались полиморфными, причем полиморфные маркеры были обнаружены на большинстве хромосом этого субгенома: по одному на хромосомах 3B, 4B, 5B и 6B, два – на хромосоме 2B и 4 полиморфных маркера – на хромосоме 1B, что можно объяснить присутствием 1B/1R транслокации в геноме сорта Кавказ в отличие от сорта Безостая 1 [3]. При этом у 8 маркеров разница между ампликонами у исследуемых сортов составляла 6–20 пар нуклеотидов (п.н.) и у 1 маркера *gwm011* полиморфизм был следствием наличия нуля аллеля у одного из сортов, что дает возможность использовать эти маркеры для массового анализа данного растительного материала и его производных путем разделения продуктов их амплификации в агарозном геле. Полиморфизм с разницей в 2–3 п.н. у исследуемых сортов обнаружен у двух SSR-маркеров субгенома B. Из 39 SSR-маркеров субгенома A 26% (10 SSR) оказались полиморфными. Из них полиморфизм двух SSR-маркеров был следствием наличия нуля аллеля у одного из сортов. У еще двух SSR-маркеров – следствием разницы в размерах ампликонов между исследуемыми сортами в 7–20 п.н., а у шести – в 2–4 п.н. При сравнении уровня полиморфизма исследуемых маркеров у близкородственных видов прогнозировано наблюдалось увеличение уровня полиморфизма SSR в

гомеологичных парах субгеномов А и А^b, В и G *T. aestivum* и *T. militinae*, а также субгенома D *T. aestivum* и генома D *A. tauschii*.

Таблица 1

Список использованных SSR-маркеров хромосом пшеницы*

Хр-ма	Маркер
1A	psp3001 (159, 159, 161), gwm164 (125, 123, 101+113.), barc083 (146, нуль аллель, 151), wmc093 (153, 172, 152), gwm135 (275, 278, 278)
1B	barc008 (190, 257, нуль аллель), psp3000 (219, 222, 245), gwm011 (нуль аллель, 192, нуль аллель), psp3100 (180, 174, нуль аллель), wmc044 (213, 213, 197+213)
1D	gwm337 (185, 185, 193), gdm111 (213, 213, нуль аллель), gwm458 (110, 110, 113), gwm642 (203, 203, нуль аллель)
2A	gwm636 (117, 117, 89), wmc177 (194, 196, 173), gwm095 (126, 126, нуль аллель), psp3088 (166, 166, нуль аллель), gwm445 (194, 194, 174), barc005 (310, 310, нуль аллель)
2B	gwm257 (204, 204, нуль аллель), wmc154 (160, 166, 124), barc167 (259, 265, нуль аллель), gwm338 (170, 170, нуль аллель)
2D	gwm455 (160, 160, 190), barc095 (197, 197, 232), barc168 (190, 190, 187), gwm539 (138, 138, 134+155), wmc018 (240, 240, 240)
3A	psp3001 (171, 171, нуль аллель), barc045 (191, 191, 198), gwm369 (162, 162, 170), gwm674 (161, 161, 173), gwm155 (140, 140, нуль аллель), wmc264 (138, 140, 127)
3B	psp3001 (208, 223, нуль аллель), gwm285 (229, 229, нуль аллель), gwm493 (146, 146, нуль аллель), psp3030 (197, 197, нуль аллель), barc164 (187, 187, нуль аллель)
3D	gdm072 (138, 138, нуль аллель), gwm161 (152, 152, 138), gwm456 (142, 142, 202), gwm003 (77, 77, 65), gwm383 (193, 193, 172)
4A	gwm165 (192, 192, 186), barc106 (139, 139, 108), barc184 (220, 220, 200), dupw004 (201, 201, нуль аллель), gwm610 (169, 169, 171).
4B	wmc047 (143, 143, нуль аллель), barc163 (165, 165, нуль аллель), gwm107 (213, 213, нуль аллель), gwm165 (255, 257, 255), gwm495 (182, 182, нуль аллель), psp3030 (210, 210, нуль аллель)
4D	wmc457 (168, 168, 168), gdm129 (124, 124, 122), wmc285 (302, 302, 294), wmc331 (133, 133, 137), psp3007 (182, 182, 174), gwm165 (200, 200, 218)
5A	barc056 (122, 122, нуль аллель), barc141 (259, 259, 259.), gwm129 (224, 228, 202), gwm205 (158, 164, нуль аллель), barc151 (250, 250, 200), gwm126 (193, 193, 193)
5B	barc109 (241, 241, 176), gwm159 (201, 201, нуль аллель), gwm234 (238, 238, нуль аллель), gwm213 (166, 166, нуль аллель), barc140 (145, 145, 134), gwm408 (199, 185, 200)
5D	barc143 (нуль аллель, 137, нуль аллель), gwm190 (209, 209, 259), gwm205 (143, 143, нуль аллель), barc110 (204, 204, 186), barc144 (245, 245, нуль аллель), gwm583 (172, 172, нуль аллель)
6A	barc171 (232, 232, 192), gwm334 (122, 122, нуль аллель), dupw167 (233, 233, 280), gwm570 (153, 153, нуль аллель), psp3071 (162, 162, 158)
6B	barc198 (127, 127, 196), gwm193 (175, 175, нуль аллель), psp3009 (213, 213, нуль аллель), wmc105 (351, 351, 376), barc134 (204, 204, нуль аллель), gwm219 (183, 194, нуль аллель)
6D	barc173 (242, 242, 233), gwm 469 (175, 175, 171), barc096 (194, 194, 191), barc175 (234, 234, нуль аллель)
7A	barc108 (160, 160, 140), psp3001 (161, 161, 163), gwm130 (123, 127, 107), wmc168 (нуль аллель, 314, нуль аллель), barc029 (192, 192, нуль аллель), dupw254 (159, 159, 184)
7B	barc072 (185, 185, 202), gwm046 (175, 175, 167), gwm333 (156, 156, 156), psp3033 (187, 187, 183)
7D	gwm130 (129, 129, 125), barc214 (222, 222, нуль аллель), gwm295 (250, 250, 258), barc076 (221, 221, 221), psp3123 (177, 177, 185), psp3113 (177, 177, 175)

* - Хр-ма – хромосома; в табл. указано название SSR, в скобках – размер ампликона в парах нуклеотидов у сорта Казказ, Базостая 1 и *T. militinae* в случае субгеномов А и В или *A. tauschii* в случае субгенома D

При исследовании субгеномов А и А^b была обнаружена следующая тенденция: 35 из 39 SSR-маркеров субгенома А оказались полиморфными, причем в 12 случаях в субгеноме А^b идентифицировали нуль аллели, в 14 случаях полиморфизм между двумя субгеномами был следствием меньшего числа копий микросателлитного повтора у субгенома А^b в сравнении с субгеномом А, а в 7 случаях – следствием большего числа. Причем разница в размерах ампликонов между исследуемыми видами в подавляющем большинстве случаев была велика, в 10-50 п.н. При исследовании субгенома G в сравнении с субгеномом B из 36 SSR-маркеров в 23 случаях были идентифицированы нуль аллели в субгеноме G, в 6 случаях полиморфизм между двумя субгеномами был следствием меньшего числа копий микросателлитного повтора у субгенома G, а в 4 случаях – следствием большего числа. При сравнении полиморфизма микросателлитных маркеров у субгенома D мягкой пшеницы и *A. tauschii* 33 из 36 SSR-маркеров оказались полиморфными, из которых лишь 9 давали нуль аллели в геноме *A. tauschii*, а приблизительно равное количество, 11 и 13 соответственно, оказались полиморфными; в первом случае это было следствием увеличения числа микросателлитных повторов, а во втором – уменьшением. При чем разница между ампликонами при идентификации полиморфизма в большинстве случаев была невелика – 2-6 п.н. Для исследования генома сахарной свеклы нами произвольно были отобраны 37 SSR-маркеров трех субгеномов мягкой пшеницы А (10 SSR), В (14 SSR) и D (13 SSR). Из них 15 SSR-маркеров (6 SSR субгенома А, 3 SSR субгенома В и 6 SSR субгенома D) выявили нуль-аллели в геноме сортов сахарной свеклы, что можно было ожидать, поскольку наличие нуль-аллелей свидетельствует об отсутствии искомого локуса в геноме исследуемого растения. Однако наибольший интерес представили другие две группы SSR. Одна из них состояла из 8 SSR (*dupw004*, *gwm129*, *bac167*, *psp3033*, *barc095*, *barc110*, *psp3123*, *gwm295*), идентифицирующих полиморфизм между пшеничным геномом и геномом сахарной свеклы (рис. 1 а), а другая – из 14 SSR, которые не проявили видимого полиморфизма между изученными сортами сахарной свеклы и одним из исследуемых сортов мягкой пшеницы – Кавказ.

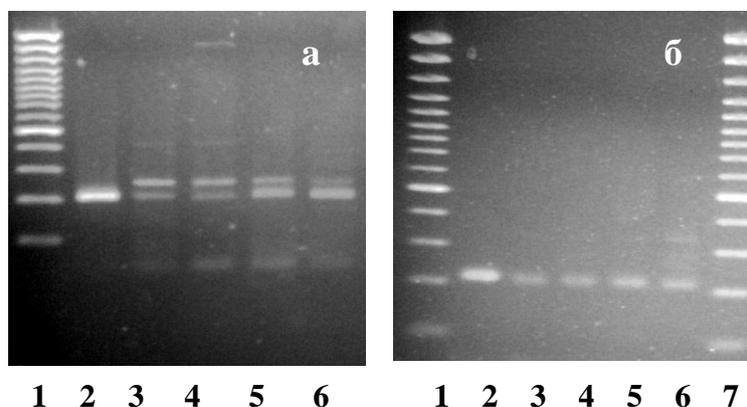


Рис. 1. Идентифицированный полиморфизм некоторых SSR-маркеров в геноме сахарной свеклы: а) *dupw 004*, б) *gwm190* (слева направо 1, 7 – маркер молекулярного веса 100 п.н.; 2 – сорт Кавказ; 3, 4 – сорт Япола; 5,6 – сорт Ахат)

Преимущественно это были SSR разных хромосом субгенома В пшеницы. Причем 2 маркера *wmc044* и *gwm165* не выявили полиморфизма как при исследовании межсортового, так и межвидового полиморфизма у пшеницы, что свидетельствует о высоком уровне консерватизма этих локусов даже у генетически отдаленных видов. Интересным оказался тот факт, что 9 SSR (*barc045*, *barc184*, *gwm257*, *gwm388*, *barc109*, *barc072*, *gwm455*, *gwm539*, *gwm190*) (рис. 1 б), не обнаружившие межсортовой полиморфизм у исследованных сортов мягкой пшеницы, но оказавшиеся полиморфными при исследовании диких сородичей мягкой пшеницы, а также 3 SSR *psp3000*, *wmc154*, *barc008*, идентифицировавшие как межсортовой, так и межвидовой полиморфизм у пшеницы, не выявили полиморфизма

между сортом мягкой пшеницы и образцами сахарной свеклы. Эти факты также могут свидетельствовать о консерватизме определенных локусов генома растений в межвидовых сравнениях.

Выводы

Результаты исследования межсортового и межвидового полиморфизма в пределах семейства *Triticeae* показали, что наиболее дивергентными оказались субгеномы В в межсортовом и В-Г в межвидовом сравнении, а наименее в обоих случаях – субгеномы (геном) D. Субгеном А и пара А-А^b занимала промежуточное положение в сравнении с субгеномами, рассмотренными выше. Анализ полиморфизма некоторых SSR пшеницы в геноме генетически отдаленного вида *Beta vulgaris* выявил ряд консервативных локусов. Некоторые SSR-маркеры пшеницы оказались пригодными для использования в анализе полиморфизма гибридов и линий этой культуры.

Список литературы

1. Леонова И.Р., Редер М., Будашкина Е.Б. Молекулярный анализ устойчивых к бурой ржавчине интрогрессивных линий, полученных при скрещивании гексаплоидной пшеницы *T. aestivum* с тетраплоидной пшеницей *T. timopheevii* // Генетика. – 2002. – Т. 38, № 12. – С. 1648-1655.
2. Микросателлиты пшеницы: перспективы использования для картирования генов и анализа реконструированных геномов / Салина Е.А., Леонова И.Р., Редер М., Лайкова Л.И., Майстренко О.И., Будашкина Е.Б., Шумный В.К. // Физиол. раст. – 2001. – Т. 48, № 3. – С. 441-446.
3. Созинов А.А. Полиморфизм белков и его значение в генетике и селекции. – М.: Наука, 1985. – 272 с.
4. A 2600-Locus Chromosome Bin Map of Wheat Homoeologous Group 2 Reveals Interstitial Gene-Rich Islands and Colinearity With Rice / Conley E.J., Nduati V., Gonzalez-Hernandez J.L., Mesfin A., Trudeau-Spanjers M., Chao S., Lazo G.R., Hummel D.D., Anderson O.D., Qi L.L., Gill B.S., Echalié B., Linkiewicz A.M., Dubcovsky J., Akhunov E.D., Dvorák J., Peng J.H., Lapitan N.L.V., Pathan M.S., Nguyen H.T., Ma X.-F., Miftahudin, Gustafson J.P., Greene R.A., Sorrells M.E., Hossain K.G., Kalavacharla V., Kianian S.F., Sidhu D., Dilbirligi M., Gill K.S., Choi D.W., Fenton R.D., Close T.J., McGuire P.E., Qualset C.O., Anderson J.A. // Genetics. – 2004. – V. 168. – P. 625-637.
5. Dornte J. Entwicklung, Charakterisierung und Kartierung von Mikrosatellitenmarkern bei der Zuckerrübe (*Beta vulgaris* L.) // Dissertation PhD. – Universität Gatersleben. – Gatersleben, 2001. – 125 s.
6. QTL mapping of BNYVV resistance from the WB41 source in sugar beet / Gidner S., Lennefors B.-L., Nilsson N.-O., Bensefelt J., Johansson E., Gyllenspetz U., Kraft T. // Genome. – 2005. – V. 48. – P. 279-285.
7. Advanced backcross QTL analysis for the identification of quantitative trait loci alleles from wild relatives of wheat (*Triticum aestivum* L.) / Huang X.Q., Coster H., Ganai M.W., Roder M.S. // Theor. and Appl. Genet. – 2003. – V. 106. – P. 1379-1389.
8. A molecular, isozyme and morphological map of the barley (*Hordeum vulgare*) genome / Kleinhofs A., Kilian A., Maroof M.A.S., Biyashev R.M., Hayes P., Chen F.Q. // Theor. and Appl. Genet. – 1993. – V. 86. – P. 705-712.
9. Abundance and length polymorphisms of microsatellite repeats in *Beta vulgaris* L. / Morchen M., Cuguen J., Michaelis G., Hanni C., Saumitou-Laprade P. // Theor. Appl. Genet. – 1996. – 92. – P. 326-333.
10. Chromosome Bin Map of Expressed Sequence Tags in Homoeologous Group 1 of Hexaploid Wheat and Homoeology With Rice and Arabidopsis / Peng J.H., Zadeh H., Lazo G.R.,

Gustafson J.P., Chao S., Anderson O.D. // *Genetics*. – 2004. – V. 168. – P. 609-623.

11. Deletion Mapping of Homoeologous Group 6-Specific Wheat Expressed Sequence Tags / Randhawa H. S., Dilbirligi M., Sidhu D., Erayman M., Sandhu D. // *Genetics*. – 2004. – V. 168. – P. 677-686.

12. Fluorescently labeled M13 tagged SSR markers in map construction and assessment of allelic diversity in wheat and durum wheat / Raman R., Thomas A., Intiaz M., Stodart B., Raman H., Martin P., Hare R., Milgate A., Mackay M. // *Proc. X Intern. Wheat Genet. Symposium*, 1-6 September 2003. – Roma: SIMI, 2003. – V. 2. – P.798-800.

13. A microsatellite map of wheat / Roder M.S., Korzun V., Wendehake K., Plaschke J., Tixier M.H., Leroy P. Ganal M.W. // *Genetics*. – 1998. – 149. – P. 2007-2023.

БИОИНФОРМАЦИОННЫЙ ПОИСК РАСТИТЕЛЬНЫХ ГОМОЛОГОВ АССОЦИИРОВАННОЙ С МИКРОТРУБОЧКАМИ ПРОТЕИНКИНАЗЫ MAST2

П.А. КАРПОВ¹, кандидат биологических наук;

А.И. ЕМЕЦ¹, кандидат биологических наук; В.Г. МАТУСОВ¹;

А.Ю. НЫПОРКО¹, кандидат биологических наук;

Е.С. НАДЕЖДИНА^{2,3}, доктор биологических наук;

Н.Ю. ШАШИНА³; Я.Б. БЛЮМ¹, доктор биологических наук

¹ Институт пищевой биотехнологии и геномики НАН Украины, Киев

² Институт белка РАН, Пущино, Московская область, Россия

³ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Введение

Протеинкиназа MAST2 (microtubule associated serine/threonine protein kinase 2) семейства MAST, принадлежит к группе цАМФ-, цГМФ-зависимых протеинкиназ и протеинкиназ С (AGC) и играет значительную роль в регуляции микротрубочек и клеточного цикла [7, 11]. У животных она отвечает за фосфорилирование дистрофина/утрофина в клетках мозга, модуляцию их сродства к микротрубочкам и ассоциированным с ними белкам (БАМ), образование мультибелкового комплекса при созревании сперматозоидов, а также за взаимодействие с PTEN – регулятором клеточного роста и апоптоза [10, 11].

Считается, что у человека протеинкиназа MAST2 участвует в комплексе фосфорилирования белков микротрубочек посредством БАМ [11]. Взаимодействие MAST2 (Q6P0Q8) с микротрубочками происходит за счет двух доменов – киназного и PDZ (PROSITE: PDOC50106, область 948-1212 аминокислотных остатков) [8, 11]. PDZ домены служат для контакта трансмембранных белков с цитоскелетом, что в свою очередь, обеспечивает фиксированное положение сигнальных комплексов [8].

Несмотря на фундаментальную роль протеинкиназ MAST2 в животных клетках, их растительных гомологи долгое время оставались неизвестными. Недавно нами было показано существование потенциальных гомологов протеинкиназы MAST2 человека у высших растений [1]. Соответственно целью настоящей работы явился расширенный поиск растительных гомологов MAST2, основанный на идентификации характерного для данной группы протеинкиназ комплекса каталитического (S_TKc) и вспомогательного (S_TK_x) доменов.

Объекты и методы исследования

Для поиска растительных гомологов протеинкиназ, ассоциированных с микротрубочками, использовалась аминокислотная последовательность каталитического комплекса (домены S_TKc и S_TK_x) протеинкиназы MAST2 (Q6P0Q8) человека (*Homo*

sapiens). Сканирование базы данных UniProt выполнялось в BLASTp (SIB BLAST Network Service) [9] с применением весовой матрицы BLOSUM62 при E threshold = 10 (количество случайных выравниваний анализируемой последовательности), активной фильтрации низкоструктурированных областей и гепированных выравниваний. Отбор растительных гомологов осуществлялся на основании таких показателей, как процент идентичности, процент сходства и случайная ожидаемость этих результатов (E-value) [2].

Границы доменов определяли с помощью инструмента SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) [6]. Множественные выравнивания выполняли в программе ClustalX (2.0.5) (<http://www.clustal.org>) с применением серии матриц BLOSSUM [5]. Консервативность функционально важных положений оценивалась на основании сравнения с исходной последовательностью протеинкиназы MAST2 человека (www.expasy.org: Q6P0Q8). Доменная архитектура растительных гомологов анализировалась с применением сетевого инструмента SMART [6].

Для реконструкции пространственной структуры исследуемого белка применяли методы гомологичного (профильного) моделирования [4]. В качестве матрицы свёртки использовали пространственную структуру цАМФ-зависимой протеинкиназы из свиньи (P36887; pdb: 1CDK).

Результаты и обсуждение

Сканирование (BLASTp) базы данных UniProt [9] против аминокислотной последовательности каталитического комплекса (S_TKc + S_TK_x) протеинкиназы MAST2 *Homo sapiens* выявило 34 потенциальных растительных гомолога: 5 из *Vitis vinifera* L. (A7PHB5; A7QWR7; A7NTE9; A7NXD3; A5BWH0), 7 из *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (Q9LE81; Q94F38; Q9MB45; Q9LVI5; Q8GZ40; Q9LP76; Q9MAJ4), 6 из *Oriza sativa* ssp. *japonica* (Q9AUR3; Q10E10; B9FB59; Q2QM12; B9GEC7; Q10E09), 2 из *O. sativa* ssp. *indica* (A2XLA4; B8BN29), 1 из *Medicago truncatula* (Q32YB5), 4 из *Physcomitrella patens* ssp. *patens* (A9TWY7; A9TUB0; A9TQ65; A9T694), 5 из *Populus balsamifera* ssp. *trichocarpa* (Torr. et A.Gray) Brayshaw (B9I4L4; B9I2C4; B9IEF3; B9HKN3; B9GRP0), 1 из *Zea mays* L. (C0PG45), 3 из *Ricinus communis* L. (B9T5A7; B9R7R7; B9R9Q3) (табл.) Все обнаруженные белки депонированы в неаннотированной базе данных транслированных последовательностей TrEMBL и описаны либо как белки с неизвестной функцией, либо как потенциальные серин/треониновые протеинкиназы, либо потенциальные AGC и IRE протеинкиназы (табл.).

Результаты анализа доменной архитектуры с помощью сетевого инструмента SMART подтвердили наличие характерного для семейства протеинкиназ AGC дополнительного S_TK_x домена [3, InterPro: SM00133 S_TK_x] у 17 из найденных белков: A7PHB5, A7NTE9, A7NXD3, A5BWH0 (*V. vinifera*); Q9MB45, Q9LVI5, Q94F38, Q8GZ40 (*A. thaliana*); A9TQ65, A9TUB0, A9T694 (*P. patens* ssp. *patens*); B9I2C4, B9IEF3, B9HKN3, B9GRP0 (*P. balsamifera* ssp. *trichocarpa*); B9T5A7, B9R7R7 (*R. communis*). Результаты анализа последовательностей остальных гомологов также выявили наличие S_TK_x доменов, идентифицированных на основании сходства аминокислотных последовательностей и наличия мотивов, консервативных для доменов S_TK_x [3]. Результаты выравнивания аминокислотных последовательностей комплекса каталитических доменов (S_TKc + S_TK_x) протеинкиназы MAST2 человека и обнаруженных растительных гомологов, а также данные отчета BLASTp-сканирования показали, что ближайшими растительными гомологами MAST2 человека являются белки с ранее неизвестной функцией из *V. vinifera* (A7PHB5) и *P. balsamifera* ssp. *trichocarpa* (B9I4L4) (рис. 1). При этом максимальное сходство консенсусных областей каталитических доменов эталонной последовательности и растительного гомолога наблюдалось в случае белка с неизвестной функцией A7PHB5 из винограда (идентичность – 48%, при 67%-ном сходстве).

Таблица
**Результаты поиска растительных гомологов протеинкиназы MAST2, участвующей в фосфорилировании белков микротрубочек и регуляции деления
 КЛЕТОК**

UniProt	Предполагаемая функция	Вид	Длина (кД)	Вес (кДа)	Вес выравнивания	E-value	Идентичность (%)	Сходство	Профуски	Генкод/номер последова-
A7PFB5	AGC protein kinase*	<i>V. vinifera</i>	305	306	306	2e-81	48	67	0	GSVIVT00017880001
B9FLA4	Serine/threonine-protein kinase**	<i>P. trichocarpa</i>	320	305	305	4e-81	49	65	5	POPTRDRAFT_806679
Q9LE81	IRE-Serine/threonine-protein kinase**	<i>A. thaliana</i>	321	303	303	1e-80	48	65	5	IRE_OR_A5g62310
A7QWR7	AGC protein kinase**	<i>V. vinifera</i>	318	303	303	1e-80	49	65	4	GSVIVT00008775001
B9L2C4	AGC protein kinase*	<i>P. trichocarpa</i>	321	301	301	7e-80	46	63	4	POPTRDRAFT_806321
Q9AUR3	AGC protein kinase*	<i>O. sativa ssp. japonica</i>	323	299	299	2e-79	47	63	5	OSINB00033N16.3
Q10E10	AGC protein kinase*	<i>O. sativa ssp. japonica</i>	323	299	299	2e-79	47	63	5	Os03g0711800
B9FB59	AGC protein kinase*	<i>O. sativa ssp. japonica</i>	323	299	299	2e-79	47	63	5	OsL_12320
A2XLA4	AGC protein kinase*	<i>O. sativa ssp. indica</i>	323	299	299	2e-79	47	63	5	OsL_13249
Q32YB5	Nuclele-specific IRE-Ike*	<i>M. truncatula</i>	322	299	299	3e-79	48	65	6	MIRE
C0P645	Putative uncharacterized protein*	<i>Z. mays</i>	323	299	299	3e-79	47	64	5	ZM_BF00371B12
Q2QM12	IRE-S_TKc protein kinase**	<i>O. sativa ssp. japonica</i>	321	298	298	6e-79	48	64	4	OsL2g0621500
B8BN29	AGC protein kinase*	<i>O. sativa ssp. indica</i>	321	298	298	6e-79	48	64	4	OsL_39164
B9T5A7	AGC protein kinase*	<i>R. communis</i>	321	296	296	1e-78	46	63	4	RCOM_0054220
Q94F38	AGC protein kinase*	<i>A. thaliana</i>	316	296	296	2e-78	48	64	3	At1g48490/TIN15_9
B9GEC7	AGC protein kinase*	<i>Oryza sativa ssp. japonica</i>	321	296	296	2e-78	48	63	4	OsL_36911
Q9MB45	IRE homolog I**	<i>A. thaliana</i>	321	295	295	3e-78	47	66	4	IREH1
Q9LVL5	IRE homolog, protein kinase-Ike**	<i>A. thaliana</i>	321	295	295	3e-78	47	66	4	MEB5.7
B9RYF7	AGC protein kinase*	<i>R. communis</i>	316	295	295	5e-78	46	64	3	RCOM_1593890
B9IEF3	AGC protein kinase*	<i>P. trichocarpa</i>	321	295	295	5e-78	46	62	4	POPTRDRAFT_824614
B9R9Q3	S_TKc-protein kinase**	<i>R. communis</i>	320	293	293	1e-77	46	64	5	RCOM_1499970
Q8GZ40	AGC protein kinase*	<i>A. thaliana</i>	321	292	292	3e-77	46	65	4	At3g17850/MEB5_7
A7NTE9	AGC protein kinase*	<i>V. vinifera</i>	319	290	290	2e-76	46	63	4	GSVIVT00014640001
A9TWY7	AGC protein kinase*	<i>P. patens ssp. patens</i>	325	282	282	2e-74	43	60	6	PHYPADRAFT_152077
A9TUB0	AGC protein kinase*	<i>P. patens ssp. patens</i>	324	281	281	4e-74	44	60	5	PHYPADRAFT_150879
A9TQ65	AGC protein kinase*	<i>P. patens ssp. patens</i>	324	281	281	4e-74	45	62	5	PHYPADRAFT_148894
A9T694	AGC protein kinase*	<i>P. patens ssp. patens</i>	325	281	281	4e-74	44	60	6	PHYPADRAFT_140919
Q10E09	AGC protein kinase*	<i>Oryza sativa ssp. japonica</i>	323	276	276	1e-72	44	61	8	LOC_Os03g50390
Q9LPT6	AGC protein kinase*	<i>A. thaliana</i>	352	271	271	4e-71	43	58	13	TIN15.10
Q9MAJ4	AGC protein kinase*	<i>A. thaliana</i>	342	270	270	1e-70	44	59	10	F2F5.23
B9HKH3	AGC protein kinase*	<i>P. trichocarpa</i>	335	242	242	3e-62	39	57	8	POPTRDRAFT_766459
B9GRF0	AGC protein kinase*	<i>P. trichocarpa</i>	332	240	240	1e-61	39	57	9	POPTRDRAFT_754158
A7NXD3	AGC protein kinase*	<i>V. vinifera</i>	336	238	238	5e-61	39	56	9	GSVIVT000020285001
A5BWH0	AGC protein kinase*	<i>V. vinifera</i>	336	238	238	5e-61	39	56	9	VITISV_001730

Примечание: согласно данным ШЕРТО (*) или ШЕРТОКВ/ТЕМЫ (**)

Высокая степень сходства первичных последовательностей каталитических доменов белка с неизвестной функцией A7PHB5 из винограда и протеинкиназы MAST2 человека делает первую оптимальным кандидатом для реконструкции пространственной структуры по гомологии.

Ввиду отсутствия информации о пространственной структуре эталонной протеинкиназы MAST2 человека, пространственная структура каталитического домена A7PHB5, названного нами GMLK (Grape MAST2-Like Kinase), была реконструирована с использованием в качестве матрицы каталитического домена цАМФ-зависимой протеинкиназы из свиньи (*Sus scrofa*) (pdb: 1CDK, Swiss-Prot: KAPCA_PIG, UniProt: P36887, рис. 2).

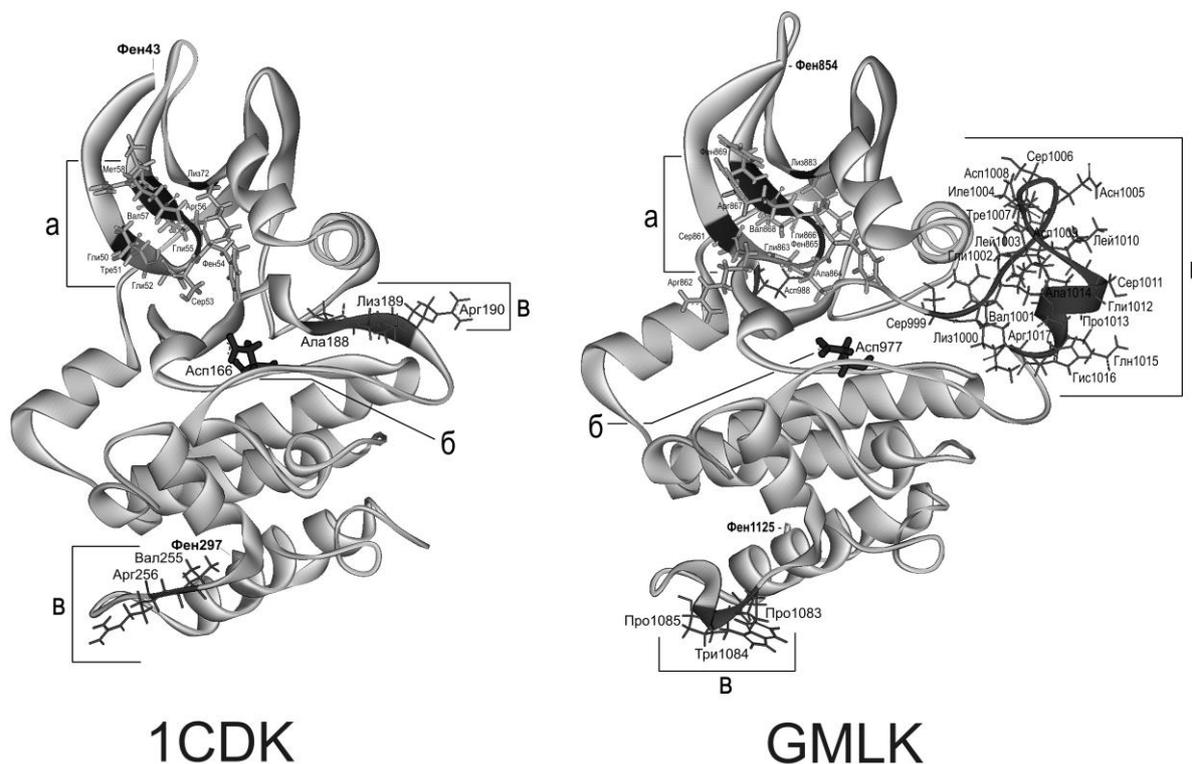


Рис. 2. Пространственная структура каталитических доменов цАМФ-зависимой протеинкиназы из свиньи (*Sus scrofa*) (pdb: 1CDK) и ее растительного гомолога – GMLK (Grape MAST2-Like Kinase) из *Vitis vinifera*: а – область связывания АТФ (NP_BIND АТФ), б – активный сайт, в – вариабельные области

Уровень идентичности последовательностей каталитических доменов матрицы (1CDK) и целевого белка (A7PHB5) составляет 40,9% при 66,8%-ном сходстве. Это является достаточным для корректного предсказания трёхмерной структуры по гомологии [4]. Интересно то, что, несмотря на имеющиеся различия в доменной архитектуре матрицы и целевого белка, а также наличие дополнительной петли из 15 аминокислот в каталитическом домене белка A7PHB5, границы каталитических доменов обоих белков совпадают.

Обнаружено, что расхождение в пространственных структурах соответствующих полным последовательностям каталитических доменов по всей длине цепей составляет 1,63 Å. Наиболее вариабельными участками в структуре GMLK оказались области петель, соответствующих доменам Сер-999 – Арг-1017 и Про-1083 – Про-1085 в аминокислотной последовательности цАМФ-зависимой протеинкиназы свиньи (P36887; pdb: 1CDK). Определённая вариабельность также наблюдается в области остатка Асп-988 (соответствует Асп-1777 у 1CDK) и, что наиболее интересно, в области Арг-862 – Ала-864

(Тре-51 – Сер-53 у 1CDK), которая входит в область нуклеотид-связывающей петли. Впрочем, последний факт вполне объясним, учитывая упомянутую замену Тре-51 на Арг-862 в начале нуклеотид-связывающей петли. Кроме того, наблюдается консервативность дополнительного остатка Лиз-883 (Лиз-72 – у 1CDK) АТФ-связывающего центра и активного центра (акцептор протонов) – Асп-977 (аналог у 1CDK – Асп-166). Также, у GMLK отсутствует модифицированный треонин, соответствующий положению Тре-197 у 1CDK. Следует отметить, что у исходной протеинкиназы MAST2 человека, этот остаток также отсутствует, а модификации треонина известны только для остатков треонина, находящихся вне каталитического домена.

Выводы

На основании гомологии последовательности каталитического комплекса протеинкиназы MAST2 из *Homo sapiens*, участвующей в фосфорилировании белков микротрубочек и регуляции клеточного цикла, обнаружено 34 растительных гомолога. Анализ результатов BLASTp-сканирования базы данных UniProt и результаты множественных выравниваний последовательностей каталитических комплексов показали, что ближайшими растительными гомологами протеинкиназы MAST2 из *H. sapiens* являются белки с ранее неизвестной функцией: A7PHB5 из *V. vinifera* и B9I4L4 из *P. balsamifera ssp. trichosarpa*. Реконструкция пространственной структуры каталитического домена протеинкиназы A7PHB5 из *V. vinifera* подтвердила высокое сходство ее каталитического домена и каталитических доменов группы животных MAST2-подобных цАМФ-зависимых протеинкиназ.

Данная работа выполнена в рамках проекта 08-04-90454: «Сравнительный анализ киномов микротрубочек животных и высших растений» (Совместный конкурс НАН Украины — РФФИ 2008-09 г.г.).

Список литературы

1. Биоинформационный поиск растительных протеинкиназ, участвующих в фосфорилировании белков микротрубочек и регуляции деления клеток / Карпов П.А., Надеждина Е.С., Емец А.И., Матусов В.Г., Ныпорко А.Ю., Шашина Н.Ю., Блюм Я.Б. // Цитол. и генетика. – 2009. – № 3. – С. 63-79.
2. Claverie J.-M., Notredame C. Bioinformatics for dummies. – New York: Wiley Publishing, 2007. – 436 p.
3. Hanks S.K., Quinn A.M., Hunter T. The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains // Science. – 1988. – V. 241, N 4861. – P.42-52.
4. Krieger E., Nabuurs S.B., Vriend G. Homology modeling // Structural Bioinformatics / Ed. by Bourne P.E., Weissig H.: John Wiley & Sons. – 2003. – P. 509-524.
5. Clustal W and Clustal X version 2.0 / Larkin M.A., Blackshields G., Brown N.P., Chenna R., McGettigan P.A., McWilliam H., Valentin F., Wallace I.M., Wilm A., Lopez R., Thompson J.D., Gibson T.J., Higgins D.G. // Bioinformatics. – 2007. – V. 23. – P. 2947-2948.
6. SMART 5: domains in the context of genomes and networks / Letunic I., Copley R.R., Pils B., Pinkert S., Schultz J., Bork P. // Nucl. Acids Res. – 2006. – V. 34 (Database issue). – P. 257-260.
7. The protein kinase complement of the human genome / Manning G., Whyte D.B., Martinez R., Hunter T., Sudarsanam S. // Science. – 2002. – V. 298, № 5600. – P. 1912-1934.
8. Ranganathan R., Ross E.M. PDZ domain proteins: scaffolds for signaling complexes // Curr. Biol. – 1997. – V. 7. – P. 770-773.
9. UniProt Consortium. The universal protein resource (UniProt) // Nucl. Acids Res. – 2008. – V. 36 (Database issue). – P. 190-195.
10. Binding of PTEN to specific PDZ domains contributes to PTEN protein stability and

phosphorylation by microtubule-associated serine/threonine kinases / Valiente M., Andrés-Pons A., Gomar B., Torres J., Gil A., Tapparel C., Antonarakis S.E., Pulido R. // *J. Biol. Chem.* – 2005. – V. 280, N 32. – P. 28936-28943.

11. Walden P.D., Cowan N.J. A novel 205-kilodalton testis-specific serine/threonine protein kinase associated with microtubules of the spermatid manchette // *Mol. Cell. Biol.* – 1993. – V. 13, N 12. – P. 7625-7635.

ПРОБЛЕМИ БІОБЕЗПЕКИ ПРИ ВИКОРИСТАННІ ГМ-РОСЛИН

С.Д. РУДИШИН, *кандидат біологічних наук*
Університет «УКРАЇНА», Вінниця

Вступ

Аналітичний погляд на початок ХХІ століття свідчить, що дві глобальні проблеми – харчування та екологічна безпека – стають для цивілізації найголовнішими. Усі інші – економічні, енергетичні, технологічні, демографічні, медичні, соціальні, військові, психологічні – прямо або опосередковано пов'язані з ними. Сьогодні виробництво сільськогосподарської продукції досягає близько 5 млрд. тонн на рік. Щоб збільшити цей показник вдвічі і забезпечити їжею у 2025 р. майже 9 млрд. населення Землі, традиційних способів буде недостатньо. Звідси, створення і впровадження генетично модифікованих організмів (ГМО) є науково-політичною проблемою.

Необхідно констатувати, що засоби масової інформації, а не академічні наукові журнали, з самого початку робіт у цьому напрямку наділили ГМО презумпцією вини. Звідси ГМ рослини вважаються потенційно небезпечними доти, доки не доведена їх повна безпечність. Зауважимо, що менший запас у пересічного українця біологічних знань, то більше паніка населення від жаху статей журналістів. Генетики-професіонали більш спокійні і толерантні [1, 2, 4, 8, 9]. За таких умов особливо важливим стає професійне розуміння проблеми, здійснення заходів щодо посилення біобезпеки на державному рівні, захисту громадян від можливих ризиків використання ГМО. Екологічна і біологічна науки, освіта і просвіта стають одним з головних важелів еколого-безпечного (збалансованого) розвитку будь-якої країни, інструментом екологізації людської діяльності, вдосконалення виробництва і природокористування на засадах коеволуційної парадигми з урахуванням можливостей біосфери. Високий рівень біологічних та екологічних знань сьогодні є основним фактором підвищення якості і безпеки життя, збереження і відновлення потенціалу природи [7]. Крім того, важливо оцінити місце України в процесі розвитку новітніх біотехнологій та її власні економічні інтереси як потужного виробника продовольства.

Обговорення

За останні 25 років біотехнологія, використовуючи рекомбінантні (гібридні) ДНК, перетворилась в унікальний науковий метод дослідження і одночасно у виробництво продукції сільського господарства, харчування. ДНК-технології дозволяють біотехнологам відбирати і вводити в рослини конкретні гени стійкості до шкідників, хвороб, гербіцидів, холоду, нестачі вологи, засолення, кислотності ґрунту тощо. Відомо понад 20 способів проникнення та міжвидової міграції генетичних елементів; до їх складу зараховують трансформацію, трансдукцію, транспозони, віруси, нестатевий обмін хромосомами, утворення симбіотичних асоціацій тощо. Технологія створення ГМ-рослин складається з багатьох етапів, серед яких можна виділити такі: 1) одержання конкретних генів, створення векторів; 2) трансформація рослинних клітин за допомогою бактеріальних плазмід; 3) підтвердження трансформації молекулярно-генетичними методами – виявлення

працюючого гена; 4) регенерація цілої рослини з трансформованих клітин.

Перші трансгенні рослини одержані у 1983 р., а широке культивування їх розпочинається з 1996 р. Перший харчовий ГМ-продукт (сир), виготовлений із використанням генетично модифікованого ферменту, був дозволений у США у 1990 р. У більшості Європейських країн законодавчо введені суворі обмеження на вирощування трансгенних культур і обов'язкове маркування продуктів харчування на присутність трансгенних домішок, якщо їх вміст перевищує 0,9%.

Незважаючи на опозицію до трансгенних рослин у певних колах, нові сорти швидко завойовують популярність у світі, площа під ними сьогодні складає понад 120 млн. га. Найбільша частка ГМ-культур вирощується в США, Аргентині, Канаді, Китаї (домінують соя, ріпак, бавовник, кукурудза, рис, тютюн). Сьогодні важко назвати вид рослин, культурні представники якого не є генетично модифіковані.

Чому існує опозиція щодо створення ГМО? Найголовніше те, що пересічні громадяни бояться ГМО з причин незнання сутності ДНК-технологій. Популяризатори встигли впровадити гасло на кшталт: «Нехай генетично модифіковану (штучну) їжу їдять генетично модифіковані (штучні) істоти!». Виступають проти також ті транснаціональні компанії, які займаються виробництвом пестицидів (зауважимо, що одночасно вони вкладають величезні кошти у біотехнологічні дослідження щодо створення ГМ-рослин). Інколи мотивація опонентів (громадських організацій) спирається на зненависть до глобалізації або на політичні (передвиборчі) чи прагматичні інтереси більше, ніж на стурбованість щодо біологічної безпеки.

Розглянемо аргументи науковців за ГМО. Оскільки усі живі організми (від вірусів до ссавців) містять однакові чотири «ноти» життя (А, Т, Г, Ц) в молекулі ДНК, то чому рекомбінантні (гібридні) ДНК треба вважати протиприродними? Однакові (вироджені) триплети кодують 20 амінокислот, які є складовими усіх білків біосфери. Усі метаболіти трансгенних рослин вже існують у природі. Тобто, якщо відомо, що багато рослин містять отруйні речовини і такі, що мають фармакологічну дію (загальна частка вторинних сполук – алкалоїдів, терпеноїдів, глікозидів, флавоноїдів, ефірних олій тощо в сучасних ліках складає майже 25%), то забезпечення біобезпеки пов'язано насамперед із дослідженням алергенної, токсичної, канцерогенної дії ГМ- продуктів на людину і сільськогосподарські тварини. Зокрема, колхіцин – алкалоїд рослини крокус осінній (*Colchicum autumnale* L.) – є мітозною отрутою (проникаючи у клітини, які діляться, колхіцин руйнує ахроматинове веретено, дочірні клітини не розходяться до полюсів, цитокінез не відбувається і число хромосом подвоюється) [6, с. 194].

Варто підкреслити, що у США і Канаді (де прискіпливо стежать за здоров'ям населення) відсутнє маркування їжі з домішками ГМ-продуктів, а вимоги до медико-генетичної і технологічної оцінки ГМ продуктів більш високі, ніж до сортів, які одержані шляхом звичайної селекції чи хімічного, фізичного мутагенезу [1, 2, 8]. Вважається, що ГМ-сорти рослин несуть не більше ризиків, ніж традиційні сорти відповідної сільськогосподарської культури, що вже підтвердили свою безпечність.

Медико-генетична оцінка ґрунтується на застосуванні полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), яка передбачає аналіз усіх внесених генів в рослину (трансгенів, маркерів, промоторів, термінаторів). Зокрема ГМ- рослини містять однакові послідовності промотора 35S і термінатора NOS, що дозволяє на першому етапі ідентифікувати наявність ГМО в продукті. Потім проводять ПЛР з маркерами на послідовність нуклеотидів ДНК (трансген), що визначають внесену ознаку. Створення і використання спеціалізованих ДНК-мікрочіпів дозволяє проводити масовий скринінг харчових продуктів та вихідної сировини на присутність трансгенів.

Технологічна оцінка визначає органолептичні і фізико-хімічні властивості, а також вплив генетичних модифікацій на технологічні параметри продукції.

Спеціальні дослідження проводяться для виявлення впливу ГМ-продукту на імунний статус; визначають його мутагенну, канцерогенну та нейротоксичну дію. Хронічна токсичність продукту визначається на тваринах, раціон яких упродовж 6 місяців максимально складається з ГМ-продукту. Визначається активність ферментів системи антиоксидантного захисту, вміст продуктів перекисного окислення ліпідів та ін.

Чи є небезпека від ДНК, яку ми ковтаємо з їжею? В організмі людини в травному тракті чужа ДНК руйнується ферментами нуклеазами (рестрикційними ендонуклеазами) до мономерів - нуклеотидів, які всмоктуються клітинами для власних потреб. Нуклеази однаково «ріжуть» ДНК бактерій, вірусів, рослин чи тварин. Майже 150 тисяч років людство з каріотипом кроманьйонця (*Homo sapiens* L.) споживає чужорідну ДНК з м'ясом, овочами тощо і будує «рідну» ДНК власних клітин з «чужих» нуклеотидів. Біологічна еволюція кроманьйонця за цей період не зазнала значних змін.

Це говорить про те, що кишечник людини вже багато тисячоліть є чудовим хемостатом з ідеальними умовами співіснування мікроорганізмів з різними фрагментами ДНК. В геномі симбіонта людини – кишкової палички (*Escherichia coli*) майже 17% ДНК має еукаріотичне походження. Щосекунди ми контактуємо з генетичним апаратом вірусів і бактерій, який зі «злими» (з точки зору людини) намірами атакує наш геном. Віруси і ділянки плазмід бактерій завдяки природному механізму вбудовуються в генетичний апарат рослин, тварин, людини і навіть успадковуються (наприклад вірус герпесу, що передається аналогічно ВІЛ). Ніхто сьогодні не спростував вірусної теорії виникнення раку. У геномі людини на нуклеотидні послідовності вірусів і мобільних елементів припадає 0,5% геному [2, с. 6]. Мікрорганізми і віруси всюдиусі у живій речовині планети. Отже, феномен генетичної трансформації не є новиною для біосфери, а лише одним із численних механізмів горизонтального і вертикального трансгенезу.

Немає жодного наукового повідомлення, що окремі гени чи фрагменти ДНК їжі вмонтовуються в генетичний матеріал людських клітин (чи ссавців взагалі) [1, 2, 4, 9]. Є підстави для ствердження, що в процесі еволюції системи травлення виробили захисні механізми від простої передачі генів з продуктів живлення. Така передача генів практично неможлива, оскільки було б потрібно, щоб:

- ДНК з новим геном не руйнувалася травним соком з нуклеазами;
- ДНК була спроможна проникнути крізь клітинну стінку і клітинну мембрану мікроорганізмів і вижити при роботі механізму знешкодження чужорідної ДНК;
- ДНК (чужа) рекомбінувалась в ДНК хазяїна і стабільно інтегрувались на ділянці, на якій можлива експресія гена;
- ген рослинної їжі, який навіть і трансформувався в мікроорганізм, в ньому почав працювати (здійснювати експресію).

Підкреслимо, що технологія створення ГМ-рослин відбувається за участю природних інструментів. Зокрема, усі ферменти, з якими працюють генні інженери (рестриктази, лігази, полімерази, нуклеази та ін.), виділені з живих організмів. Майже усі ГМ-рослини містять однакові природні послідовності ДНК, які регулюють роботу трансгена, а саме: промотор 35S (одержаний з вірусу мозаїки кольорової капусти) і термінатор NOS (з ґрунтової бактерії *Agrobacterium tumefaciens*). Якщо проаналізувати генетичну генеалогію усіх наших традиційних продуктів харчування (пшениці, картоплі, томатів, кукурудзи та ін.) – вони є результатом природних мутацій і генетичних трансформацій. Значне число генетиків вважає, що взагалі немає не генетично модифікованих культурних рослин.

Обговорення проблеми дає обґрунтоване твердження: ДНК з генетично модифікованих організмів так само безпечні, як і будь-яка інша ДНК харчових продуктів. Побоювання щодо потенційної алергенності ГМ-продуктів можна віднести також і до інших продуктів (цитрусових, шоколаду тощо) та доведеної токсичності інгредієнтів нашої їжі (синтетичних харчових добавок, залишків нітратів, пестицидів,

афлотоксинів, важких металів тощо). У супермаркетах разом з хлібом можна вільно купити сигарети. Сьогодні майже весь промисловий тютюн генетично модифікований. Нікотин – однозначно небезпечний для здоров'я (говорити про ризик – це «від лукавого» виробника). Крім нікотину, радіонуклідів, смоли та інших небезпечних речовин, токсичною є також селітра, яку додають до паперу, щоб сигарета не гасилася.

Ми споживаємо з їжею безліч ксенобіотиків [3]. Дуже небезпечні консерванти, залишки стероїдних гормонів та антибіотиків у продуктах харчування. Жахливі прогнози щодо збільшення серед населення онкогенних та інших захворювань після двох десятиліть Чорнобильського лиха, на жаль, підтверджуються. Радіонукліди (цезій і стронцій) здійснюють свій природний розпад, а іонізуюче випромінювання не додає здоров'я популяціям виду *Homo sapiens*.

У біологічному контексті при дослідженні поняття «небезпека/ризик» необхідно говорити про існування небезпеки від споживання неякісного алкоголю та ризик від надлишку якісного (заборона якого перманентно виникає і припиняється). Зазначимо, що генетично модифіковані лікарські препарати легко сприймаються фахівцями і населенням усіх країн і не викликають тривоги. ГМ-мікроорганізми давно й активно використовують для виробництва антибіотиків, амінокислот, ферментів, вакцин, вітамінів та ін. Зокрема, ніхто не протестує проти генно-інженерного інсуліну, якому діабетики віддали перевагу перед вітчизняним «свинячим».

Існує занепокоєння щодо появи «супербур'янів». Вчені вивчають можливий екологічний ризик самочинної передачі нових генів від ГМ-рослин до дикої флори (вітром, комахами). Водночас у реальних природних умовах перенесення генів від одних видів рослин до інших відбувається дуже рідко, інакше ми були б свідками постійного виникнення нових видів, що насправді не спостерігається. Якщо ж у результаті перехресних запилень і з'являться гібриди першого покоління F_1 , то вони практично ніколи не дають покоління F_2 [8, с. 11]. У цьому аспекті ГМ-рослини нічим не різняться від звичайних, не модифікованих.

Дослідження свідчать [2, 8, 9], що екологічний ризик при вирощуванні трансгенних рослин можна порівняти із ризиком випробування нових селекційних сортів, одержаних звичайним способом. Усі ознаки (сполуки), які з'являються (чи з'являться) в трансгенних рослинах, вже існують у біосфері. Зауважимо, що бур'янів у природі немає, вони є тільки в антропоцентричній уяві людини. Бур'яни – це рослини, які еволюційно виникли упродовж мільйонів років, є ланцюгами в екосистемах, а людині для розв'язання продовольчих проблем заважають. Для нових бур'янів знайдуть нові гербіциди. Отже, не зареєстровано жодних достовірних прикладів міграції трансгенів від ГМ-рослин до інших і впливу ГМ-рослин на біорізноманіття і структуру популяцій в агроценозах. Вчені вивчають зміни біоти штучних агросистем (мікрофлори ґрунтів, комах та ін.), в яких ростуть трансгенні рослини. Зокрема, кумулятивні наслідки потрапляння трансгенного білка (Bt-токсину) на ґрунтову фауну і мікрофлору.

Якщо говорити про екологічні наслідки людської діяльності, то людина з моменту появи на Землі виписала себе з класичного розуміння екології як біології екосистем. Відповідно до закону конкурентного витіснення Гаузе [5], конкуренція між видами на одній території тим сильніша, чим види ближчі за потребами у споживанні кормових ресурсів та просторі проживання. Для власного існування людина усуває або знищує усіх біологічних конкурентів за природні ресурси, називаючи при цьому їх шкідниками, бур'янами тощо.

Видається правомірним стверджувати, що штучні урбо- та агроландшафти планети (і з ГМ-рослинами разом) знижують буферну ємність біосфери, яка забезпечує її гомеостаз. Аналіз шаленого техногенезу останніх 60 років свідчить: головна причина біологічної небезпеки у споживацькому (не збалансованому) здійсненні промислової діяльності та веденні сільського господарства, які нелінійно підводять біосферу до точки

біфуркації, і наукові сценарії майбутнього невтішні. Цивілізації необхідно встигнути зрозуміти: якщо збережемо біологічне і ландшафтне різноманіття, воно збереже нас. Це означає, що біосфері для власного відновлення і подальшого сталого розвитку важливіші мільйони гектарів природних біомів тайги, джунглів, тундри, степів, боліт, океану тощо, а не урбоекосистеми (мегаполіси, сотні тисяч кілометрів автотрас тощо) та штучні агроландшафти зернових, бобових тощо.

Екологічний закон незаперечний: тільки 1% чистої продукції фотосинтезу використовується в усіх ланках природних трофічних ланцюгів. Перевищення цієї межі, наприклад шляхом вилучення частини продукції, порушує біотичну регуляцію вмісту CO₂ і O₂ в атмосфері, а через них – стабільність парникового ефекту і утворення озону. Надходження цієї частки тільки в антропогенний канал (в їжу, волокна, паливо тощо) стає загрозливим для існування сучасного стану біосфери.

Реалії сьогодення: зменшуються площі під сільськогосподарськими культурами, існує генетична межа їх урожайності; збільшується населення планети; інтенсивно застосовуються мінеральні добрива і пестициди, які допомагають побороти голод, але забруднюють довкілля; посилюється дефіцит родючості ґрунту (зменшується вміст гумусу); масштабно втрачається біологічне і ландшафтне різноманіття. Тільки один мільярд людей біосфера спроможна надійно прогодувати і при цьому безболісно для себе відновитися. Факт ХХІ століття – природні ресурси планети є джерелом достатку лише для країн «золотого мільярду», що ускладнює шлях до гарної ідеї ноосфери В.І. Вернадського.

Створення і поширення ГМ-рослин (рослин «зеленої» революції-2) має пряме відношення до забезпечення людства їжею (особливо білком), оскільки тваринництво і рибальство майбутнього повністю цього зробити не зможуть з об'єктивних причин. Наші міркування такі: 1) існує екологічне правило Р. Ліндемана: тільки 10% енергії переходить з одного ланцюга трофічної піраміди на більш високий, що є наслідком другого закону термодинаміки; 2) площа океану майже у 2,5 рази більша за площу суші, проте морські екосистеми фіксують сумарну сонячну енергію менш ефективно; суша дає майже у два рази більше продукції, ніж океан. Отже, людству треба вирощувати адаптовані до несприятливих умов середовища рослини, одержувати з них калорійні і протеїнові продукти та спускатися вниз по харчовому ланцюгу – зокрема до сої, а не втрачати 80-90% енергії їжі на годівлю тварин.

Найважливіші задачі генних інженерів рослин ми вбачаємо у такому: 1) здійснення генетичної трансформації злакових щодо їх спроможності фіксації атмосферного азоту; 2) підвищення ефективності фотосинтезу сільськогосподарських рослин; 3) створення стерильних ГМ-рослин та ін.

Висновки

Поширення ГМ-рослин стало незворотним процесом. Переваги перевищують гіпотетичний ризик від їх використання. Вчені покладають надію на трансгенні рослини, вирощування яких значно дешевше, менше забруднює пестицидами довкілля, допомагає вирішити проблему продовольства країн «третього світу» та біопалива, не потребує залучення нових площ. Як і будь-який витвір людського розуму (літак, гідроелектростанція, ліки, горілка, мінеральні добрива, консерви тощо), ГМ-рослини створюють певний ризик, але *пряма небезпека їх для здоров'я людини та сільськогосподарських тварин науково не доведена*. Явну небезпеку для збереження біорізноманіття і здоров'я людини складають кислотні опади, пестициди, радіонукліди, важкі метали, нітрати, нітроти, нітрозаміни, мікотоксини, штучні консерванти, синтетичні харчові домішки та інші ксенобіотики.

Усвідомлення і пересторога – два принципи усіх міжнародних нормативно-правових документів щодо біобезпеки при використанні ГМ-рослин. Принципова полеміка навколо трансгенних організмів корисна, оскільки примушує генних інженерів постійно поліпшувати конструкції, посилювати контроль за наслідками і, таким способом, працює на користь стратегії виживання людства в умовах стрімкого росту населення і виснаження біоресурсів. Але суспільство сьогодні має право робити вибір – споживати органічну чи генетично трансформовану їжу. Тому державі необхідно обов'язково забезпечити маркування ГМ-продуктів.

Список літератури

1. Современные биотехнологии – вызов времени / Блюм Я., Борлауг Н., Суржик Л., Сиволап Ю. – К.: РА NOVA, 2002. – 102 с.
2. Глазко В.И. Генетически модифицированные организмы: от бактерий до человека. – К.: «КВЦ», 2002. – 210 с.
3. Димань Т.М., Барановський М.М., Білявський Г.О. Екотрофологія. Основи екологічно безпечного харчування. – К.: Лібра, 2006. – 304 с.
4. Колотовкина Я.Б., Наумкина Е.М., Чижова С.И. Методы идентификации и мониторинг трансгенных компонентов в продуктах питания // Докл. Рос. академии сельскохозяйственных наук. – 2008. – № 5. – С. 44-47.
5. Реймерс Н.Ф. Экология: Теория, законы, правила, принципы и гипотезы. – М.: Россия молодая, 1994. – 366 с.
6. Рудишин С.Д. Основи біотехнології рослин. – Вінниця: МП «ЗАПАЛ», 1998. – 224 с.
7. Рудишин С.Д. Біологічна підготовка майбутніх екологів: теорія і практика: монографія. – Вінниця: ВМГО «Темпус», 2009. – 394 с.
8. Сорочинський Б.В. Екологічні ризики від випуску й використання генетично модифікованих рослин // Физиология и биохимия культ. растений. – 2008. – Т. 40. – С. 3-14.
9. Плейотропные эффекты гена хитиназы из *Serratia phymuthica* в трансгенном картофеле / Шахбазов А.В., Яковлева Г.А., Родькина И.А., Картель Н.А. // Цитология и генетика. – 2008. – № 2. – С. 3-9.

EFFICIENT PLANTLET REGENERATION AND AGROBACTERIUM TRANSFORMATION OF FLAX BY CHIMERIC GFP-TUA6 GENE

E.N. SHYSHA¹, A.I. YEMETS¹, *PhD*; V.I. KORKHOVYY¹, *PhD*;
S.I. SPIVAK¹, E.V. GUZENKO², *PhD*; V.A. LEMESH², *PhD*;
N.A. KARTEL², *DrSci*; YA.B. BLUME¹, *DrSci*

¹Institute of Food Biotechnology and Genomics, National Academy of Science of Ukraine

²Institute of Genetics and Cytology, National Academy of Science of Belarus

Introduction

Flax (*Linum usitatissimum* L.) is one of the perspective agricultural culture in Europe and in the Ukraine, particularly. One of the aims of flax selection is a creation of new varieties with improved agro-technical characteristics that include the higher wind-resistance. Cell wall plays an essential role in formation of mechanical flax resistance to wind. It is well known that cellulose microfibrils is the main mechanical element of the cell wall, and it is generally considered that cortical microtubules control the direction of cellulose microfibril deposition [1, 2]. Thus, elucidation the correlation between microtubules organization peculiarities and their role in cellulose microfibril arrangement helps to understand the wind resistance in flax plants

on cell and tissue levels.

During last decades *in vitro* cultivation of flax (*L. usitatissimum*) has been successfully elaborated. Protocols have been established for *in vitro* shoot regeneration [4, 5, 6] and also for *Agrobacterium*-mediated transformation [3, 7, 8, 11, 13, 15].

In the present study, we have attempted to develop an efficient system for high frequency shoot regeneration of several *L. usitatissimum* varieties with different wind-resistance zoned on territories of Belarus and Ukraine by exploiting six combination of plant regulators 6-benzylaminopurine (BAP) and α -naphthalene acetic acid (NAA), and addition of supplements in order to optimize *Agrobacterium tumefaciens* transformation procedure of them and selected transgenic lines expressing chimeric GFP-TUA6 gene that could allow visualize microtubules in flax cells.

Objects and methods of investigation

Culture medium. During experiments, MS [14] medium supplemented with 200 mg/l myo-inositol, 250 mg/l MES was used. Addition of 6 variants of plant regulators concentrations of BAP (1-3 mg/l) and NAA (0,05 – 0,1 mg/l) plus 20 g/l sucrose were added into the medium to test the plantlets regeneration. For shoots and roots development the hormone free MS medium with 10 mg/l sucrose was used. All media were gelled with 0,8 agar and adjusted to pH 5,8.

Plant material. *L. usitatissimum* seeds were kindly provided by the Institute of Genetics and Cytology NAS of Belarus (genotypes 'Dashkovskiy', 'K-65', 'Niva') and by the Institute of Fibre Cultures of Ukrainian Agricultural Academy of Sciences (genotypes 'Vruchiy', 'Zorya 87', 'Rushnichek', 'Svitanok', 'Ukrainskiy 3', 'Tomskiy 16'). Seeds sterilization was performed as described before [4].

Shoot regeneration. Hypocotyl explants from well germinated 6-days-old seedlings were cutted of 3-5 mm long and immediately placed onto plantlet regeneration medium. Green vigorous shoots were separated and placed on medium for shoots and roots development. The cultures were maintained at 22-24°C under 16-h light and 8-h dark photoperiods.

Agrobacterium-mediated transformation. Transformation was performed using *A. tumefaciens* strain LBA4404 harbouring a binary vector pBI121/GFP-TUA6 carrying chimeric tubulin gene TUA6 from *Arabidopsis thaliana* fused with GFP reporter gene from *Aequorea victoria* driven under cauliflower mosaic virus 35S promoter and *nptII* gene as selectable marker gene conferring resistance to kanamycin [17].

Agrobacterium was cultured overnight at 28°C in liquid LB medium [16] containing 50 mg/l kanamycin and 100 mg/l rifampicin. An overnight culture of *A. tumefaciens* was centrifuged at 4000 rpm for 15 min and then resuspended in liquid MS medium without sucrose and phytohormones. The OD₆₀₀ of bacteria was to 0,3-0,5 before inoculation.

The hypocotyl explants were immersed into *Agrobacterium* inoculum for 60 min and then placed onto MS medium supplemented with 200 mg/l myo-inositol, 250 mg/l MES, 20 g/l sucrose for co-cultivation period during 1, 2 or 3 days. Then co-cultivated hypocotyls were transferred onto medium for plantlets regeneration supplemented with 100 mg/l kanamycin for further selection of transformants and 400 mg/l carbenicillin for bacteria elimination. Explants were sub-cultured every 3 weeks on fresh medium. Regenerating shoots were picked up after 6-7 weeks and placed onto medium for shoots and roots development supplemented with 10 mg/l kanamycin.

DNA isolation and PCR analysis. Total genomic DNA was isolated from kanamycin-resistant shoots and untransformed control plant using Plant DNA Isolation Kit (Sigma, Germany). The primers used for amplification of a 622 base pair fragment of *nptII* gene were: 5'-CCTGAATGAACTCCAGGACGAGCA-3', 5'-GCTCTAGATCCAGAGTCCCGCTCAGAAG-3' and for amplification of a 840 base pair fragment of *nptII* gene were: 5'-GAGGCTATTCGGCTATGACT-3', 5'-AATCTCGTGATGGCAGGTTG-3'. Amplification was

carried out under the following conditions: 5 min at 94°C (initial denaturation); followed by 25 cycles of 30 s at 94°C (denaturation), 45 s at 65°C (annealing) and 40 s at 72°C (extension); and a final stage of 7 min at 72°C (final extension) for primers which used for amplification of a 622 base pair fragment of the *nptII* gene and 5 min at 94°C (initial denaturation); followed by 25 cycles of 30 s at 94°C (denaturation), 60 s at 60°C (annealing) and 40 s – 72°C (extension); and a final stage of 7 min at 72°C (final extension) for 840 base pairs fragment of the *nptII* gene.

Microtubule visualization. Incorporation of tubulin labeled by GFP into native microtubules into cells of transformed flax lines was studied by confocal laser scanning microscopy LSM 510 META (Carl Zeiss, Germany).

Results and discussion

Optimum concentrations of plant regulators for effective shoots regeneration were determined using six different combinations of BAP and NAA concentrations. Plantlets regeneration was observed using all tested variants BAP and NAA concentrations (Fig. 1). More large in size formation of calli was observed on plantlets regeneration medium supplemented with 3 mg/l BAP and 0,05 or 0,1 mg/l NAA but they practically did not produced abundant shoots on such media. A higher shoot regeneration frequency was observed on the medium with 1-2 mg/l BAP and 0,05-0,1 mg/l NAA (Fig. 1). On such media all tested flax varieties produced up 10-15 shoots per explant.

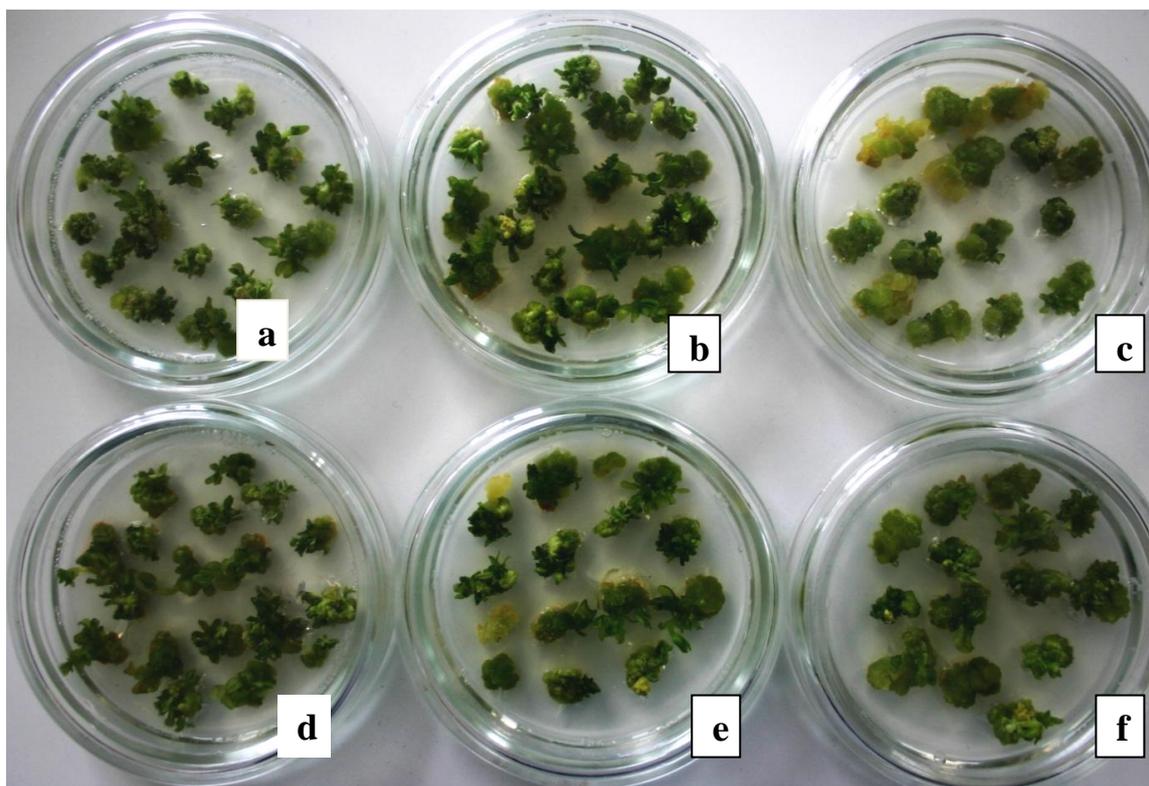


Fig. 1. Effects of growth regulators on *in vitro* shoot regeneration from hypocotyls explants of flax cultivar Ukrainskiy 3 after 5 weeks in culture:

a – 1 mg/l BAP + 0,1 mg/l NAA; b – 2 mg/l BAP + 0,1 mg/l NAA; c – 3 BAP mg/l + 0,1 mg/l NAA; d – 1 BAP mg/l + 0,05 mg/l NAA; e – 2 BAP mg/l + NAA 0,05 mg/l; f – 3 BAP mg/l mg/l + NAA 0,05 mg/l, Bar = 1cm

It was shown earlier that flax transformation characterizes sometimes with a formation «shoot escapes» [9, 12]. Taking into account this fact a two steps selection was used in our experiments. The flax transformants were selected during shoots regeneration phase on the

respective medium containing 100 mg/l kanamycin according [18], and then during shoots and roots development phase on the corresponding medium containing 10 mg/l kanamycin (Fig. 2). From data obtained we can conclude that cultivar Svitanok has the highest transformation efficiency then others cultivars.

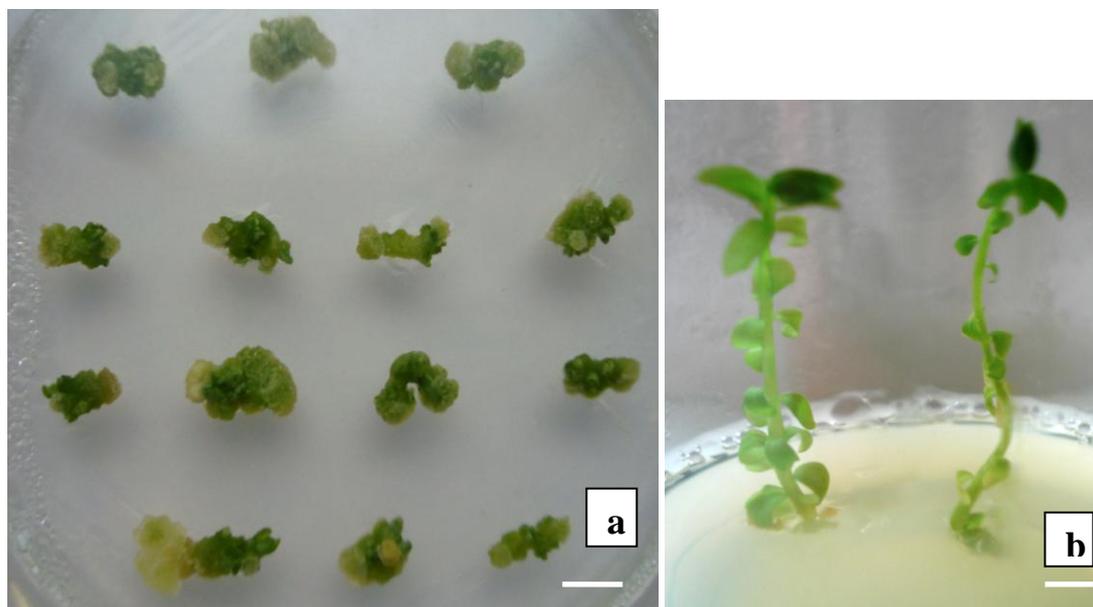


Fig. 2. Two selection phases: a – shoots regeneration phase (hypocotyls of germplasm ‘Tomskiy 16’ subcultured for three weeks on 100 mg/l kanamycin, Bar = 1,3 cm; b – shoots and roots development phase (putative transgenic shoots during selective shoot elongation (10 mg/l kanamycin), Bar = 0,7 cm

It was also found that optical density of *Agrobacterium* during transformation as well as co-cultivation time in our experiments were an important factors in increasing the transformation efficiency. The $OD_{600}=0,4$ of *Agro*-inoculum and 2 days of co-cultivation period were more suitable for flax transformation as compared to $OD_{600}=0,3$ or $OD_{600}=0,5$ and 1 or 3 days co-cultivation period because the transformation frequency in first case was more high for all tested genotypes. The $OD_{600}=0,3$ was enough low for successful integration of T-DNA into the plant cells but $OD_{600}=0,5$ was too high due to high level of *Agrobacterium* contamination. The same problem was observed when co-cultivation period was 1 or 3 days.

To confirm the transgenic nature of selected plants the molecular genetic analysis was carried out. The presence of transferred *nptII* gene in transgenic shoots was investigated by the PCR analysis using specific primers. As it was found the 621 and 840 bp length fragments of the *nptII* were amplified from most regenerated plants of all flax varieties used in our study (Fig. 3).

Also transgenic nature of obtained lines was confirmed by confocal laser scanning microscopy. It was found that exogenous GFP-labeled tubulin is capable to co-polymerize with endogenous cell tubulin and to participate in cortical microtubule network formation in transgenic flax cells. The obtained lines will be used for further investigation of microtubule organization and cellulose deposition in flax cell wall for understanding the processes of mechanical resistance in flax plants.

9. Jordan M., McHughen A. Transformed callus does not necessarily regenerate transformed shoots // *Plant Cell Rep.* – 1988. – V. 7. – P. 285-287.
10. Lane D.W. Influence of growth regulators on root and shoot initiation from flax meristem-tips and hypocotyls *in vitro* // *Physiol. Plant.* – 1979. – V. 45. – P. 260-264.
11. McHughen A. *Agrobacterium*-mediated gene transfer of chlorsulfuron resistance to commercial flax cultivars // *Plant Cell Rep.* – 1989. – V. 8. – P. 445-449.
12. McHughen A., Jordan M.C. Recovery of transgenic plants from “escape” shoots // *Plant Cell Rep.* – 1989. – V. 7. – P. 611-614.
13. High efficiency *Agrobacterium*-mediated gene transfer to flax / Mlynarova L., Beuer M., Nap J.-P., Pretova A. // *Plant Cell Rep.* – 1994. – V. 13. – P. 282-283.
14. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant.* – 1962. – V. 15. – P. 473-497.
15. Transformation plants of flax / Polyakov A.V., Chikrizova O.F., Kalyaeva M.A., Zacharchenko N.C., Balochina N.V., Buryanova Z.I. // *Physiol. Plant.* – 1998. – V. 45, N 6. – P. 882-887.
16. Sambrook J., Fritsch EF., Maniatis T. *Molecular Cloning*. Book 1. – New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. – P. 630-631.
17. Ueda K., Matsuyma T., Hashimoto T. Visualisation of microtubules in living cells of transgenic *Arabidopsis thaliana* L. // *Protoplasma.* – 1999. – V. 206 – P. 201-206.
18. The development of transformation vectors based upon modified plant *a*-tubulin gene as a selectable marker / Yemets A., Radchuk V., Bayer O., Bayer G., Baird V., Blume Ya. // *Cell. Biol. Int.* – 2008. – V. 32, N 5. – P. 566-570.

РЕГЕНЕРАЦІЯ УКРАЇНСЬКИХ СОРТІВ КАРТОПЛІ ТА ЇХ ГЕНЕТИЧНА ТРАНСФОРМАЦІЯ СИНТЕТИЧНИМИ СРУ-ГЕНАМИ

В.П. ЖУК¹; Т.М. ОЛІЙНИК², кандидат сільськогосподарських наук;

Я.Б. БЛЮМ¹, доктор біологічних наук; А.І. СМЕЦЬ¹, кандидат біологічних наук

¹Інститут харчової біотехнології та геноміки, Національна академія наук України, Київ

²Інститут картоплярства, Українська академія аграрних наук, Київ

Вступ

Картопля (*Solanum tuberosum* L.) є однією з основних продовольчих сільськогосподарських культур, які вирощують в Україні, і стійко займає перше місце в овочевому раціоні жителів нашої країни. Однією з основних задач селекціонерів на сьогоднішній день є підвищення споживчих якостей картоплі на фоні повного виключення хімічних засобів захисту рослин, використання екологічно безпечних методів та засобів пригнічення бур'янів і комах-шкідників, які забезпечують запобігання забруднення навколишнього середовища та врожаю картоплі токсичними речовинами. Найбільш злісними для картоплі є комахи-шкідники, які можуть повністю знищувати як наземну частину рослин, так і підземну, і призводити до повної або значної втрати врожаю данної культури. Широко застосовують для боротьби з такими шкідниками ефективні препарати на основі Vt-білків бактерії *Bacillus thuringiensis*, які є активними інсектицидними агентами [1, 7]. Перевагами біопестицидів на основі Vt-білків у порівнянні з хімічними інсектицидами є відсутність забруднених залишків, висока специфічність дії, що обумовлює їх нешкідливість для нецільових організмів і відносно низька ціна [1, 2, 6].

Необхідно відмітити, що протягом останніх десятиліть були успішно розвинені різні прийоми культивування та регенерації картоплі в умовах *in vitro*. Для цієї сільськогосподарської культури достатньо добре розроблені ефективні методи переносу

генів за допомогою агробактеріальної [12, 14, 17] та біолістичної трансформації [11, 13].

Тому метою даної роботи була розробка протоколів ефективної регенерації різних сортів картоплі української селекції, оцінка їх регенераційної здатності в культурі *in vitro* та розробка протоколу трансформації цих сортів з використанням синтетичних *Cry*-генів, що забезпечують стійкість до різного роду комах-шкідників.

Об'єкти та методи дослідження

Рослинний матеріал. В експериментах використовували чотири висококрохмальні сорти картоплі української селекції: Левада і Вернісаж (їстівні сорти), Світанок і Зарєво (технічні сорти) з сортової колекції Інституту картоплярства УААН. Стерильні рослини даних сортів розмножували *in vitro* на середовищі, що містило солі і вітаміни MS [10].

Індукція калюсогенезу з рослин картоплі. Для отримання первинного калюсу на експлантах картоплі були протестовані поживні середовища, що містили такі комбінації регуляторів росту: 1) 1 мг/л α -нафтилоцтової кислоти (HO_2K) і 1 мг/л транс-зеатину [8]; 2) 0,8 мг/л зеатин-рибозиду та 2 мг/л 2,4-дихлорфеноксіоцтової кислоти (2,4-Д) [3, 16]; 3) 1 мг/л транс-зеатину та 0,1 мг/л HO_2K [5]; 4) 5 мг/л HO_2K та 0,5 мг/л кінетину [16]. Всі середовища містили мінеральні солі та вітаміни MS, а також 3%-ну сахарозу, 8%-ний агар, рН середовищ дорівнював 5,7. Калюс витримували на цих поживних середовищах протягом 6 тижнів, ефективність кожного середовища оцінювали за наявністю калюсоутворення на експлантах картоплі (тобто появи калюсних колоній більше ніж 1-2 мм), розміром та морфологією отриманих калюсів. Морфологічно калюси розрізняли за кольором, структурою поверхні, оводненістю та щільністю.

Індукція регенерації рослин картоплі. Для індукції регенерації калюсної культури використовували поживні середовища, що містили солі та вітаміни MS з додаванням різних регуляторів росту: 1) 1 мг/л транс-зеатину [8]; 2) 0,8 мг/л зеатин-рибозиду та 2 мг/л GA_3 (гібереліну) [3]; 3) 1 мг/л трансзеатину [5]; 4) 0,1 мг/л HO_2K і 2 мг/л бензиламінопурина (БАП) (табл. 1). Кожне середовище додатково містило 2%-ну сахарозу та 8%-ний агар, при рН 5,7. Приблизно через 20 діб калюс, що утворився на відповідному середовищі для калюсогенезу, переносили на середовище для регенерації пагонів та культивували на світлі. Отримані регенеровані рослини переносили потім на безгормональне середовище MS для їх подальшого росту та розвитку.

Конструкції для трансформації. Для генетичної трансформації було використано 5 штамів *A. tumefaciens*, що мали бінарні векторні конструкції з різними синтетичними *Cry*-генами – *Cry1Ac*, *Cry1C* і *Cry2Aa2*, які перебувають під контролем d35S-промотору вірусу мозаїки цвітної капусти, або тканиноспецифічного промотору STLS (*Solanum tuberosum leaf specific promoter*) із картоплі, який забезпечує експресію гена інтересу в листках. В якості селективних маркерних генів кожен з п'яти векторів містив ген *nptII*, що забезпечує стійкість до канаміцину. Штами були люб'язно надані професором І. Альтасааром (Університет Отави, Канада).

Трансформація та селекція трансгенних ліній. *A. tumefaciens* вирощували на середовищі LB [9] з додаванням 50 мг/л канаміцину. Безпосередньо перед трансформацією бактерію нарощували при 28°C протягом 24 год при постійному погойдуванні на орбітальному шейкері у темряві. В якості експлантів використовували листові диски і міжвузля пагонів розміром 5-7 мм 4-6-тижневих рослин. Для здійснення ефективного переносу *Cry*-генів агробактеріальну трансформацію проводили згідно з протоколами, описаними раніше [3, 5, 8].

Результати та обговорення

Спочатку нами були проведені експерименти з вивчення ефективності калюсоутворення та здатності до регенерації рослин з експлантів листя та міжвузлів пагонів

чотирьох сортів картоплі: Левада, Вернісаж, Світанок і Зарево (табл.). Для цього використовували кілька типів середовищ, запропонованих раніше [3, 5, 8, 16]. Було встановлено, що найбільш оптимальним поживним середовищем для індукції структурованого та щільного калюсу виявилось те, що містило комбінацію регуляторів росту НО_цК та кінетину у концентрації 5 мг/л та 0,5 мг/л, відповідно [16]. За таких умов через чотири тижні спостерігали інтенсивне утворення добре розвинутого калюсу з ембріогенними структурами на його поверхні. На середовищі 2 (табл.), що містило 1 мг/л трансзеатину та 0,1 мг/л НО_цК, новоутворений калюс, на відміну від інших, на перших етапах мав яскраво-зелене забарвлення та достатньо щільну структуру. Однак при подальшому культивуванні спостерігалось інгібування процесу калюсогенезу і калюс поступово гинув. Результати впливу інших двох середовищ наведено також у таблиці.

Таблиця

Оцінка ефективності калюсоутворення та регенераційної здатності в культурі *in vitro* різних сортів картоплі української селекції

Середовище*	Сорт							
	Світанок		Вернісаж		Зарево		Левада	
	Калюсоутв.	Рег-ція	Калюсоутв.	Рег-ція	Калюсоутв.	Рег-ція	Калюсоутв.	Рег-ція
1	12,4%	7,%	14,6%	5,6%	12,0%	6,1%	10,7%	3,4%
2	19,0%	21,1%	13,0%	16,0%	17,3%	11,4%	8,4%	15,9%
3	2,1%	0%	1,3%	0%	1,4%	1,1%	1,5%	0%
4	33,4%	-	30,5%	-	30,1%	-	29,4%	-
5	-	42,1%	-	40,1%	-	43,0%	-	38,0%

Примітка: *1 – Gustafson et al. (2006), 2 – Beaujean et al. (1998), 3 – De Block (1988), 4 – Turhan (2004), 5 – MS, з додаванням 0,1 мг/л НО_цК і 2 мг/л БАП. Скорочення: калюсоутв. – ефективність калюсоутворення; рег-ція ефективність регенерації рослин картоплі

Наступним кроком було проведення оцінки регенераційної здатності отриманого калюса, показник якої визначали за кількістю пагонів, що утворилися до загальної кількості органогенного калюса (у %). Як видно з отриманих даних, на середовищі 3, що містило 1 мг/л трансзеатину, регенерація пагонів з калюсу майже усіх сортів не відбувалася, окрім сорту Зарево, де рівень регенерації теж зберігався на дуже низькому рівні (1,1%). На середовищі 1 рівень регенерації був вищий, але пагони розвивалися досить повільно. Виходячи з цього, нами було зроблено висновок, що для збільшення регенераційної здатності, необхідно додавати у середовище ауксин, бо навіть у незначній концентрації цей регулятор росту підвищує здатність калюсної культури до диференціації. Серед досліджених середовищ найбільшу ефективність регенерації спостерігали на середовищі 5, запропонованому нами (табл.), яке містило 0,1 мг/л НО_цК і 2 мг/л БАП (рис. 1 А).

За даними наших досліджень, серед тестованих експлантів високу здатність до регенерації рослин мали міжвузля пагонів усіх чотирьох сортів картоплі, тоді як листові експланти виявляли незначну здатність до утворення пагонів. Необхідно відмітити, що найбільш успішно регенерували сорти картоплі Світанок, Вернісаж і Зарево (табл.).

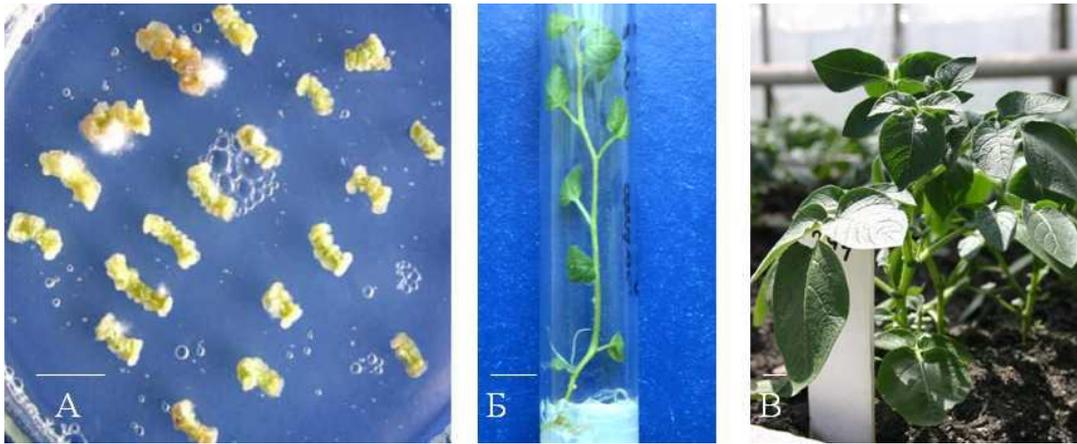


Рис. 1. Результати трансформації картоплі конструкцією p2AST PRD: А – селекція експлантів картоплі сорту Світанок на середовищі з 100 мг/л канаміцину; Б – вигляд регенованої лінії картоплі сорту Зарево *in vivo* на середовищі з канаміцином; В – трансгенна лінія сорту Світанок в умовах теплиці. Масштаб: в 1 см – 8,3 мм (А), 1,25 см (Б), 0,36 см (В)

Необхідно відзначити, що на всіх середовищах (окрім 3) спостерігався спонтанний ризогенез. На середовищі 4 [16] взагалі не відбувалося регенерації пагонів з експлантів картоплі всіх тестованих сортів, а йшло лише інтенсивне коренеутворення на їх поверхні.

На даний час розроблено різноманітні методи трансформації картоплі, які характеризуються певними відмінностями, що залежать саме від типу обраного експланта [15]. У наших досліджах в якості експлантів були використані листові диски та міжвузля картоплі. Для здійснення ефективної агробактеріальної трансформації чотирьох сортів картоплі в основу було покладено декілька протоколів [3, 5, 8]. Також додатково було проведено добір умов для успішного переносу синтетичних *Cry*-генів до картоплі. Так, згідно з кінцевим протоколом, експланти занурювали в агробактеріальну суспензію на 30 хв, потім культивували на середовищі для індукції калюсу [16] з фотоперіодом 16 год. Після трьох діб культивування експлантів проводили селекцію трансформантів на середовищі для індукції калюсу [16], що містило 100 мг/л канаміцину і 300 мг/л цефатоксиму. Протрансформовані тканини пересаджували кожні два тижні на свіже поживне середовище з селективним агентом. Для регенерації рослин експланти переносили на розроблене нами середовище, яке містило 0,1 мг/л NO_2K і 2 мг/л БАП, з селективним агентом. Відселектовані рослини в подальшому висаджували на безгормональне середовище MS.

Після трансформації за допомогою *A. tumefaciens* листових дисків і міжвузля нами було отримано лінії рослин всіх сортів картоплі – Левада, Вернісаж, Світанок і Зарево, здатних зростати і розмножуватися на селективному середовищі (рис. 1 Б). Відселектовані лінії, здатні до інтенсивного коренеутворення, в подальшому були адаптовані для вирощування у відкритому ґрунті (рис. 1 В). Хоча ріст регенерантів на середовищах з канаміцином є опосередкованим доказом трансгенної природи ліній, для підтвердження інтеграції перенесених генів у геном трансформованих рослин буде проведено молекулярно-генетичний аналіз з використанням методу ПЛР для виявлення інтеграції селективного маркерного гена *ntpII* та *Cry*-генів.

Висновки

Визначено оптимальну комбінацію регуляторів росту для успішного калюсоутворення у сортів картоплі Зарево, Левада, Світанок і Вернісаж (5 мг/л NO_2K і 0,5 мг/л кінетину), а також для регенерації рослин картоплі (0,1 мг/л NO_2K і 2 мг/л БАП).

Оптимізовано протокол агробактеріальної трансформації вищезазначених сортів картоплі. Відселектовано лінії рослин сортів Зарево, Левада, Світанок і Вернісаж на селективному середовищі і перенесено їх для вирощування в теплицю для проведення подальших молекулярних та біологічних аналізів.

Список літератури

1. Разработка биопестицидов против колорадского жука / Добрица А.П., Корецкая Н.Г., Гайтан В.И., Коломбет Л.В., Дербышев В.В., Жиглецова С.К. // Рос. хим. ж. (Ж. Рос. хим. об-ва им. Д.И. Менделеева). – 2001. – Т. XIV. – С. 5-6.
2. The biotechnology of *Bacillus thuringiensis* / Andrews R.E., Jr., Faust R.M., Wabiko H., Raymond K.C., Bulla L.A. // Crit. Rev. Biotechnol. – 1987. – V. 6, № 2. – P. 163-232.
3. *Agrobacterium*-mediated transformation of three economically important potato cultivars using sliced intermodal explants: an efficient protocol of transformation / Beaujean A., Sangwan R.S., Lecardonnell A., Sangwan-Norreel B.S. // J. Exp. Bot. – 1998. – V. 49. – P. 1589-1595.
4. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* / Crickmore N., Zeigler D.R., Feitelson J., Schnepf E., van Rie J., Lereclus D., Baum J., Dean D.H. // Mol. Biol. Rev. – 1998. – V. 62. – P. 807-813.
5. De Block M. Genotype-independent leaf disc transformation of potato (*Solanum tuberosum*) using *Agrobacterium tumefaciens* // Theor. Appl. Genet. – 1988. – V. 76 – P. 767-774.
6. Federici B.A., Maddox J.V. Host specificity in microbe-insect interactions // Bioscience. – 1996. – V. 46, № 6. – P. 410-421.
7. Feitelson J.S., Payne J., Kim I. CryV has been proposed to designate a class of toxin genes that are nematode-specific // BioTech. – 1992. – V. 10 – P. 271-275.
8. Transformation and plant regeneration from leaf explants of *Solanum* / Gustafson V., Mallubhotla S., MacDonnell J., Sanyal-Bagchi M., Chakravarty B., Wang-Pruski G., Rothwell I C., Audy P., DeKoeyer D., Siahbazi M., Flinn B., Regan S. // Plant Cell Tiss. Org. Cult. – 2006. – V. 85. – P. 361-366.
9. Miller J.H. Experiments in molecular genetics // Cold Spring Harbok Laboratory. – Cold Spring Harbor: N.Y., 1972. – 466 p.
10. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. – 1962. – V. 15. – P. 473-497.
11. Nguyen T.T., Nugent G., Dix P. Biolistic transformation of potato (*Solanum tuberosum* L.) // Plant Biotechnology: 10th IAPTC&B Congress. Orlando, June 2002. – Orlando, Florida, 2002. – P. 127.
12. Plant regeneration from leaf tissues of four North Dakota genotypes of potato (*Solanum tuberosum* L.) / Park Y.D., Ronis D.H., Boe A.A., Cheng Z.M. // Am. Potato J. – 1995. – V. 72. – P. 329-338.
13. Transformation of potato (*Solanum tuberosum*) using particle bombardment / Romano A., Raemakers K., Visser R., Mooibroek H. // Plant Cell Rep. – 2001. – V. 20. – P. 198-204.
14. One-step transformation to two Andean potato cultivars (*Solanum tuberosum* L. subsp. *andigena*) / Trujillo C., Rodriguez-Arango E., Jaramillo S., Hoyos R., Orduz S., Arango R. // Plant Cell Rep. – 2001. – V. 20. – P. 637-641.
15. Stable chloroplast transformation in potato: use of green fluorescent protein as a plastid marker / Sidorov V.A., Kasten D., Pang S.Z., Hajdukiewicz P.T.J., Staub J., Nehra N. // Plant J. – 1999. – V. 19. – P. 209-216.
16. Turhan H. Callus induction and growth in transgenic potato genotypes // Afr. J. Biotech. – 2004. – V. 3, N 8. – P. 375- 78.
17. Visser R.G.F. Regeneration and transformation of potato by *Agrobacterium tumefaciens* // Plant Tissue Culture Manual. – Dordrecht; Boston; London: Kluwer Academic Publ., 1991. – V. B5. – P. 1-9.

ВИКОРИСТАННЯ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ПРИЙОМІВ ДЛЯ ПІДВИЩЕННЯ ЦУКРОНАКОПИЧЕННЯ ТА СТІЙКОСТІ ЦУКРОВИХ БУРЯКІВ ДО НЕСПРИЯТЛИВИХ ЧИННИКІВ ДОВКІЛЛЯ

О.В. ДУБРОВНА, доктор біологічних наук;
О.М. ТИЩЕНКО, доктор біологічних наук; В.Д. САКАЛО, доктор біологічних наук; Т.В. ЧУГУНКОВА, доктор біологічних наук;
І.І. ЛЯЛЬКО, кандидат біологічних наук
Інститут фізіології рослин і генетики НАН України, Київ

Вступ

Розвиток сучасних біотехнологій розкриває нові перспективи для вирішення глобальних проблем людства, одна з яких пов'язана з удосконаленням нових енергетичних джерел. Цукрові буряки можуть бути перспективною культурою для одержання біопалива, зокрема біоетанолів та біобутанолів, які є альтернативним джерелом бензину та газу. Біобутанол – це наступний значний етап розвитку біопалива, до того ж саме виробництво біобутанолу з технічної точки зору значно простіше, ніж етанолу. Разом з тим, використання цукрових буряків як сировини для біопалива потребує стабільно високого виходу сировини, що забезпечується створенням нових форм рослин, які поєднують високу продуктивність зі стійкістю до стресових чинників довкілля. Різноманітні біотехнологічні прийоми, зокрема клітинна селекція, є перспективним сучасним методом отримання таких матеріалів. Крім того, одним з пріоритетних напрямів біотехнологій є регуляція метаболічних процесів, спрямованих на синтез продуктів з поліпшеними якість, що дозволяє підвищувати енергетичну цінність рослин при використанні їх у промисловому виробництві. У зв'язку з цим, метою роботи було створення нових форм буряків, які характеризуються стійкістю до абіотичних стресових чинників довкілля, та оптимізація у цих рослин шляхів регуляції вуглеводного метаболізму.

Об'єкти та методи досліджень

Калюсні культури цукрових буряків були отримані з листових експлантів диплоїдних рослин сорту Індустріальний, попередньо введених в культуру *in vitro*. Як абіотичні стресові чинники використовували сольовий та низькотемпературний стрес. Для створення стійких до засолення клітинних ліній як селективні чинники застосовували солі хлориду натрію (NaCl) та сульфату натрію (Na₂SO₄), які в різних концентраціях додавали до живильних середовищ.

Для отримання резистентних форм використовували методи прямої та ступінчастої клітинної селекції. За прямого добору у живильне середовище МС додавали солі хлориду та сульфату натрію у сублетальних концентраціях – 2% NaCl, та 2,5% Na₂SO₄. Стійкі клони добирали через 4 тижні. Згідно зі стандартною схемою клітинної селекції, калюси перевіряли в селективних і неселективних умовах. Ступінчасту селекцію проводили за схемою: 1,5% NaCl (3 пасажі) → 2,0% NaCl (3 пасажі) → 2,5% NaCl (3 пасажі) → основне середовище МС (3 пасажі); а також 2,0% Na₂SO₄ (3 пасажі) → 2,5% Na₂SO₄ (3 пасажі) → 3,0% Na₂SO₄ (3 пасажі) → основне середовище МС (3 пасажі).

Вивчення дії позакореневого підживлення мінеральним мікродобривом (акваріном № 5) та регулятором росту (бетастимуліном) на біосинтетичні процеси і продуктивність цукрових буряків проводили в умовах вегетаційних дослідів. У дослідях були використані: рослини лінії 1, які характеризуються перехресною стійкістю до хлоридного засолення та низьких температур, а також рослини лінії 2, які мають перехресну стійкість до сульфатного типу засолення і низьких температур. Рослини вирощували в посудинах із темно-сірим підзоленим ґрунтом (15 кг) з внесенням поживної суміші ВНС і одноразовим підживленням у середині вегетації

нітроамофоскою (5 г на посудину). Повторність досліду 15-разова. Обробку листків проводили двічі протягом вегетації розчином акварину № 5 разом з бетастимуліном (70 мкл бетастимуліну в 1,5 л 1,5% акварину). Перша обробка в фазу 6-8 листків (23.06), друга – через місяць (14.07), у період інтенсивного цукронакопичення.

В онтогенезі рослин визначали активність ферменту синтезу сахарози – СФС; вміст сахарози в листках, судинно-провідних пучках черешків, коренеплодах. Аналізували ріст гички і коренеплодів, розраховували врожайність і продуктивність. Активність СФС визначали за модифікованим нами методом Губера зі співавт. [4]. Виділення СС (сахарозосинтази) з коренеплодів цукрових буряків і визначення її активності проводили за методикою, описаною в [4]. Аналіз сахарози проводили резорциновим методом [5]. Цукристість коренеплодів визначали поляриметричним методом [3]. Урожайність розраховували виходячи з того, що на 1 гектарі 76 000 рослин.

Результати та обговорення

Методами прямої та ступінчастої селекції отримано калюсні лінії цукрових буряків, стійкі до 2,0% хлоридного і 2,5% сульфатного засолення [1]. Була проведена серія експериментів з визначення перехресної стійкості цих форм і до температурного стресу. Експерименти проводили в два етапи – початкове загартування з наступною обробкою негативними температурами. Загартування дослідного матеріалу здійснювали у 2-х режимах: 7 діб при +2°C і 14 діб з послідовною з тижневим інтервалом зміною температур – +6°C і +2°C. Наступна обробка загартованих калюсів температурою -2°C протягом 1, 8 і 16 годин не призвела до загибелі клітинних ліній у жодному з випробуваних варіантів. Солестійкі клітинні лінії були повторно оброблені температурою -5°C протягом 21 години. Через 7 тижнів виявлено близько 40% живих калюсів. Після перенесення на свіже живильне середовище калюси з перехресною стійкістю добре росли протягом кількох пасажів при низьких позитивних температурах (+4 °C).

Частота регенерації у отриманих ліній, стійких до комплексу абіотичних стресів, виявилась низькою – її рівень не перевищував 10%. З калюсних культур цукрових буряків з перехресною стійкістю було регенеровано кілька десятків рослин.

Враховуючи специфічність отриманого нами матеріалу, для збільшення кількості рослин було проведено клональне мікророзмноження отриманих форм удосконаленням нами методом прямої регенерації пагонів із тканин вегетативних органів, який дозволяє репродукувати у чистоті генетично-цінний матеріал та збільшує вихід регенерантів на один експлант [2].

Перевірка ознаки стійкості отриманих регенерантів показала, що серед рослин, індукованих із клітинних ліній з хлоридним типом засолення, після десяти пасажів було виявлено 40-45% стійких (рис. 1), тоді як із клітинних ліній з сульфатним типом засолення – у межах 50-54%. Одержані результати можуть свідчити про те, що клітинні лінії та регенеранти, які зберігали нормальний ріст за дії комплексу стресових чинників, мають генетично обумовлену ознаку стійкості. Це підтвердив і аналіз збереження ознаки у насінневих поколіннях.

Нами вивчено спільний вплив препаратів «Бетастимулін» та «Акварин» на біосинтетичні процеси (активність ключових ферментів вуглеводного обміну – сахарозофосфатсинтази в листках і сахарозосинтази в коренеплодах) на продуктивність нових форм цукрових буряків. Враховуючи можливість регуляції цукронакопичення через вплив біологічно активних речовин на ферментні системи, які відповідають за синтез та метаболізм сахарози, доцільним є поєднання двох біотехнологічних підходів, що, імовірно, буде сприяти одночасному поліпшенню селекційних та технологічних якостей цукрових буряків.



Рис. 1. Регенерант цукрових буряків з перехресною стійкістю до хлоридного засолення та низьких позитивних температур

Обробка рослин аквариноном та бетастимуліном стимулювала активність СФС починаючи з періоду початку цукронакопичення. У рослин ліній активність СФС практично не відрізнялася від рослин вихідного сорту. Так, у рослин лінії 1 у другу половину вегетації питома активність СФС збільшувалася на 96%, загальна – на 70%, а в інші періоди онтогенезу відмічена тенденція до активації ферменту. У рослин лінії 2 практично протягом усієї вегетації відмічено значне збільшення як питомої, так і загальної активності ферменту (71-172%).

У середині вегетації вміст сахарози в листках і судинно-провідних пучках у генотипів, оброблених ФАР, підвищувався. Це корелює зі значною активацією СФС у цей період. Разом з тим активність ферменту до кінця вегетації поступово знижувалася, і тому високий рівень сахарози в тканинах може свідчити про деяке уповільнення відтоку в цей період. Обробка ФАР змінює розподіл сахарози, активуючи транспорт її в коренеплід, в основному в середині вегетації.

Обробка листків фізіологічно активними речовинами також впливала на вміст легкорозчинних білків. У рослин лінії 2 відмічено стабільне підвищення рівня легкорозчинних білків протягом усього онтогенезу, а у рослин лінії 1 – незначне збільшення в кінці вегетації при майже дворазовому зменшенні рівня білків у контролі.

Спільне використання мінерального добрива і бетастимуліну позитивно впливало на ростові процеси та накопичення сухої речовини в листках. Маса гички у рослин ліній 1 та 2 була достовірно вища в кінці вегетації. Взагалі можна сказати, що обробка ліній аквариноном і бетастимуліном позитивно впливала на формування біомаси цукрових буряків. Збільшення маси гички, разом з активацією СФС, підвищенням рівня сахарози в листках і в руслі транспорту, примножують ефект від застосування акварину і бетастимуліну на нових формах буряків. Виходячи з того, що для виробництва біопалива може використовуватись рослинницька продукція технічного характеру, відходи виробництва, надлишки сировини, імовірно, збагачена сахарозою гичка цукрових буряків теж могла б використовуватись у цьому виробництві.

Таким чином, позакореневі обробки цукрових буряків мінеральним мікродобривом (аквариноном № 5) у комплексі з бетастимуліном у період утворення 6-8 листків і інтенсивного цукронакопичення підтримувала до кінця онтогенезу функціональну активність листків рослин ліній, які відрізняються високою стійкістю до стресових факторів довкілля. Біохімічно це виявлялося в активації ферменту синтезу сахарози в листках (СФС), підтриманні високого рівня хлорофілу, білків, стимуляції відтоку сахарози, збільшенні маси гички.

Обробка ФАР призводить до збільшення відношення реакцій синтез/розщеплення.

Щодо рослин лінії 1 можна сказати, що розщеплення сахарози в коренеплодах на початку вегетації було практично на рівні контролю, а в кінці дещо інгібувалося, але відношення реакцій синтез/розщеплення було вище в контролі. За цим показником можна сказати, що обробка ФАР більш сприяє процесу розщеплення сахарози, хоча різниця у відношенні цих реакцій незначна. В коренеплодах рослин лінії 2 активація СС в реакції розщеплення сахарози при обробці посівів ФАР відмічена тільки в кінці вегетації (26-23%), у той же час як синтез сахарози залишався практично на рівні контролю. На початку вегетації відношення реакцій синтез/розщеплення сахарози було на користь розщеплення, а в кінці – синтезу, що є дуже позитивним для забезпечення як ростових процесів, так і цукронакопичення

У рослин лінії 1 метаболізм сахарози при обробці акваарином спільно з бетастимуліном був спрямований на збільшення цукронакопичення, що призвело до підвищення цукристості коренеплодів на 0,4% і збільшило збір цукру на 4,6%, проте розрахункова врожайність залишалась на рівні контролю. Найкращі результати були отримані у рослин лінії 2, де на фоні підвищення урожайності цукристість підвищувалась на 0,8%, що дало розрахункове збільшення збору цукру на 16%. Обробка посівів акваарином спільно з бетастимуліном позитивно впливала і на доброякісність цукросировини. Так, вміст «нецукрів» у складі сухої речовини знижувався у рослин ліній, а співвідношення сахароза / «нецукри» було вище в усіх досліджених генотипів, що свідчить про фізіологічну зрілість коренеплодів.

Обробка посівів цукрових буряків акваарином і бетастимуліном збільшувала функціональну активність листків: активацію СФС у листках, підсилення ростових процесів і відтоку сахарози в коренеплоди. Регуляція СС у коренеплодах стимулювала або їх ріст, або цукронакопичення. Як результат – вихід цукру збільшувався не тільки за рахунок підвищення врожайності, але й внаслідок підвищення цукристості. Одержані дані свідчать про те, що, змінюючи дози добрив і співвідношення в них елементів живлення, використовуючи їх з регуляторами росту, можна впливати на спрямованість метаболічних процесів, які визначають як інтенсивність росту коренеплодів, так і їх цукристість.

Висновки

Вперше за допомогою методів клітинної селекції отримано нові форми цукрових буряків, у яких поєднуються стійкість до кількох стресових чинників. Експериментально обґрунтована можливість регуляції цукронакопичення через вплив біологічно активних речовин на ферментні системи, які відповідають за синтез та метаболізм сахарози, що пов'язано з підвищенням продуктивності цукрових буряків. Поєднання двох біотехнологічних підходів сприяє одночасному поліпшенню селекційних та технологічних якостей буряків.

Список літератури

1. Дубровна О.В., Лялько І.І., Хомочкіна М.П. Добір закріплювачів стерильності О-типу цукрових буряків з підвищеною стійкістю до хлоридного засолення в культурі *in vitro* // Фактори експериментальної еволюції організмів: Збірник наукових праць. – К.: Логос, 2006. – Т. 3. – С. 556-560.
2. Дубровна О.В., Лялько І.І. Мікроклональне відтворення селекційно-цінних форм цукрових та кормових буряків // Фактори експериментальної еволюції організмів: Збірник наукових праць. – К.: Аграрна наука, 2003. – С. 410-414.
3. Починок Х.Н. Методы биохимического анализа растений. – К.: Наукова думка, 1976. – С. 154-157.
4. Сакало В.Д. Активация сахарозосинтазы в “стареющих” тканях корнеплодов сахарной свеклы // Физиология и биохимия культ. растений. – 1993. – Т. 25, № 1. – С. 66-72.

5. Huber S.C., Huber J.L. Role and regulation of sucrose phosphate synthase in higher plants // *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* – 1996. – V. 47. – P. 431-444.

6. Roe J.H. A Colorimetric method for the determination of fructose in blood and urine // *J. Biol. Chem.* – 1954. – V. 107. – P. 15-22.

ЭФФЕКТИВНАЯ РЕГЕНЕРАЦИЯ САХАРНОЙ СВЕКЛЫ (*BETA VULGARIS L.*) ДЛЯ АГРОБАКТЕРИАЛЬНОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ СИНТЕТИЧЕСКИМ ГЕНОМ *CRYIAC*

В.В. ИВАНИЦКАЯ; Д.И. ЛИТВИН, кандидат биологических наук;

А.И. ЕМЕЦ, кандидат биологических наук;

Я.Б. БЛЮМ, доктор биологических наук

Институт пищевой биотехнологии и геномики НАН Украины, Киев

Введение

Сахарная свекла (*Beta vulgaris L.*) является одной из наиболее важных технических культур, поскольку около 40% сахара в мире изготавливается из сахарной свеклы [11]. В прошлом году площадь посевов данной культуры на Украине составляла примерно 400 тыс. га с урожайностью около 300 ц/га. Данная культура используется не только для производства сахара, но и для получения патоки, а зеленую массу используют в качестве корма для домашних животных. Поэтому развитие селекционно-генетических работ, направленных на улучшение потенциала выращивания сахарной свеклы и производство сахара, имеет большое экономическое значение для нашей страны. Однако ввиду вариабельности генотипа, низкого регенерационного и трансформационного потенциала сахарной свеклы существуют серьезные ограничения для применения основных биотехнологических манипуляций *in vitro* с исходным экспериментальным материалом этой культуры, призванных обеспечить ускорение и технологическое обновление арсенала селекционных возможностей, направленных на повышение показателей урожайности и устойчивости данной культуры к различного рода патогенам и вредителям.

Результаты ряда работ указывают на то, что регенерация сахарной свеклы в условиях *in vitro* является достаточно сложным процессом. И хотя были получены регенеранты из листьев, черешков [1-3], гипокотилей [5], семядолей [2], базальной части побега [4, 7] и узлов семядольных листьев [6], воспроизводимость данных методик для различных генотипов сахарной свеклы является проблематичной. Также отсутствует хорошо разработанная универсальная методика агробактериальной трансформации для этой культуры [4, 6, 7, 9].

Поэтому целью данного исследования был подбор оптимальных условий для регенерации растений сахарной свеклы из листовых дисков и оптимизация протокола агробактериальной трансформации данного типа эксплантов для переноса синтетического гена *cryIac*, обеспечивающего устойчивость к ряду насекомых-вредителей отряда Lepidoptera (Чешуекрылые).

Объекты и методы исследования

Растительный материал. В работе использовали исходную отцовскую селекционную линию свеклы MM1/2, любезно предоставленную Институтом сахарной свеклы УААН. Стерильные побеги выращивали на среде Мурасиге и Скуга (МС) [8], содержащей либо 6-бензиламинопурина (БАП) в концентрации 1 мг/л, либо комбинацию регуляторов роста 0,25 мг/л БАП и 0,1 мг/л β -индолил-3-масляную кислоту (ИМК). Для индукции корнеобразования культивируемые микропобеги пересаживали на безгормональную среду МС.

Агробактериальная трансформация. Трансформацию проводили с помощью штамма LB 4404 *Agrobacterium tumefaciens*, содержащего бинарный вектор p1AcPRD со встроенным синтетическим геном *cryIAc*, обеспечивающим устойчивость к ряду насекомых-вредителей отряда Lepidoptera, под контролем Double 35S промотора, и селективным маркерным геном *nptIII*, обеспечивающим устойчивость к канамицину. Для трансформации бактериальную культуру *A. tumefaciens* выращивали на жидкой среде LB [10] с добавлением 50 мг/л канамицина при температуре 28°C и при постоянном помешивании на шейкере в течение 24 часов. Затем ее центрифугировали при 3500 об/мин. в течение 10-15 минут, после чего ресуспензировали в жидкой среде МС с добавлением 50 мМ ацетосиринагона, рН 5,5.

Трансформацию проводили согласно методу, предложенному Nogouzi et al. [9], с некоторыми модификациями. В качестве эксплантов использовали листовые диски диаметром 15 мм, которые помещали в среду МС, содержащую суспензию агробактерий. Далее экспланты инкубировали с бактерией на протяжении 5 мин., после чего просушивали на фильтровальной бумаге и переносили на безгормональную среду МС для ко-культивирования в течение 2-3 суток. Далее экспланты отмывали 2-3 раза стерильной дистиллированной водой с добавлением 500 мг/л цефотаксима, подсушивали на фильтровальной бумаге и переносили на агаризованную среду МС, содержащую 200 мг/л канамицина и 250 мг/л цефотаксима. Каждые две недели экспланты пересаживали на свежеприготовленную питательную среду, содержащую канамицин и цефотаксим в тех же концентрациях. Регенерировавшие побеги впоследствии пересаживали на среду с меньшей концентрацией канамицина (50 мг/л) и цефотаксима (150 мг/л), для последующего роста и развития.

Результаты и обсуждение

Разработка протокола регенерации сахарной свеклы. Целью первого этапа работы был подбор оптимальных условий для клонального микроразмножения и регенерации растений из листовых эксплантов сахарной свеклы линии ММ1/2, поскольку опубликованные ранее протоколы для регенерации сахарной свеклы из разных типов эксплантов [1-6] не были эффективны в наших экспериментах. В процессе оптимизации протокола было испытано несколько различных концентраций регуляторов роста (табл. 1), а именно БАП в концентрациях 0,2; 0,5; 1 и 2 мг/л, а также комбинации БАП (0,1; 0,2; 0,25; 0,3; 1 и 3 мг/л) и ИМК (0,1; 0,2; 0,5; 1 и 2 мг/л), которые добавляли в среду МС.

При подборе эффективных условий прямой регенерации сахарной свеклы из листовых дисков были отобраны следующие комбинации регуляторов роста: 1 мг/л БАП либо 0,25 мг/л БАП и 0,1 мг/л ИМК. При этом эффективность регенерации на 10-14 сутки после высаживания эксплантов на данные среды составляла 60%. Применение других сочетаний БАП и ИМК индуцировало регенерацию единичных микропобегов. На рис. 1 показаны примеры эффективной регенерации сахарной свеклы из листовых дисков с использованием двух предложенных комбинаций регуляторов роста для регенерации микропобегов. При использовании данных сред спонтанное корнеобразование у части регенерировавших побегов также являлось одной из характерных особенностей развития эксплантов. Для эффективного корнеобразования микропобеги пересаживали на безгормональную среду МС.

Трансформация сахарной свеклы. В результате агробактериальной трансформации штаммом LB 4440 *A. tumefaciens* были отобраны экспланты, образующие побеги, которые на протяжении нескольких пассажей росли на селективной среде для регенерации растений с добавлением 250 мг/л цефотаксима и 200 мг/л канамицина. После образования микропобегов, для последующего роста и развития их пересаживали на среду, содержащую более низкие концентрации канамицина и цефотаксима (50 и 150

мг/л соответственно) (рис. 2). Необходимо отметить, что в ходе проведенных экспериментов эффективность трансформации (процентное соотношение количества полученных регенерантов на селективной среде к общему числу высаженных эксплантов) составляла 10-12%, что совпадает с результатами, полученными ранее [9].

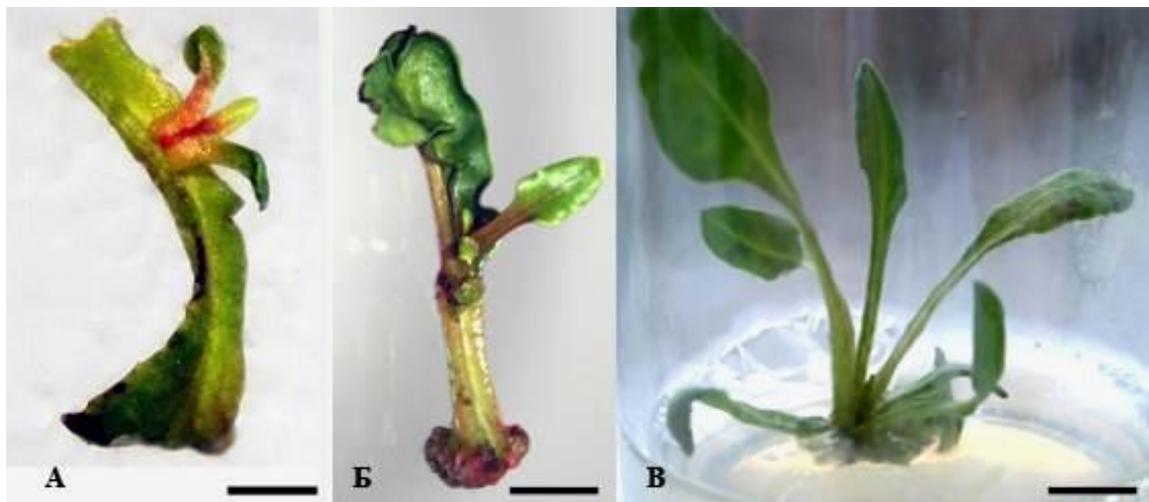


Рис. 1. Регенерация сахарной свеклы из листовых дисков на средах, содержащих 1 мг/л БАП (А), 0,25 мг/л БАП и 0,1 мг/л ИМК (Б), а также развитие полноценного растения на безгормональной среде МС (В). Масштаб: А, Б – 0,5 см, В – 1 см

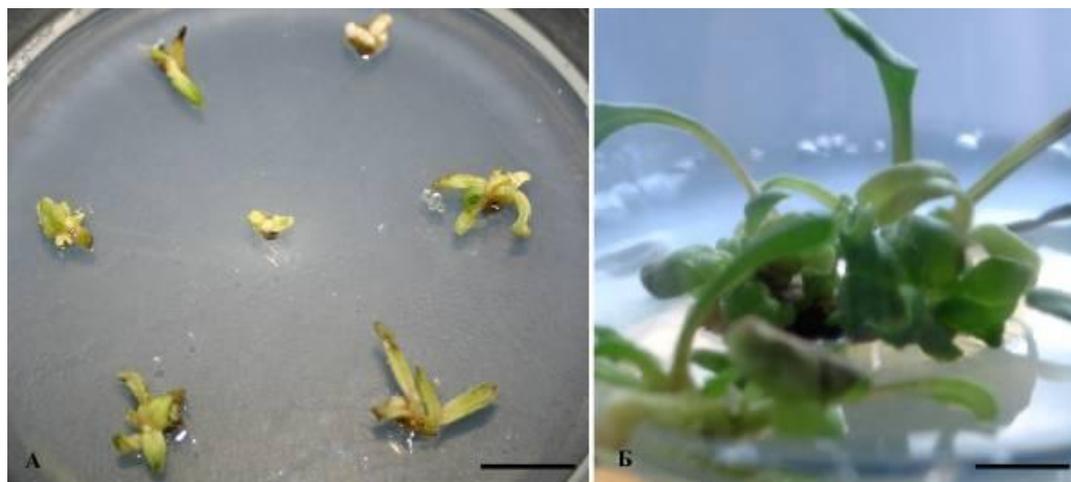


Рис. 2. Трансформанты сахарной свеклы: А) Регенерация растений на селективной среде МС, содержащей 250 мг/л цефотаксима и 200 мг/л канамицина; Б) Трансформант сахарной свеклы на среде МС, содержащей 50 мг/л канамицина и 150 мг/л цефотаксима. Масштаб: А) 1.5 см; Б) 0.5 см

Отселектированные трансформанты сахарной свеклы на протяжении года постоянно субкультивировали на селективной среде МС, содержащей 50 мг/л канамицина и 150 мг/л цефотаксима. Это позволяет предположить, что данные растения сахарной свеклы могут нести в себе целевой ген *cryIAc*, обеспечивающий устойчивость к ряду насекомых-вредителей отряда *Lepidoptera*, а также селективный маркерный ген *nptII*, что будет проверено на последующих этапах работы.

Выводы

В ходе проведенной работы оптимизирован протокол регенерации растений из листовых эксплантов сахарной свеклы линии ММ1/2. Эффективность регенерации у данной линии составляла свыше 60% на средах с модифицированным в ходе исследований составом. У части регенерантов при культивировании на этих средах наблюдали спонтанное корнеобразование. Дальнейшее укоренение побегов осуществляли на безгормональной среде МС. В результате проведенных экспериментов также оптимизирован протокол агробактериальной трансформации данной культуры и осуществлен перенос синтетического гена *cryIAc* с помощью *A. tumefaciens*. Эффективность трансформации на селективной среде составляла 10-12%. Стабильный рост и размножение отобранных растений на селективных средах позволяет предположить, что полученные трансформанты содержат *cryIAc*-ген, наличие которого будет проверено в дальнейшем с помощью молекулярно-биологических методов анализа.

Список литературы

1. Регенерация растений сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) в культуре *in vitro*. Гистологическое изучение процессов регенерации / Банникова М.А., Головки А.Э., Хведынич О.А., Кучук Н.В. // Цитология и генетика. – 1995. – Т. 25, № 6. – С. 14-22.
2. Бормотов В.Е., Свирщевская А.М. Получение регенерантов сахарной свеклы в культуре *in vitro* // Докл. АН БССР. – 1989. – Т. 33. – С. 926-927.
3. Detrez C., Sangwar R.S., Sangwar-Norreel B.S. Phenotypic and karyotypic status of *Beta vulgaris* plants regenerated from direct organogenesis in petiole culture // Theor. Appl. Genet. – 1989. – V. 77. – P. 462-468.
4. High frequency *Agrobacterium*-mediated transformation and plant regeneration via direct shoot formations from leaf explants in *Beta vulgaris* and *Beta maritima* / Hisano H., Kimoto Y., Hayakawa H., Takeichi J., Domae T., Hashimoro R. // Plant Cell Rep. – 2004. – V. 22. – P. 910-918.
5. Plant regeneration from sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) hypocotyls cultured *in vitro* and flow cytometric nuclear DNA analysis of regenerant / Jacq B., Tetu T., Sangwan R.S., De Laat A., Sangwan-Norreel // Plant Cell Rep. – 1992. – V. 11. – P. 329-333.
6. The effect of exogenously – applied phytohormones on gene transfer efficiency in sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) / Krens F.A., Trifonova A., Keizez L.C.P., Hall R.D. // Plant Sci. – 1996. – V. 116. – P. 97-106.
7. Lindsey K., Gallois P. Transformation of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) by *Agrobacterium tumefaciens* // J. Exp. Bot. – 1990. – V. 41. – P. 529-536.
8. Murashige T., Skoog F. A revised medium for a rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. – 1962. – V. 15. – P. 473-497.
9. Using a competent tissue for efficient transformation of sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) / Norouzi R., Malboobi M.A., Zamani K., Yazdi-Samadi B. // In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant. – 2005. – V. 41. – P. 11-16.
10. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual 2nd. – Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. – V. 2. – 1659 p.
11. Winner C. History of the crop // The sugar beet crop: Science into practice / Eds. Cooke D.A., Scott R.K. – London: Chapman and Hall, 1993. – P. 1-35.

РЕФЕРАТЫ

УДК 582.47:631.532(571.1/.5)

Третьякова И.Н., Барсукова А.В., Савельев С.С., Сиренко А.С. Сочетание классической селекции и применения современных методов биотехнологии для сохранения генофонда хвойных видов Сибири // Сборник научных трудов Никит. ботан. сада. – 2009. – Т. 131. – С. 5-9.

В результате опытов по гибридизации кедра сибирского на клоновой прививочной плантации были получены шишки первого поколения с высокой семенной продуктивностью. Выявлены комплементарные признаки между родительскими генотипами, приводящие к гетерозису. Введением изолированных зародышей кедра сибирского и лиственницы сибирской в культуру *in vitro* путем подбора состава питательных сред была получена эмбрионально-суспензорная масса, соматические зародыши и регенеранты. Наиболее активным ростом обладала эмбриогенная масса гибридных семян, полученная от гетерозисных деревьев опылителей с однолетним циклом развития женских шишек. Определены генотипы донорных растений лиственницы сибирской и кедра сибирского, способные давать чистые эмбриогенные линии, соматические зародыши и регенеранты.

Ил. 3. Библ.8.

Третьякова І.М., Барсукова А.В., Савельєв С.С., Сіренко А.С. Сполучення класичної селекції та застосування сучасних методів біотехнології для збереження генофонду хвойних видів Сибіру // Збірник наукових праць Нікіт. ботан. саду. – 2009. – Т. 131. – С. 5-9.

У результаті дослідів з гібридизації кедра сибірського на клоновій прищепній плантації були отримані шишки першого покоління з високою насінною продуктивністю. Виявлені комплементарні ознаки між батьківськими генотипами, що приводять до гетерозису. Введенням ізольованих зародків кедра сибірського й модрина сибірської в культуру *in vitro* шляхом добору складу живильних середовищ було отримано ембріонально-суспензорну масу, соматичні зародки та регенеранти. Найактивнішим зростанням відрізнялася ембріогенна маса гібридного насіння, отримана від гетерозисних дерев запильників з однорічним циклом розвитку жіночих шишок. Визначені генотипи донорних рослин модрина сибірської та кедра сибірського, здатні давати чисті ембріогенні лінії, самотичні зародки та регенеранти.

Ил. 3. Библ. 8.

Tretyakova I.N., Barsukova A.V., Savelyev S.S., Sirenko A.S. Combination of classical breeding and application of modern methods of biotechnology for gene preservation of Siberian conifer species // Collected scientific works of Nikit. Botan. Gard. – 2009. – V. 131. – P. 5-9.

As a result of hybridization experiments with *Pinus sibirica* on clonally grafting plantation, cones of first generation with high seed productivity have been obtained. It is shown complimentary characteristics between parental genotypes which leads to heterosis. Embryonal suspensor masses, somatic embryo and plant regeneration from zygotic embryos of Siberian pine and Siberian larch in culture *in vitro* have been obtained by selection of culture medium composition. Embryonal masses of hybrid seeds from heterosis trees with annual cycle development of female cone have active growth. Genotypes of donor plants of Siberian larch and Siberian pine which produced pure embryonal line, somatic embryo and plant have been determined.

Fig. 3. Bibl. 8.

УДК 504.73:57.085.2

Митрофанова И.В. Соматический эмбриогенез и органогенез как основа биотехнологических систем получения и сохранения декоративных и плодовых культур // Сборник научных трудов Никит. ботан. сада. – 2009. – Т. 131. – С. 9-22.

Представлены результаты многолетних исследований по соматическому эмбриогенезу и органогенезу некоторых декоративных и плодовых культур в условиях *in vitro*. Продемонстрированы биотехнологические системы получения и сохранения растений.

Ил. 14. Библ. 32.

Митрофанова І.В. Соматичний ембріогенез і органогенез як основа біотехнологічних систем одержання та збереження декоративних і плодкових культур // Збірник наукових праць Нікіт. ботан. саду. – 2009. – Т. 131. – С. 9-22.

Представлено результати багаторічних досліджень із соматичного ембріогенезу та органогенезу деяких декоративних і плодкових культур в умовах *in vitro*. Продемонстровано біотехнологічні системи одержання та збереження рослин.

Іл. 14. Бібл. 32.

Mitrofanova I.V. Somatic embryogenesis and organogenesis as a base of biotechnological system of ornamental plants and fruits obtaining and preservation // Collected scientific works of Nikit. Botan. Gard. – 2009. – V. 131. – P. 9-22.

The results of many years investigations in somatic embryogenesis and organogenesis *in vitro* of some ornamental plants and fruits have been shown. Biotechnological systems of plant obtaining and preservation have been demonstrated.

Fig. 14. Bibl. 32.

УДК 573.6:58.085

Молканова О.И. Генетические банки растений в ботанических садах России // Сборник научных трудов Никит. ботан. сада. – 2009. – Т. 131. – С. 22-27.

Наряду с традиционными методами сохранения растений *ex situ*, использование метода культуры тканей и органов растений становится все более актуальным. Наиболее представительные коллекции меристем *in vitro* находятся в ГБС РАН и ГУ ВРБС. Хранение меристем редких и ценных растений *in vitro* при температуре 3-5°C и криоконсервация семян при температуре -196°C является высокоэффективным способом поддержания коллекций и сохранения биоразнообразия растений. При создании генетических банков особое внимание уделяется репрезентативности и поддержанию генетической стабильности таксонов, сохраняемых *in vitro*. Для верификации коллекций *in vitro* использовали молекулярно-генетический анализ, основанный на анализе относительных генетических расстояний между клонами и известными таксонами.

Ил. 3. Табл. 1. Библ. 8.

Молканова О.І. Генетичні банки рослин у ботанічних садах Росії // Збірник наукових праць Нікіт. ботан. саду. – 2009. – Т. 131. – С. 22-27.

Поряд із традиційними методами збереження рослин *ex situ*, використання методу культури тканин і органів рослин стає дедалі актуальнішим. Найбільш репрезентативні колекції меристем *in vitro* розміщені у ДБС РАН і ГУ ВРБС. Зберігання меристем рідкісних і цінних рослин *in vitro* при температурі 3-5°C та криоконсервация насіння при температурі -196°C є вискоєфективним способом підтримання колекцій та збереження біорізноманіття рослин. При створенні генетичних банків особлива увага віддається репрезентативності та підтриманню генетичної стабільності таксонів, що зберігаються *in vitro*. Для верифікації колекцій *in vitro* використовували молекулярно-генетичний аналіз, що ґрунтується на аналізі відносних генетичних відстаней між клонами та відомими таксонами.

Іл. 3. Табл. 1. Бібл. 8.

Molkanova O.I. Plant gene banks in botanical gardens of Russia // Collected scientific works of Nikit. Botan. Gard. – 2009. – V. 131. – P. 22-27.

Application of isolated plant tissue and organ culture is coming more and more urgent along with traditional plant *ex situ* conservation methods. The most representative collections of plant meristems *in vitro* are located in MBG and VRBG. Storage of rare and valuable plant meristems under 3-5°C *in vitro* and cryopreservation of seeds (conservation by cooling to -196°C) is highly efficient and useful way for maintaining plant collections and conservation of plant biodiversity. During the creation of gene banks, plant species representativeness and genetic stability preservation is given a high priority. Molecular genetic analysis, based on the evaluation of relative genetic distance between clones and known taxa is proposed as a method to verify *in vitro* germplasm collections.

Fig. 3. Tabl. 1. Bibl. 8.

УДК 635.92:632.938(474.5)

Навалинскене М., Самуйтене М., Григалюнайте Б., Юодкайте Р., Штукенене Г., Дапкунене С. Фитопатологический контроль генофонда декоративных растений в Литве // Сборник научных трудов Никит. ботан. сада. – 2009. – Т. 131. – С. 27-31.

В Литве на базе Ботанического сада Вильнюсского университета создан генофонд декоративных растений, в который с 1992 г. включены сорта, созданные литовскими селекционерами. При отборе растений основное внимание уделяется фитосанитарному состоянию коллекций: *Dahlia* Cav., *Gladiolus* L., *Iris* L., *Paeonia* L., *Tulipa* L. Обследовали коллекции и идентифицировали возбудители вирусных и грибных заболеваний, чаще всего встречающихся на перечисленных декоративных растениях.

Ил. 5. Библ. 18.

Навалінскене М., Самуйтене М., Грігалюнайте Б., Юодкайте Р., Штукенене Г., Дапкунене С. Фітопатологічний контроль генофонду декоративних рослин у Литві // Збірник наукових праць Нікіт. ботан. саду. – 2009. – Т. 131. – С. 27-31.

У Литві на базі Ботанічного саду Вільнюського університету створено генофонд декоративних рослин, до якого з 1992 р. включені сорти, створені литовськими селекціонерами. При доборі рослин основна увага віддається фітосанітарному стану колекцій: *Dahlia* Cav., *Gladiolus* L., *Iris* L., *Paeonia* L., *Tulipa* L. Обстежено колекції та ідентифіковано збудників вірусних і грибних захворювань, що найчастіше трапляються на зазначених декоративних рослинах.

Іл. 5. Бібл. 18.

Navalinskėnė M., Samuitėnė M., Grigalūnaitė B., Yuodkaitė R., Štukėnienė G., Dapkūnienė S. Phytopathological control of ornamental plant genefund in Lithuania // Collected scientific works of Nikit. Botan. Gard. – 2009. – V. 131. – P. 27-31.

The genefund of ornamental plants in Lithuania has been established on basis of Botanical Garden of Vilnius University. Since 1992 cultivars of ornamental plants created by Lithuanian breeders have been included in genefund. During plants selection the great attention has been paid to phytosanitary state of plant species *Dahlia* Cav., *Gladiolus* L., *Iris* L., *Paeonia* L., *Tulipa* L. growing in collections. The collection have been surveyed regularly; causing agents of viral and fungal diseases the most frequently affecting these ornamental plants have been identified.

Fig. 5. Bibl. 18.

УДК 633.86:631.527:631.526.3(437.1/2)

Ухер Ю. Селекция, оценка и создание генобанка *Carthamus tinctorius* L. в Чешской Республике // Сборник научных трудов Никит. ботан. сада. – 2009. – Т. 131. – С. 32-37.

В 1994-2006 гг. коллекция *Carthamus tinctorius* L., состоящая из 140 генотипов, была оценена на факультете садоводства в МУСХиЛ в Брно по 30 морфологическим признакам. Значительные корреляции были отмечены между ростом растений и таким важным признаком для цветоводства, как большие головки с прицветником без колючек и цветами ярко-красного цвета. Была подтверждена значительная корреляция между желтыми цветами и большим количеством колючек, но при этом среди них был выявлен почти безколючковый генотип с желтыми цветами. Этот генотип используется как исходный материал (вместе со средне-ранним сортом с ярко-красными цветами) для селекции новых декоративных сортов.

Табл. 3. Библ. 26.

Ухер Ю. Селекція, оцінка та створення генобанку *Carthamus tinctorius* у Чеській Республіці // Збірник наукових праць Нікіт. ботан. саду. – 2009. – Т. 131. – С. 32-37.

У 1994-2006 р. колекція *Carthamus tinctorius* L., що складається зі 140 генотипів, була оцінена на факультеті садівництва у МУСГіЛ у Брно за 30 морфологічними ознаками. Значні кореляції відзначені між ростом рослин та такою важливою ознакою для квіткарництва, як великі голівки із приквітком без колючок та квітками яскраво-червоного кольору. Була підтверджена значна кореляція між жовтими квітками та великою кількістю колючок, але при цьому серед них було виявлено майже безколючковий генотип із жовтими квітками. Цей генотип

використовується як вихідний матеріал (разом із середньо-раннім сортом із яскраво-червоними квітками) для селекції нових декоративних сортів.

Табл. 3. Бібл. 26.

Uher J. Safflower breeding, evaluation and genepool maintenance in the Czech Republic // Collected scientific works of Nikit. Botan. Gard. – 2009. – V. 131. – P. 32-37.

In 1994-2006, the safflower germplasm collection containing 140 genotypes was evaluated at Faculty of Horticulture, MUAF Brno, in thirty morphological characters. A significant correlations were marked among plant height and the important characters in floricultural practice as large heads with the spineless bracts and vermillion-red flowers. A significant correlations between yellow flowers and high spininess of outer phyllaries has been confirmed, but nearly spineless, yellow-flowered genotype was selected as well - this one has been used (together with a medium-early variety with deep vermillion flowers) as initial material for selection of new ornamental varieties.

Табл. 3. Bibl. 26.

УДК 635.9:582.734.4:631.528.1

Зыков К.И., Клименко З.К. Спонтанная мутационная изменчивость количественных признаков и её генетические аспекты на примере махровости цветков роз // Сборник научных трудов Никит. ботан. сада. – 2009. – Т. 131. – С. 37-43.

Выявлена зависимость специфики изменчивости махровости цветков у спонтанных почковых мутантов (спортов) садовых роз от особенностей генотипа исходных сортов.

Табл. 3. Библ. 5.

Зыков К.И., Клименко З.К. Спонтанна мутаційна мінливість кількісних ознак та її генетичні аспекти на прикладі махровості квіток троянд // Збірник наукових праць Нікіт. ботан. саду. – 2009. – Т. 131. – С. 37-43.

Выявлена залежність специфіки мінливості махровості квіток у спонтанних брунькових мутантів (спортів) садових троянд від особливостей генотипу вихідних сортів.

Табл. 3. Бібл. 5.

Zykov K.I., Klimenko Z.K. Spontaneous mutational variability of quantitative characteristics and its genetic aspects on the example of double rose flowers // Collected scientific works of Nikit. Botan. Gard. – 2009. – V. 131. – P. 37-43.

The dependence of specific variability of double flowers for spontaneous bud mutants (sports) of garden roses from the genotype peculiarities of starting varieties has been determined.

Табл. 3. Bibl. 5.

УДК 582.998.16:575.222.7

Недолужко А.И., Недолужко А.В. Межвидовая гибридизация – перспективный метод сохранения генетических ресурсов рода *Chrysanthemum* L. // Сборник научных трудов Никит. ботан. сада. – 2009. – Т. 131. – С. 43-46.

Результаты межвидовой гибридизации *Chrysanthemum* L. с разным и одинаковым уровнем ploидности указывают на отсутствие барьеров нескрещиваемости и близкое генетическое родство большинства исследованных видов и позволяют сохранить комплекс ценных признаков в гибридных формах.

Табл. 2. Библ. 11.

Недолужко А.И., Недолужко А.В. Міжвидова гібридизація – перспективний метод збереження генетичних ресурсів роду *Chrysanthemum* L. // Збірник наукових праць Нікіт. ботан. саду. – 2009. – Т. 131. – С. 43-46.

Результати міжвидової гібридизації *Chrysanthemum* L. з різним і однаковим рівнем ploидності вказують на відсутність бар'єрів нескрещуваності й близьку генетичну спорідненість більшості досліджуваних видів та дозволяють зберегти комплекс цінних ознак у гібридних формах.

Табл. 2. Бібл. 11.

Nedoluzhko A.I., Nedoluzhko A.V. Interspecific hybridization – the perspective method of genetic resources preservation of genus *Chrysanthemum* L. // Collected scientific works of Nikit. Botan. Gard. – 2009. – V. 131. – P. 43-46.

The results of interspecific hybridization of *Chrysanthemum* L. with different and the same level of ploidy denote absence of non-cross compatibility barriers and close genetic relation of majority of examined species and allow to preserve the complex of valuable characteristics in the hybrid forms.

Tabl. 2. Bibl. 11.

УДК 635.9:57.085.2

Набиева А.Ю. Клональное микроразмножение сортов *Hemerocallis* L. и *Hosta* L. при использовании эксплантов тканей и органов цветка // Сборник научных трудов Никит. ботан. сада. – 2009. – Т. 131. – С. 47-50.

Разработана технология регенерации *in vitro* 2 сортов *Hemerocallis* и 3 сортов *Hosta* из соматических тканей и органов цветка. Необходимым фактором органогенеза являлось включение в состав иницирующей среды MSm как ауксина 2,4-Д (0,5-1 мг/л), так и цитокинина БАП (0,4-0,8 мг/л). Изменчивость, полученная среди регенерантов одного из сортов хосты, возможно, связана с нестабильностью данного генотипа.

Ил. 4. Табл. 1. Библ. 11.

Набієва А.Ю. Клональне мікророзмноження сортів *Hemerocallis* L. і *Hosta* L. при використанні експлантів тканин і органів квітки // Збірник наукових праць Нікіт. ботан. саду. – 2009. – Т. 131. – С. 47-50.

Розроблено технологію регенерації *in vitro* 2 сортів *Hemerocallis* та 3 сортів *Hosta* із соматичних тканин і органів квітки. Необхідним чинником органогенезу була наявність у складі ініційованого середовища MSm як ауксину 2,4-Д (0,5-1 мг/л), так і цитокініну БАП (0,4-0,8 мг/л). Мінливість, що має місце серед регенерантів одного з сортів хости, можливо, пов'язана з нестабільністю цього генотипу.

Ил. 4. Табл. 1. Библ. 11.

Nabieva A.Y. Clonal micropropagation of *Hemerocallis* and *Hosta* cultivars using the explants from tissues and organs of flower // Collected scientific works of Nikit. Botan. Gard. – 2009. – V. 131. – P. 47-50.

In vitro regeneration techniques of 2 cultivars of *Hemerocallis* and 3 cultivars of *Hosta* from somatic tissues and flower organs have been worked out. The organogenesis was occurred when auxin 2,4-D (0,5-1 mg/l) in combination with cytokinin BAP (0,4-0,8 mg/l) were added to the modified MS culture medium. The reason of somaclonal variability of *Hosta* cultivar regenerants might be connected with genotype instability.

Fig. 4. Tabl. 1. Bibl. 11.

УДК 582.736.3:58.085

Майстренко Г.Г., Новикова Т.И., Селютина И.Ю., Сидорова К.К. Клональное микроразмножение редкого сибирского вида *Gueldenstaedtia monophylla* Fisch. // Сборник научных трудов Никит. ботан. сада. – 2009. – Т. 131. – С.

Показана возможность клонального микроразмножения *Gueldenstaedtia monophylla* Fisch. – редкого, эндемичного для Центральной Азии вида из Алтая с использованием в качестве первичного экспланта семян. Методика включает клональное микроразмножение эпикотилей с конусом нарастания на различных средах, содержащих НУК и БАП. Высокая частота побегообразования (21,5 шт./эксплант) получена после культивирования на среде В5, содержащей 0,1 мг/л НУК и 0,2 мг/л БАП в течение 4 недель и затем на ½ МС с 0,4 мг/л НУК и 1,0 мг/л БАП. Укоренение проводили на ½ МС с добавлением 1% активированного угля. Представленный протокол является основой для сохранения *in vitro* этого редкого вида.

Ил. 2. Табл. 1. Библ. 16.

Майстренко Г.Г., Новікова Т.И., Селютіна І.Ю., Сидорова К.К. Клональне мікророзмноження рідкісного сибірського виду *Gueldenstaedtia monophylla* Fisch. // Збірник наукових праць Нікіт. ботан. саду. – 2009. – Т. 131. – С. 50-54.

Показано можливість клонального мікророзмноження *Gueldenstaedtia monophylla* Fisch. – рідкісного, ендемічного для Центральної Азії виду з Алтаю з використанням насіння як первинного експланта. Методика включає клональне мікророзмноження епікотилів з конусом наростання на різних середовищах, що містять HO_2K і БАП. Високу частоту пагоноутворення (21,5 шт./експлант) отримано після культивування на середовищі B5, яке містить 0,1 мг/л HO_2K і 0,2 мг/л БАП протягом 4 тижнів та потім на $\frac{1}{2}$ MS з 0,4 мг/л HO_2K і 1,0 мг/л БАП. Укорінення здійснювали на $\frac{1}{2}$ MS з додаванням 1% активованого вугілля. Поданий протокол є основою для збереження *in vitro* цього рідкісного виду.

Ил. 2. Табл. 1. Бібл. 16.

Maistrenko G.G., Novikova T.I., Selyutina I.Yu., Sidorova K.K. Clonal micropropagation of rare Siberian species *Gueldenstata monophila* Fisch. // Collected scientific works of Nikit. Botan. Gard. – 2009. – V. 131. – P. 50-54.

Clonal micropropagation of *Gueldenstaedtia monophylla* Fisch., rare and endemic species for Central Asia from Altai Mountains, was successfully achieved using seeds as initial explants. The technique involves the clonal micropropagation of epicotyls with growing-point on different media, containing NAA and BAP. The highest shoot proliferation rates (21,5 shoots per explant) were obtained after cultivation on B5 medium, supplemented 0,1 mg/l NAA and 0,2 mg/l BAP within four weeks and then on $\frac{1}{2}$ MS medium with 0,4 mg/l NAA and 1,0 mg/l BAP. Rooting was induced on a half-strength MS medium supplemented with 1% activated charcoal. The regeneration protocol developed in this study provides a basis for germplasm conservation *in vitro* of this rare species.

Fig. 2. Tabl. 1. Bibl. 16.

УДК 582.632.1:57.085.2

Банаев Е.В., Новикова Т.И. Новый декоративный искусственный гибрид *Alnus incana* (L.) Moench. x *A. hirsuta* (Spach) Turcz. ex Rupr. // Сборник научных трудов Никит. ботан. сада. – 2009. – Т. 131. – С. 55-58.

Проведено искусственное скрещивание ольхи серой (*Alnus incana* (L.) Moench.) и ольхи пушистой (*Alnus hirsuta* (Spach) Turcz. ex Rupr.). Гибридные семена высокого качества получены в обоих вариантах скрещивания. Среди жизнеспособных сеянцев *A. incana* x *A. hirsuta* выявлены экземпляры (~5%), имеющие рассеченную листовую пластинку, обладающие декоративными качествами. Оптимальной средой для размножения *in vitro* этих проростков была WPM с 0,5 мг/л БАП. Двухступенчатая акклиматизация способствовала 100% приживаемости регенерантов.

Ил. 2. Табл. 1. Библ. 27.

Банаев Е.В., Новикова Т.И. Новый декоративный штучный гибрид *Alnus incana* (L.) Moench. x *A. hirsuta* (Spach) Turcz. ex Rupr. // Збірник наукових праць Нікіт. ботан. саду. – 2009. – Т. 131. – С. 55-58.

Проведено штучне схрещування вільхи сірої (*Alnus incana* (L.) Moench.) та вільхи пухнатої (*Alnus hirsuta* (Spach) Turcz. ex Rupr.). Гібридне насіння високої якості отримано в обох варіантах схрещування. Серед життєздатних сіянців *A. incana* x *A. hirsute* виявлені екземпляри (~5%), що мають розсічену листову пластину та володіють декоративними якостями. Оптимальним середовищем для розмноження *in vitro* цих проростків було WPM з 0,5 мг/л БАП. Двоступенева акліматизація сприяла 100% приживаності регенерантів.

Ил. 2. Табл. 1. Бібл. 27.

Banaev E.V., Novikova T.I. New ornamental artificial hybrid *Alnus incana* (L.) Moench. x *A. hirsuta* (Spach) Turcz. ex Rupr. // Collected scientific works of Nikit. Botan. Gard. – 2009. – V. 131. – P. 55-58.

Artificial hybridization between *Alnus incana* (L.) Moench.) and *A. hirsuta* (Spach) Turcz. ex Rupr.) in both directions has been carried out. Well developed seeds with high germination rate produced in both directions of crossing have been obtained. 5% of hybrid seedlings obtained from *A. incana* x *A. hirsuta* had deeply dissected leaves, were selected *in vitro* and micropropagated. Highest propagation rate of seed explants was obtained on WPM supplemented with 0,5 mg l⁻¹ BAP. The two-step *ex vitro* acclimatization was successful and provided 100 % survival of plantlets.

Fig. 2. Tabl. 1. Bibl. 27.

УДК 582.734.4:575.17(476.1)

Власова А.Б., Панкратов В.С., Спиридович Е.В., Решетников В.Н. RAPD и ISSR-генотипирование перспективных форм курильского чая (*Potentilla fruticosa* L.) коллекции Центрального ботанического сада НАН Беларуси // Сборник научных трудов Никит. ботан. сада. – 2009. – Т. 131. – С. 59-63.

Проведено исследование генетического сходства сортов и форм местной селекции курильского чая (*Potentilla fruticosa* L.) коллекции ЦБС НАН Беларуси с использованием RAPD и ISSR-маркеров. Показана принципиальная возможность применения RAPD+ISSR-маркирования для оценки гетерогенности генетического материала перспективных форм *P. fruticosa*, выявления дискретности по сравнению с исходными формами, дифференциации и сертификации сортов, дальнейшей селекции исследуемой культуры.

Ил. 1. Табл. 2. Библ. 17.

Власова А.Б., Панкратов В.С., Спірiдовiч Є.В. RAPD та ISSR-генотипування перспективних форм курильського чаю (*Potentilla fruticosa* L.) колекції Центрального ботанічного саду НАН Білорусі // Збірник наукових праць Нікіт. ботан. саду. – 2009. – Т. 131. – С. 59-63.

Проведено дослідження генетичної схожості сортів і форм місцевої селекції курильського чаю (*Potentilla fruticosa* L.) колекції Центрального ботанічного саду НАН Білорусі з використанням RAPD та ISSR-маркерів. Показано принципову можливість застосування RAPD+ISSR-маркування з метою оцінки гетерогенності генетичного матеріалу перспективних форм *P. fruticosa*, виявлення дискретності порівняно з вихідними формами, диференціації та сертифікації сортів, подальшої селекції культури.

Ил. 1. Табл. 2. Библ. 17.

Vlasova N.B., Pankratov V.S., Spiridovich E.V., Reshetnikov V.N. RAPD and ISSR fingerprinting of perspective forms of Shrubby Cinquefoil (*Potentilla fruticosa* L.) in the collection of the Central Botanical Gardens of NAS of Belarus // Collected scientific works of Nikit. Botan. Gard. – 2009. – V. 131. – P. 59-63.

Investigation of genetic similarities of cultivars and forms of local selection of Shrubby Cinquefoil (*Potentilla fruticosa* L.) from the collection of the Central Botanical Gardens of NAS of Belarus on the basis of RAPD and ISSR-markers has been carried out. Possibility of RAPD+ISSR-fingerprinting for estimation of heterogeneity of genetic material of perspective forms of *P. fruticosa*, revealing its discretisation comparably with parental forms, differentiation and certification of cultivars, future breeding have been shown.

Fig. 1. Tabl. 2. Bibl. 17.

УДК 633.81:58.085

Егорова Н.А., Ставцева И.В., Инюткина А.Г., Чуб Л.Н., Лолойко А.А. Культура каллусных тканей и соматональная изменчивость у эфиромасличных растений // Сборник научных трудов Никит. ботан. сада. – 2009. – Т. 131. – С. 63-67.

Изучены особенности каллусо- и морфогенеза у эфиромасличных растений (лаванда, шалфей, кориандр, фенхель, полынь эстрагон, тысячелистник, герань) и выявлены способы, позволяющие повысить регенерационный потенциал каллусных культур у некоторых видов. Установлена значительная вариабельность полученных из каллусных тканей регенерантов по морфологии и хозяйственно ценным признакам и выделены перспективные для селекции образцы.

Ил. 1. Табл. 1. Библ. 12.

Егорова Н.О., Ставцева І.В., Інюткіна А.Г., Чуб Л.М., Лолойко О.А. Культура калусних тканин і соматональна мінливість у ефіроолійних рослин // Збірник наукових праць Нікіт. ботан. саду. – 2009. – Т. 131. – С. 63-67.

Вивчені особливості калусо- і морфогенезу в ефіроолійних рослин (лаванда, шавлія, коріандр, фенхель, полин естрагон, деревій, герань) і виявлені способи, що дозволяють

підвищити регенераційний потенціал калусних культур у деяких видів. Встановлено значне варіювання одержаних з калусних тканин регенерантів за морфологією та господарсько цінними ознаками і виділені перспективні для селекції зразки.

Іл. 1. Табл. 1. Бібл. 12.

Yegorova N.A., Stavtseva I.V., Inyutkina A.G., Chub L.N., Loloiko A.A. Callus culture and somaclonal variability of essential oil plants // Collected scientific works of Nikit. Botan. Gard. – 2009. – V. 131. – P. 63-67.

The peculiarities of callus- and morphogenesis at essential oil plants (sage, lavender, coriander, fennel, tarragon, yarrow, geranium) have been studied. The approaches which allowed to raise regeneration potential for callus cultures of some species have been revealed. It was shown that obtained regenerants from callus culture were characterized by the great variability of morphology and economically valuable properties and perspective samples for breeding were chosen.

Fig. 1. Tabl. 1. Bibl. 12.

УДК 57.086.83

Титова М.В., Шумило Н.А., Куличенко И.Е., Орешников А.В., Носов А.М. Оптимизация выращивания суспензионных культур клеток *Dioscorea deltoidea* Wall и *Polyscias filicifolia* Bailey в полупроточном режиме в биореакторах различного объема // Сборник научных трудов Никит. ботан. сада. – 2009. – Т. 131. – С. 68-73.

Проведена оптимизация длительного аппаратного выращивания суспензионных культур клеток диоскореи дельтовидной (*Dioscorea deltoidea* Wall) и полисциаса папоротниколистного (*Polyscias filicifolia* Bailey) для рентабельного производства биомассы с использованием полупроточного метода и биореакторов разной конструкции и объема: лабораторного барботажного биореактора (объем 20 л), пилотного с механическим перемешиванием (объем 75 л) и полупромышленного барботажного биореактора (объем 630 л).

Показано, что полученные основные ростовые и физиологические характеристики исследуемых суспензионных культур клеток, а также содержание вторичных метаболитов соответствуют таковым при периодическом культивировании в колбах. Общая продуктивность получения биомассы при таком способе выращивания повышается на 10-15% за счет отсутствия лаг-фазы культивирования и сокращения времени на подготовку процесса.

Ил. 4. Табл. 1. Библ. 7.

Титова М.В., Шумило Н.А., Куличенко И.С., Орешников А.В., Носов А.М. Оптимізація вирощування суспензійних культур клітин *Dioscorea deltoidea* Wall та *Polyscias filicifolia* Bailey у напівпроточному режимі в біореакторах різного об'єма // Збірник наукових праць Нікіт. ботан. саду. – 2009. – Т. 131. – С. 68-73.

Проведено оптимізацію тривалого апаратного вирощування суспензійних культур клітин діоскореї дельтовидної (*Dioscorea deltoidea* Wall) та полісциасу папоротелистого (*Polyscias filicifolia* Bailey) для рентабельного виробництва біомаси із використанням напівпроточного методу й біореакторів різної конструкції та об'єма: лабораторного барботажного біореактора (об'єм 20 л), пилотного з механічним перемішуванням (об'єм 75 л) та напівпромислового барботажного біореактора (об'єм 630 л). Показано, що отримані основні ростові й фізіологічні характеристики досліджуваних суспензійних культур клітин, а також вміст вторинних метаболітів відповідають таким при періодичному культивуванні в колбах. Загальна продуктивність одержання біомаси за такого способу вирощування підвищується на 10-15% за рахунок відсутності лаг-фази культування та скорочення часу на підготовку процесу.

Іл. 4. Табл. 1. Бібл. 7.

Titova M.V., Shumilo N.A., Kulichenko I.E., Oreshnikov A.V., Nosov A.M. Semicontinuous cultivation of *Dioscorea deltoidea* Wall and *Polyscias filicifolia* Bailey cell suspension cultures in bioreactors of different types and volumes // Collected scientific works of Nikit. Botan. Gard. – 2009. – V. 131. – P. 68-73.

A number of model experiments for testing the possibility of prolonged apparatus growing of *Polyscias filicifolia* Bailey and *Dioscorea deltoidea* Wall cell suspensions with the use of semicontinuous or «out-flow/up-flow» model of cell cultivation have been done.

Bioreactors of different types and volumes have been used for the experiments: 1) «V-shape» glass bioreactor with air agitation (designed in Department of Cell biology and Biotechnology of IPP RAS); total volume – 20 L, working volume – 15 L; 2) A stirrer-jar fermenter («Electrolux», Sweden) with marine-type impeller; total volume – 75 L, working volume – 50 L; 3) Bioreactor 1T (OKB «PHARMBIOMASH», Yoshkar-Ola, Russia) with air agitation and ring barboter (D = 750 mm); total volume – 630 L, working volume – 550 L.

The obtained data lead to conclusion that under the chosen conditions the scale-up model of *P. filicifolia* and *D. deltoidea* cells semicontinuous cultivation in all mentioned types of bioreactors maintains normal growing parameters of the cell cultures and is fully suited for their cultivation in bioreactors of semiindustrial and industrial volume. The total productivity of obtained biomass is increased on 10-15% because of absence of lag-phase in cultivation and shortening of time for preparation to the process.

Fig. 4. Tabl. 1. Bibl. 7.

УДК 582.675.1:57.085.2

Круглова Н.Н., Круглова А.Е. Размножение борца северного в каллусной культуре *in vitro* на основе феномена эмбриоидогении // Сборник научных трудов Никит. ботан. сада. – 2009. – Т. 131. – С. 73-76.

На примере борца северного *Aconitum lycoctonum* L. показана возможность выделения эмбриоидогении как категории вегетативного размножения растений в культуре *in vitro*. На основе физиологических и гистологических подходов разработан метод экспериментального получения клонов борца северного в каллусной культуре *in vitro* через этап формирования эмбриоида. Метод оценивается как возможность сохранения природных популяций борца северного.

Ил. 2. Библ. 9.

Круглова Н.Н., Круглова А.Е. Розмноження аконіту північного в калусній культурі *in vitro* на основі феномену ембріоїдогенії // Збірник наукових праць Нікіт. ботан. саду. – 2009. – Т. 131. – С. 73-76.

На прикладі аконіту північного *Aconitum lycoctonum* L. показано можливість виділення ембріоїдогенії як категорії вегетативного розмноження рослин в культурі *in vitro*. На основі фізіологічних і гістохімічних підходів розроблено метод експериментального одержання клонів аконіту північного в калусній культурі *in vitro* через етап формування ембріоида. Метод оцінюється як можливість збереження природних популяцій аконіту північного.

Іл. 2. Бібл. 9.

Kruglova N.N., Kruglova A.E. The propagation of aconite in callus culture *in vitro* on the basis of embryoidogeny phenomenon // Collected scientific works of Nikit. Botan. Gard. – 2009. – V. 131. – P. 73-76.

The embryoidogeny as a category of vegetative propagation of flowering plants in culture *in vitro* has been demonstrated at the example of aconite (*Aconitum lycoctonum* L.). The method of experimental obtaining of aconite clone plants in callus culture *in vitro* via the stage of embryoid formation on the basis of physiological and histological researches has been worked out. The method is the possibility to preserve the natural populations of aconite.

Fig. 2. Bibl. 9.

УДК 634.63:57.085.2

Рубос К., Ифолис А., Митрофанова И., Неллас К., Кутинас Н., Рубос А. Особенности формирования и развития сферобластов у маслины европейской (*Olea europaea* L.) // Сборник научных трудов Никит. ботан. сада. – 2009. – Т. 131. – С. 76-81.

Формирование сферобластов было изучено у трех сортов маслины – Chondrolia Chalkidikis, Megaritikí и Koroneikí, произрастающих в Греции в местах Новой Муудании, Халкидики и на горе

Пелион. Установлено, что сорт и место произрастания влияют на количество образовавшихся сферобластов. Среди исследуемых сортов сорт *Chondrolia Chalkidikis* формирует наибольшее количество сферобластов. Наибольшее количество сферобластов образовывалось у всех сортов, растущих на горе Пелион. Между сортами и местом произрастания существует взаимосвязь. Так, сорт *Koroneiki* показал более активное формирование сферобластов в Новой Моудании, чем на горе Пелион. Сорт *Chondrolia Chalkidikis* образовывал такое же количество сферобластов в обоих местах произрастания. В течение семилетнего изучения формирования сферобластов у исследуемых сортов выявлено, что сорт *Chondrolia Chalkidikis* проявлял самую слабую флуктуацию, а сорт *Megaritiki* – самую высокую.

При определенных условиях сферобласты поражает *Pseudomonas savastanoi*. Это происходит до или в процессе развития побегов из меристем. Затем эта бактерия перемещается по флоэме. Пораженные сферобласты превращаются в массу каллусных клеток.

Ил. 9. Библ. 6.

Рубос К., Іфоліс А., Митрофанова І., Неллас К., Кутінас Н., Рубос А. Особливості формування та розвитку сферобластів у маслини європейської (*Olea europaea* L.) // Збірник наукових праць Нікіт. ботан. саду. – 2009. – Т. 131. – С. 76-81.

Формування сферобластів було вивчено в трьох сортів маслини – *Chondrolia Chalkidikis*, *Megaritiki* та *Koroneiki*, що виростають у Греції у Новій Моуданії, Халкідікі та на горі Пеліон. Сорти й місце виростання впливають на кількість утворених сферобластів. Сорт *Chondrolia Chalkidikis* утворює найбільшу кількість сферобластів. Найбільшу кількість сферобластів виявлено у сортів, що виростають на горі Пеліон. Між сортами та місцем зростання існує взаємозв'язок. Сорт *Koroneiki* виявив активне формування сферобластів у Новій Моуданії, ніж на горі Пеліон. Сорт *Chondrolia Chalkidikis* виявив однакову кількість сферобластів в обох місцях зростання. Протягом семирічного вивчення встановлено, що формування сферобластів було різним. Сорт *Chondrolia Chalkidikis* виявив найслабшу флуктуацию, а сорт *Megaritiki* – найвищу.

За певних умов сферобласти уражаються *Pseudomonas savastanoi* до або в процесі розвитку пагонів з меристем, що переміщується флоэмою. Уражені сферобласти перетворюються на масу калусних клітин.

Іл. 9. Бібл. 6.

Roubos K., Ifoulis A., Mitrofanova I., Nellas C., Koutinas N., Rubos A. Peculiarities of sphaeroblast formation and development in *Olea europaea* L. // Collected scientific works of Nikit. Botan. Gard. – 2009. – V. 131. – P. 76-81.

Sphaeroblast formation has been studied in three olive varieties namely – *Chondrolia Chalkidikis*, *Megaritiki* and *Koroneiki* cultivated in the areas of New Moudania, Chalkidiki and mount Pelion in Greece. Variety and location have influenced the number of the sphaeroblasts formed. Among the varieties *Chondrolia Chalkidikis* has shown the highest number of sphaeroblast formation. Higher number of sphaeroblasts has been formed on the varieties cultivated on mount Pelion. Between varieties and location there was interaction. The variety *Koroneiki* has shown higher sphaeroblast formation in New Moudania than on mount Pelion. The variety *Chondrolia Chalkidikis* has shown the highest sphaeroblast formation in both locations. Along the seven years observations were taken the response of the varieties was different. The variety *Chondrolia Chalkidikis* has shown the smallest fluctuation and variety *Megaritiki* the highest.

Under certain conditions sphaeroblasts were contaminated by *Pseudomonas savastanoi* either before or while their shoot meristems were developing to shoots and were emerging through the phloem. Contaminated sphaeroblasts were converted to a callus mass.

Fig. 9. Bibl. 6.

УДК 631.528.632:634.25

Смыков А.В. Экспериментальный мутагенез в селекции персика // Сборник научных трудов Никит. ботан. сада. – 2009. – Т. 131. – С. 81-90.

Изложены результаты действия гамма-радиации, химических мутагенов, физиологически активных веществ и их сочетания на персик. Показано влияние различных доз, сроков обработки мутагенами на выживаемость, частоту и спектр изменчивости персика по морфологическим и

биохимическим признакам. Выделены мутантные формы с хозяйственно-ценными признаками.
Ил. 8. Библ. 6.

Смиков А.В. Экспериментальний мутагенез в селекції персика // Збірник наукових праць Нікіт. ботан. саду. – 2009. – Т. 131. – С. 81-90.

Викладені деякі результати дії гамма-радіації, хімічних мутагенів, фізіологічно активних речовин і їх сполучень на персик. Показано вплив різних доз, строків обробки мутагенами на виживання, частоту і спектр мінливості персика за морфологічними, фізіологічними та біохімічними ознаками. Виделені мутантні форми з господарсько-цінними ознаками.

Ил. 8. Библ. 6.

Smykov A.V. Experimental mutagenesis in peach selection // Collected scientific works of Nikit. Botan. Gard. – 2009. – V. 131. – P. 81-90.

Some results of action of gamma-radiation, chemical mutagens, physiologically active substances and their combinations on peach have been given. The influence of different dozes, periods of processing with mutagens on the survival, frequency and spectrum of peach changeability according to morphological, physiological and biochemical characters have been shown. The mutant forms with economically valuable characters have been selected.

Fig. 8. Bibl. 6.

УДК 634.2:631.526.4:631.527

Еремін Г.В., Еремін В.Г. Использование генофонда рода *Prunus* L. в селекции клоновых подвоев косточковых культур // Сборник научных трудов Никит. ботан. сада. – 2009. – Т. 131. – С. 90-94.

На Крымской опытно-селекционной станции СКЗНИИСиВ из генофонда косточковых растений выделены и использованы в селекции клоновых подвоев доноры селекционно-значимых признаков. Выведены новые клоновые подвои. Выдающуюся устойчивость к морозам показали подвои – ВВА-1, ВСЛ-2, ЛЦ-32, Дружба; к засухе – Кубань 86, Алаб-1, ВСЛ-2, ВСВ-1; к хлорозу – Кубань 86, ВСВ-1; нематодам – Кубань 86, Алаб-1. Они характеризуются хорошей совместимостью с большинством сортов различных косточковых культур, легким вегетативным размножением, а некоторые и слаборослостью (ВВА-1, ВСВ-1, ВСЛ-1).

Табл. 2. Библ. 8.

Єрьомін Г.В., Єрьомін В.Г. Використання генофонду роду *Prunus* L. у селекції клонових підщеп кісточкових культур // Збірник наукових праць Нікіт. ботан. саду. – 2009. – Т. 131. – С. 90-94.

На Кримській дослідно-селекційній станції ПКЗНДІСіВ із генофонду кісточкових рослин виділені та використані в селекції клонових підщеп донори селекційно-значимих ознак. Виведені нові клонові підщепи. Визначну стійкість до морозів показали підщепи – ВВА-1, ВСЛ-2, ЛЦ-32, Дружба; до посухи – Кубань 86, Алаб-1, ВСЛ-2, ВСВ-1; до хлорозу – Кубань 86, ВСВ-1; до нематодів – Кубань 86, Алаб-1. Вони характеризуються доброю сумісністю з більшістю сортів різних кісточкових культур, легким вегетативним розмноженням, а деякі також слаборослістю (ВВА-1, ВСВ-1, ВСЛ-1).

Табл. 2. Библ. 8.

Eremin G.V., Eremin V.G. Use of the genetic diversity of *Prunus* L. in selection of clonal rootstocks of stone fruits // Collected scientific works of Nikit. Botan. Gard. – 2009. – V. 131. – P. 90-94.

At Crimean Experimental and Breeding Station from a genetic diversity of stone fruits plants the donors with commercial important characters has been allocated and used in selection of clonal rootstocks. The new clonal rootstocks have been bred. The good resistance to frost is shown by the following rootstocks: VVA-1, VSL-2, LC-52, Druzhba; to drought tolerant – Kuban 86, Alab-1, VSL-2, VSV-1; to chlorose – Kuban 86, VSV-1; leason nematode – Kuban 86, Alab-1. They are characterized with good compatibility with the majority of varieties of stone crops, easy vegetative propagation and dwarf vigor (VVA-1, VSV-1, VSL-1).

Tabl. 2. Bibl. 8.

УДК 634.1.055:578.864:58.082

Митрофанова О.В., Митрофанова И.В., Чирков С.Н., Ежов В.Н., Лесникова-Седошенко Н.П. Биотехнологические системы диагностики вируса шарки сливы (*Plum pox virus*) и отбора толерантных сортов косточковых плодовых культур // Сборник научных трудов Никит. ботан. сада. – 2009. – Т. 131. – С. 94-103.

На юге Украины проведен мониторинг выявления очагов вируса шарки (*Plum pox virus*) в промышленных и коллекционных насаждениях косточковых плодовых культур. На базе Никитского ботанического сада – Национального научного центра разработаны и усовершенствованы комплексные биотехнологические системы методов диагностики, тестирования и отбора толерантных сортов персика, абрикоса, сливы и алычи к вирусу шарки.

Ил. 3. Табл. 1. Библ. 25.

Митрофанова О.В., Митрофанова І.В., Чирков С.М., Єжов В.М., Леснікова-Седошенко Н.П. Біотехнологічні системи діагностики вірусу шарки сливи (*Plum pox virus*) та добору толерантних сортів кісточкових плодових культур // Збірник наукових праць Нікіт. ботан. саду. – 2009. – Т. 131. – С. 94-103.

На півдні України проведено моніторинг виявлення вогнищ вірусу шарки (*Plum pox virus*) у промислових і колекційних насадженнях кісточкових плодових культур. На базі Нікітського ботанічного саду – Національного наукового центру розроблені та вдосконалені комплексні біотехнологічні системи методів діагностування, тестування й добору толерантних сортів персика, абрикоса, сливи та аличі до вірусу шарки.

Іл. 3. Табл. 1. Бібл. 25.

Mitrofanova O.V., Mitrofanova I.V., Chirkov S.N., Ezhov V.N., Lesnikova-Sedoshenko N.P. Biotechnological systems of Plum pox virus diagnostics and selection of resistant varieties of stone fruit crops // Collected scientific works of Nikit. Botan. Gard. – 2009. – V. 131. – P. 94-103.

Monitoring of Plum pox virus in industrial and collectional plantations of stone fruit crops has been done on the South of the Ukraine. Complex biotechnological systems of diagnostics methods, testing and selection of resistant varieties of peach, apricot, plum and cherry-plum to Plum pox virus have been worked out and improved on the base of Nikitsky Botanical Gardens – National Scientific Centre.

Fig. 3. Tabl. 1. Bibl. 25.

УДК 634.23:632.4:632.938

Кузнецова А.П., Щеглов С.Н. Системный анализ изменчивости при создании методов ускоренной оценки устойчивости форм рода *Cerasus* Mill. к коккомикозу // Сборник научных трудов Никит. ботан. сада. – 2009. – Т. 131. – С. 103-107.

С помощью разработанных в СКЗНИИСиВ методик проведен биохимический анализ листьев у поражаемых и не поражаемых коккомикозом растений. Изучение структуры изменчивости биохимических показателей в процессе вегетации растений позволило найти генетико-статистические подходы к нахождению корреляций с иммунитетом и разработать экспресс-метод оценки устойчивости к коккомикозу. Обнаружена экологическая составляющая изменчивости биохимических признаков, которая позволяет разрабатывать новые методы прогнозирования развития инфекции.

Табл. 3. Библ. 4.

Кузнецова А.П., Щеглов С.Н. Системний аналіз мінливості при створенні методів прискореної оцінки стійкості форм роду *Cerasus* Mill. проти кокомікозу // Збірник наукових праць Нікіт. ботан. саду. – 2009. – Т. 131. – С. 103-107.

За допомогою розроблених у ПКЗНДІСиВ методик проведено біохімічний аналіз листя в уражуваних кокомікозом рослин. Вивчення структури мінливості біохімічних показників у процесі вегетації рослин дозволило знайти генетико-статистичні підходи до виявлення кореляцій з імунністю та розробити експрес-метод оцінки стійкості проти кокомікозу. Виявлено екологічну

складову мінливості біохімічних ознак, що дозволяє розробляти нові методи прогнозування розвитку інфекції.

Табл. 3. Бібл. 4.

Kuznetsova A.P., Stehglov S.N. Systematic variability analysis during creation of express estimation methods for resistant forms of *Cerasus* Mill. to coccomycosis // Collected scientific works of Nikit. Botan. Gard. – 2009. – V. 131. – P. 103-107.

The biochemical analysis of leaves for resistant and unresistant plants to coccomycosis has been done with the help of methods worked out in NCZSRIAW. The structure studying of biochemical indexes variability during plant vegetation allowed to find genetic and statistic approaches to determine the correlations with immunity and to work out the express-method of resistance evaluation to coccomycosis.

Табл. 3. Bibl. 4.

УДК 634.23:631.526.3(477.75)

Лукичева Л.А. Новые районированные и перспективные сорта черешни селекции Никитского ботанического сада // Сборник научных трудов Никит. ботан. сада. – 2009. – Т. 131. – С. 107-112.

Приведена краткая характеристика 11 районированных и 3 перспективных сортов черешни селекции Никитского ботанического сада.

Табл. 1. Библ. 11.

Лукичова Л.О. Нові районовані та перспективні сорти черешні Нікітського ботанічного саду // Збірник наукових праць Нікіт. ботан. саду. – 2009. – Т. 131. – С. 107-112.

Наведено коротку характеристику 11 районованих та 3 перспективних сортів черешні селекції Нікітського ботанічного саду.

Табл. 1. Бібл. 11.

Lukicheva L.A. The new regionalized and perspective sweet cherry varieties bred in Nikitsky Botanical Gardens // Collected scientific works of Nikit. Botan. Gard. – 2009. – V. 131. – P. 107-112.

The brief characteristic of 11 regionalized and 3 perspective sweet cherry varieties from Nikitsky Botanical Gardens have been given.

Табл. 1. Bibl. 11.

УДК 634.23:57.085.2

Корзина Н.В. Микроразмножение перспективных сортов черешни (*Prunus avium* L.) в условиях *in vitro* // Сборник научных трудов Никит. ботан. сада. – 2009. – Т. 131. – С. 112-117.

Выявлен морфогенетический потенциал органов и тканей черешни с разными сроками созревания плодов. Определены оптимальные концентрации регуляторов роста в питательной среде, активизирующие процесс побегообразования и ризогенеза микропобегов в условиях *in vitro*.

Ил. 5. Библ. 20.

Корзіна Н.В. Мікророзмноження перспективних сортів черешні (*Prunus avium* L.) в умовах *in vitro* // Збірник наукових праць Нікіт. ботан. саду. – 2009. – Т. 131. – С. 112-117.

У статті подано результати дослідження органів та тканин черешні, вільних від патогенів, вивчено їх морфогенетичний потенціал. Показано вплив регуляторів росту в живильному середовищі на процеси погноутворення та ризогенезу і отримання регенерантів в умовах *in vitro*.

Іл. 5. Бібл. 20.

Korzina N.V. Micropropagation of perspective sweet cherry (*Prunus avium* L.) varieties in conditions *in vitro* // Collected scientific works of Nikit. Botan. Gard. – 2009. – V. 131. – P. 112-117.

The researches results of sweet cherry organs and tissues, free from pathogens have been given in

this article. Their morphological potential has been studied. The influence of growth regulators in culture medium on the processes of shoot formation and rizogenesis and obtaining of regenerators in conditions *in vitro* has been shown.

Fig. 5. Bibl. 20.

УДК 634.14:631.527+631.529(477.41/.42)

Клименко С.В. Айва обыкновенная (*Cydonia oblonga* Mill.) в лесостепи Украины: итоги интродукции и селекции // Сборник научных трудов Никит. ботан. сада. – 2009. – Т. 131. – С. 117-122.

Подведены итоги 50-летних исследований по интродукции и селекции айвы обыкновенной (*Cydonia oblonga* Mill.) в Национальном ботаническом саду им. Н.Н. Гришко (НБС) в Киеве, где создан генофонд сортов и форм с большим биологическим и помологическим разнообразием свойств. Обобщены данные о биоэкологических особенностях, обоснованы концептуальные положения о расширении ареала айвы и ее культуре в лесостепи Украины. Пять сортов селекции НБС внесены в Реестр сортов растений Украины. Насаждения ежегодно обильно плодоносят, зимо- и морозостойки.

Табл. 1. Библ. 28.

Клименко С.В. Айва звичайна (*Cydonia oblonga* Mill.) в лісостепу України: підсумки інтродукції і селекції // Збірник наукових праць Никит. ботан. саду. – 2009. – Т. 131. – С. 117-122.

Підбито підсумки 50-річних досліджень з інтродукції і селекції айви звичайної (*Cydonia oblonga* Mill.) в Національному ботанічному саду ім. М.М. Гришка (НБС) в Києві, де створено генофонд сортів і форм з великим біологічним і помологічним різноманіттям властивостей. Узагальнено дані щодо біоекологічних властивостей, обґрунтовано концептуальні положення про розширення ареалу айви та її культуру в лісостепу України. П'ять сортів айви селекції НБС внесено до Реєстру сортів рослин України. Насадження щорічно рясно родять, зимо- і морозостійкі.

Табл. 1. Бібл. 28.

Klymenko S.V. Quince (*Cydonia oblonga* Mill.) in the forest-steppe of Ukraine: results of introduction and breeding // Collected scientific works of Nikit. Botan. Gard. – 2009. – V. 131. – P. 117-122.

The results of the 50-years researches on introduction and breeding of quince (*Cydonia oblonga* Mill.) have been summed up in the National Botanical Gardens named after Gryshko (NBG) in Kyiv where the genefund of the varieties and forms with wide biological and pomological diversity has been collected. The data about bioecological peculiarities have been summarized. The basis concept of widening of the quince areal and its cultivation in the Forest-Steppe of Ukraine have been substantiated. Five quince varieties of the NBG's selection have been included into Register of plants cultivars of Ukraine. They are very productive, frost and winter resistant.

Tabl. 1. Bibl. 28.

УДК 634.13:631.526.3:632.4

Баскакова В.Л. Перспективный исходный материал и характер наследования в селекции груши на устойчивость к парше // Сборник научных трудов Никит. ботан. сада. – 2009. – Т. 131. – С. 122-126.

Дана оценка устойчивости к парше 340 сортов и форм груши в условиях степного Крыма. Для использования в селекции представляют интерес сорта с высокой устойчивостью, урожайные, с плодами высокого качества. Приведены результаты анализа гибридных семей. Выделены сорта, наилучшим образом передающие по наследству свойство повышенной устойчивости к парше.

Табл. 1. Библ. 10.

Баскакова В.Л. Перспективний вихідний матеріал та характер успадкування в селекції груші на стійкість проти парші // Збірник наукових праць Никит. ботан. саду. – 2009. – Т. 131. – С. 122-126.

Надана оцінка стійкості проти парші 340 сортів та форм груші в умовах степового Криму. Для використання у селекції становлять інтерес сорти з високою стійкістю, врожайні, з плодами високої якості. Наведені результати аналізу гібридних родин. Виділені сорти, які найкраще передають у спадок властивість високої стійкості проти парші.

Табл. 1. Бібл. 10.

Baskakova V.L Perspective initial material and character of inheritance in pear breeding on scab resistance // Collected scientific works of Nikit. Botan. Gard. – 2009. – V. 131. – P. 122-126.

Scab resistance evaluation of 340 pear varieties and forms in Steppe Crimea conditions has been given. Varieties with high resistance to scab, high yield capacity, high quality fruits are interesting for breeding. The analysis results of hybrid families have been given. Varieties, given their high scab resistance to the inheritance have been selected.

Tabl. 1. Bibl. 10.

УДК 634.13:57.085.2

Корнова К. Влияние минерального состава питательной среды и типа ауксина на укоренение *in vitro* при микроразмножении груши // Сборник научных трудов Никит. ботан. сада. – 2009. – Т. 131. – С. 126-130.

Применяемый *in vitro* метод активизирует производство безвирусного укорененного посадочного материала. Опыты проводились с микроразмножением растений груши сорта Packham's Triumph. Главной целью изучения было установить оптимальные условия для успешного укоренения во время технологического процесса. Был выявлен эффект двух факторов: первый – минеральный состав питательной среды – $\frac{1}{4}$ макроэлементов в питательной среде MS и её модификациях; второй – ауксина ИМК и ИУК в концентрации 0,5-1,5 мг/л. Сообщается о проценте укоренения среднего количества и длине образованных корешков и жизнеспособности микрорастений. Было установлено, что присутствие ИМК особенно в концентрации 1,5 мг/л приводит к лучшему укоренению микрорастений, однако это сопровождается индукцией каллуса в базальной части побега. Минеральный состав питательной среды, присутствие ИУК индуцирует высокий процент корнеобразования (90-100%) с очень хорошими характеристиками в отношении среднего количества корней и их длины.

Ил. 3. Табл. 1. Библ. 11.

Корнова К. Вплив мінерального складу поживного середовища й типу ауксину на укорінення *in vitro* при мікророзмноженні груші // Збірник наукових праць Нікіт. ботан. саду. – 2009. – Т. 131. – С. 126-130.

Застосовуваний *in vitro* метод активізує виробництво безвірусного укоріненого садивного матеріалу. Досліди проводилися з мікророзмноженням груші сорту Packham's Triumph. Головною метою вивчення було встановлення оптимальних умов для успішного укорінення під час технологічного процесу. Виявлено ефект двох чинників: мінерального складу поживного середовища ($\frac{1}{4}$ макроелементів у поживному середовищі MS та його модифікаціях) та ауксинів ИМК і ИУК (у концентрації 0,5-1,5 мг/л). Повідомляється про відсоток укорінення середньої кількості та довжину корінців, що утворилися, та життєздатності мікророслин. Виявлено, що присутність ИМК, особливо у концентрації 1,5 мг/л, призводить до кращого укорінення мікророслин, проте це супроводжується індукцією калуса у базальній частині пагона. Мінеральний склад поживного середовища, присутність ИУК індукують високий відсоток коренеутворення (90-100%) з дуже добрими характеристиками з огляду на середню кількість коренів та їхню довжину.

Іл. 3. Табл. 1. Бібл. 11.

Kornova K. The effect of the mineral content of culture medium and the type of auxin on *in vitro* rooting of micropropagated pear plants // Collected scientific works of Nikit. Botan. Gard. – 2009. – V. 131. – P. 126-130.

Applying the *in vitro* method provided the impetus for accelerated production of authentic virus-free own-rooted planting material. The experiment was carried out with micropropagated plants of the pear cultivar Packham's Triumph. The major aim of the study was to establish the optimal conditions

for successful rooting at the stage of the technological process. The effect of the two factors was followed: firstly, the mineral content of the nutrient medium – $\frac{1}{4}$ macroelements in the nutrient medium MS and its modification; secondly, the participation of IBA and IAA auxins at concentrations 0,5-1,5 mg/l. The percentage of rooting, the mean number and length of the roots formed and the vital status of the microplants were reported. It was established that the presence of IBA, especially at the concentration of 1,5 mg/l, contributed to the better rooting of the microplants, however, it was accompanied by callus induction at the basal part of the stem. Whatever the mineral content of the nutrient medium, the presence of IAA induced a high percentage of rooting (90-100%), with very good characteristics concerning the mean number of roots and their length.

Fig. 3. Tabl. 1. Bibl. 11.

УДК: 634:8:631.524.6/527.3.

Левченко С.В., Волинкин В.А., Виноградов Б.А., Толкачева Н.В. Хемоселекция винограда на наличие аромата // Сборник научных трудов Никит. ботан. сада. – 2009. – Т. 131. – С. 130-134.

Методом газовой хроматографии были проанализированы суэла из урожая сортов винограда Цитронный Магарача и Спартанец Магарача, и 2 сеянцев, полученных от скрещивания этих сортов: М. № 223-96-16-1 и М. № 223-96-16-14. В эфирном масле проанализированных образцов было идентифицировано более 50 веществ, среди которых наиболее широко были представлены терпеновые соединения: линалоол и его оксиды, гераниол, лимонен, α -терпинеол, 3,7-диметил-1,5-октадиен-3,7-диол и его изомер 3,7-диметил-1,7-октадиен-3,6-диол. Также идентифицированы фенилэтиловый спирт, ненасыщенные спирты (изомерные гексенолы) и альдегиды. Метод кластерного анализа показал, что исследуемые гибридные формы по своим ароматобразующим показателям ближе к родительской форме сорту Цитронному Магарача, чем к Спартанцу Магарача.

Ил. 1. Табл. 1. Библ. 5.

Левченко С.В., Волинкин В.О., Виноградов Б.А., Толкачева Н. В. Хемоселекция винограду на наявність аромату // Збірник наукових праць Нікіт. ботан. саду. – 2009. – Т. 131. – С. 130-134.

Методом газової хроматографії проаналізовано суэло з урожаю сортів винограду Цитронний Магарачу і Спартанець Магарачу, а також 2 сіянця, отримані від схрещування цих сортів: М. № 223-96-16-1 і М. № 223-96-16-14. В ефірній олії проаналізованих зразків було ідентифіковано понад 50 речовин, серед яких найбільш широко були представлені терпенові сполуки: ліналоол і його оксиди, гераніол, лімонен, α -терпінєол, 3,7-диметил-1,5-октадієн-3,7-діол і його ізомер 3,7-диметил-1,7-октадієн-3,6-діол. Також ідентифіковані фенілетиловий спирт, ненасичені спирти (ізомерні гексеноли) і альдегіди. Метод кластерного аналізу показав, що дослідні гібридні форми за своїми ароматоутворюючими показниками ближчі до батьківської форми сорту Цитронний Магарачу, ніж до Спартанця Магарачу.

Ил. 1. Табл. 1. Библ. 5.

Levchenko S.V., Volynkin V.A., Vinogradov B.A., Tolkachyeva N.V. Grape chemobreeding for aroma // Collected scientific works of Nikit. Botan. Gard. – 2009. – V. 131. – P. 130-134.

Musts from varieties Tsitronny Magaracha, Spartanets Magaracha and two seedlings obtained by their crossing to each other M. № 223-96-16-1 and M. № 223-96-16-14 have been examined by gas chromatography. Essential oils of the studied musts have more than 50 substances of which terpenes are the major components: linalool and its oxides, geraniol, limonene, α -terpineol, 3,7-dimeyethyl-1,5-octadiene-3,7-diol and its isomer 3,7-dimeyethyl-1,7-octadiene-3,6-diol. Phenylethyl alcohol, unsaturated alcohols (isomeric hexenols) and aldehydes were also identified. The cluster analysis revealed that the studed hybrid forms were closer to the parent Tsitronnyi Magaracha than to Spartanets Magaracha according to their aroma-forming characteristics.

Fig. 1. Tabl. 1. Bibl. 5.

УДК 633.854.78:631.527:632.938

Кайя Я., Эвчи Г., Пекан В., Гюсер Т., Илмаз М.И.. Селекция подсолнечника (*Helianthus annuus* L.) на устойчивость к имидазолину // Сборник научных трудов Никит. ботан. сада. – 2009. – Т. 131. – С. 134-138.

Подсолнечник является важной масляничной культурой как для Турции, так и для других стран Черноморского бассейна. Исследования по изучению устойчивости подсолнечника к имидазолину были начаты в 2003 г. и первые устойчивые линии и гибриды были уже получены в 2008 г. Их высаживали в зимний и летний период. Отбор проводился на основе фитотоксического наблюдения в процессе применения двойной дозы имидазолина. В каждой генерации среди устойчивых растений были отобраны лучшие, имеющие и другие желаемые характеристики. В 2007 г. были протестированы 46 гибридных и 64 гибридных женских линий, находящихся на различных уровнях селекции и были отобраны 41 женская линия и 4 мужских линий, как перспективно устойчивые. В 2008 г. 96 мужских и 83 женских линий были протестированы. Из них 94 мужских и 63 женских линий были признаны устойчивыми и отобраны для селекции в следующих поколениях.

Ил. 2. Табл. 4. Библ. 7.

Кайя Я., Євчі Г., Пекан В., Гюсер Т., Ілмаз М.І. Селекція соняшника (*Helianthus annuus* L.) на стійкість до імідазоліну // Збірник наукових праць Нікіт. ботан. саду. – 2009. – Т. 131. – С. 134-138.

Соняшник є найважливою олійною культурою як для Туреччини, так і для інших країн Чорноморського басейну. Дослідження стійкості соняшника до імідазоліну було розпочато у 2003 р., та вперше стійкі лінії та гібриди отримані у 2008 р. із висадженням узимку й улітку. Добір проводився на основі спостереження фітотоксичності у процесі застосування подвійної дози імідазоліну. У кожній генерації серед стійких рослин були відібрані кращі, які володіли також іншими бажаними характеристиками. У 2007 р. були протестовані 46 гібридних чоловічих і 64 гібридних жіночих ліній, що перебували на різних селекційних рівнях, та визначені 41 жіноча й 4 чоловічих ліній як перспективно стійкі. У 2008 р. 96 чоловічих і 83 жіночих ліній були протестовані; з них 94 чоловічих і 63 жіночих ліній були визнані стійкими та відібрані для селекції в наступних поколіннях.

Іл. 2. Табл. 4. Бібл. 7.

Kaya Y., Evci G., Pekcan V., Gucer T., Yilmaz M.I. The resistant breeding to imidazolinone herbicide group in sunflower (*Helianthus annuus* L.) // Collected scientific works of Nikit. Botan. Gard. – 2009. – V. 131. – P. 134-138.

Sunflower is the main oil crop both for Turkey and other Black Sea countries. The IMI herbicide resistance research in sunflower was started in 2003 and first resistant lines and hybrids were developed in 2008 with planting in winter and in summer seasons. Selection was performed based on phytotoxicity observations applied double dose IMI herbicide. From these resistant ones, the best plants which had other desired characteristics were selected each generation. In 2007, 46 inbred restorer line and 64 inbred female lines rows in different breeding levels were tested and 41 female and 4 restorer lines were resistant respectively. In 2008, 96 restorer and 83 female lines were tested. From these material, 94 restorer and 63 female lines were founded resistant and resistant ones selected for next generations.

Fig. 2. Tabl. 4. Bibl. 7.

УДК 633.1:631.527

Лавриненко Ю.А. Эколого-генетическая изменчивость географически отдаленного исходного материала зерновых культур // Сборник научных трудов Никит. ботан. сада. – 2009. – Т. 131. – С. 138-144.

Афганистан, как первичный генетический центр, характеризуется достаточно большим разнообразием эндемичных форм, однако селекционно-ценные образцы среди них занимают незначительное количество. Доноры и носители отдельных хозяйственных и адаптивных признаков более распространены во вторичных центрах, которые формируются в зонах деятельности селекционно-семеноводческих учреждений.

Табл. 2. Библ. 12.

Лавриненко Ю.О. Еколого-генетична мінливість географічно віддаленого вихідного матеріалу

зерновых культур // Збірник наукових праць Нікіт. ботан. саду. – 2009. – Т. 131. – С. 138-144.

Афганістан, як первинний генетичний центр, характеризується достатньо великим різноманіттям ендемічних форм, але селекційно-цінні зразки серед них займають незначну кількість. Донори та носії окремих господарських та адаптивних ознак більш поширені у вторинних центрах, які формуються в зонах діяльності селекційно-насіницьких установ.

Табл. 2. Бібл. 12.

Lavrinenko Yu. Ecological and genetic variability of geographically distant material of corn cultures // Collected scientific works of Nikit. Botan. Gard. – 2009. – V. 131. – P. 138-144.

Afghanistan, as a primary genetic center is characterized by strong diversity of endemic forms, however, elite samples are rare among them. Donors and recombinants which characterized by economic and adaptive advantages are spread in secondary centers, which forms in the regions of selective and seed breeding establishments.

Tabl. 2. Bibl. 12.

УДК 633.11:631.527.5

Хайленко Н.А. Биотехнологические подходы в получении межвидовых гибридов с мягкой пшеницей // Сборник научных трудов Никит. ботан. сада. – 2009. – Т. 131. – С. 144-148.

Опыты по искусственному выращиванию зародышей пшеницы и ее межвидовых гибридов на питательных средах с помощью метода эмбриокультуры были проведены в 2004-2008 гг. Незрелые 15-суточные зародыши были извлечены и введены на питательные среды *in vitro*, в результате были получены регенеранты от межвидовых скрещиваний пшеницы. Все регенеранты в F₁ и F₂ показали хорошую способность к формированию зерен – от 38,2 до 55,8%. Высока вероятность эпигенетического контроля признаков фертильности-стерильности у гибридных растений.

Ил. 3. Табл. 1. Библ. 3.

Хайленко Н.О. Біотехнологічні підходи для отримання міжвидових гібридів з м'якою пшеницею // Збірник наукових праць Нікіт. ботан. саду. – 2009. – Т. 131. – С. 144-148.

Досліди зі штучного вирощування зародків пшениці та її міжвидових гібридів на поживних середовищах за допомогою методу ембріокультури були проведені у 2004-2008 рр. Незрілі 15-добові зародки були видобуті та експлантовані на поживні середовища *in vitro*, внаслідок чого були отримані регенеранти від міжвидових схрещувань пшениці. Усі регенеранти в F₁ та F₂ показали добру зав'язуваність зерен – від 38,2 до 55,8%. Високою є імовірність енергетичного контролювання ознак фертильності-стерильності в гібридних рослин.

Іл. 3. Табл. 1. Бібл. 3.

Khailenko N.A. Biotechnological methods of obtaining of soft wheat interspecific hybrids // Collected scientific works of Nikit. Botan. Gard. – 2009. – V. 131. – P. 144-148.

Experiences on artificial cultivation of wheat embryos and its interspecies hybrids on culture mediums by embryoculture method were done in 2004-2008. Young 15-daily embryos have been taken and put on culture mediums *in vitro*; regenerants from wheat interspecific crossings have been obtained. All regenerants in F₁ and F₂ have shown good setting of grains – from 38,2 to 55,8 %. The probability of epigenetical control of fertility-sterility signs at hybrid plants is high.

Fig. 3. Tabl. 1. Bibl. 3.

УДК 633.11:632.938:58.085

Яруллина Л.Г., Трошина Н.Б., Сурина О.Б., Максимов И.В. Применение совместного культивирования каллусных культур пшеницы (*Triticum aestivum* L.) с патогенными грибами в исследовании механизмов фитоиммунитета // Сборник научных трудов Никит. ботан. сада. – 2009. – Т. 131. – С. 148-152.

В каллусах пшеницы изучено влияние салициловой кислоты, хитоолигосахаридов, «Бисола 2» и «Байтана» на устойчивость клеток к возбудителю твердой головни, обусловленное генерацией H₂O₂. Показано, что в контроле генерация перекиси водорода была свойственна только клеткам ризоидов. При инфицировании в зоне проникновения гриба появлялись

паренхимоподібні клітки, генерируючі H_2O_2 . Під впливом індукторів устойчивості число таких кліток зростало, що було обумовлено індукцією активності оксалатоксидази в цитоплазматическій і особливо в іонно-связанній з кліточною стінкою фракції.

Ил. 2. Табл.1. Библ.13.

Ярулліна Л.П., Трошина Н.О., Суріна О.Б., Максимов І.О. Застосування спільного культивування калусних культур пшениці (*Triticum aestivum* L.) з патогенними грибами у дослідженні механізмів фітоімунітету // Збірник наукових праць Никіт. ботан. саду. – 2009. – Т. 131. – С. 148-152.

У калусах пшениці вивчено вплив саліцилової кислоти, хітоолігосахаридів, «Бісола 2» і «Байтана» на стійкість клітин проти збудника зони пшениці, зумовлений генерацією H_2O_2 . Показано, що у контролі генерація перекису водню була властива лише клітинам ризоїдів. При інфікуванні у зоні проникнення грибу з'являлися паренхимоподібні клітини, що генерували H_2O_2 . Під впливом індукторів стійкості кількість таких клітин збільшувалася, що зумовлювалося індукцією активності оксалатоксидази у цитоплазматичній та особливо в іонно-зв'язаній з клітинною стінкою фракції.

Ил. 2. Табл. 1. Библ. 13.

Yarullina L.G., Troshina N.B., Surina O.B., Maksimov I.V. Using of co-cultures of wheat (*Triticum aestivum* L.) cells with pathogenic fungi in the study of phytoimmunity mechanisms // Collected scientific works of Nikit. Botan. Gard. – 2009. – V. 131. – P. 148-152.

The influence of salicylic acid, chitoooligosaccharides, «Bisol 2» and «Baitan» in wheat calluses on the resistance of cells to bunt pathogen and hydrogen peroxide generation with participation of oxalateoxidase has been studied. In control wheat calluses the hydrogen peroxide has been generated only in zone of rhizoid cells (DAB-cells). The infection did not cause a significant increase of the number of such cells however in the zone of fungus penetration parenchyma-like DAB-cells have been observed. Generation of hydrogen peroxide in infection site has been accompanied with increasing activity of cytoplasm fraction oxalateoxidase and suppression in cell wall ion-bounded fraction.

Fig. 2. Tabl. 1. Bibl. 13.

УДК 633.1:58.085

Терлецкая Н.В. Повреждающее действие абиотических стрессов на растительные клетки зерновых злаков // Сборник научных трудов Никит. ботан. сада. – 2009. – Т. 131. – С. 152-156.

В сравнительном аспекте рассматривается действие абиотических стрессов (засуха, засоление) на цитологические изменения растительных клеток зерновых злаков (пшеница, ячмень) *in vivo* и *in vitro*. Показана общность цитологических механизмов реагирования растительных клеток на действие абиотических стрессов.

Ил. 3. Библ. 14.

Терлецька Н.В. Ушкоджувальна дія абіотичних стресів на рослинні клітини зернових злаків // Збірник наукових праць Никіт. ботан. саду. – 2009. – Т. 131. – С. 152-156.

У порівняльному аспекті розглядається дія абіотичних стресів (посуха, засолення) на цитологічні зміни рослинних клітин зернових злаків (пшениця, ячмінь) *in vivo* та *in vitro*. Показано спільність цитологічних механізмів реагування рослинних клітин на дію абіотичних стресів.

Ил. 3. Библ. 14.

Terletskaaya N.V. Damaging action of abiotic stresses on plant cells of grain cereals // Collected scientific works of Nikit. Botan. Gard. – 2009. – V. 131. – P. 152-156.

In comparative aspect the action of abiotic stresses (drought, salt) on plant cells of grain cereals (wheat, barley) cytologic changes *in vivo* and *in vitro* has been considered. The generality of cytologic mechanisms of reaction of plant cells on action of abiotic stresses has been shown.

Fig. 3. Bibl. 14.

УДК 633.11:57.085.2:632.938

Дениско Т.В., Игнатова С.А., Бабаянц О.В. Разработка условий *in vitro* для прогнозирования толерантности мягкой пшеницы к грибам разных видов рода *Alternaria* Nees. // Сборник научных трудов Никит. ботан. сада. – 2009. – Т. 131. – С. 156-160.

Разработаны условия для построения тест-системы *in vitro* для первичного скрининга изолятов грибов рода *Alternaria* на токсигенность и отбора толерантных к альтернариозу форм озимой мягкой пшеницы. Для дальнейших исследований были отобраны наиболее токсигенные изоляты.

Ил. 5. Библ. 7.

Дениско Т.В., Игнатова С.О., Бабаянц О.В. Розробка умов *in vitro* для прогнозування толерантності м'якої пшениці до грибів різних видів роду *Alternaria* Nees. // Збірник наукових праць Нікіт. ботан. саду. – 2009. – Т. 131. – С. 156-160.

Було розроблено умови для побудови тест-системи *in vitro* для первинного скринінгу ізолятів грибів роду *Alternaria* на токсигенність та добору толерантних до альтернаріозу форм озимої м'якої пшениці. Було відібрано для подальших досліджень найбільш токсигенні ізоляти.

Ил. 5. Библ. 7.

Denisko T.V., Ignatova S.A., Babayants O.V. Elaboration of conditions *in vitro* for forecasting of soft wheat tolerance to the fungi of different species of the genus *Alternaria* Nees. // Collected scientific works of Nikit. Botan. Gard. – 2009. – V. 131. – P. 156-160.

Conditions for test system *in vitro* construction for preliminary screening of the fungi isolates of the genus *Alternaria* on toxigenicity and selection of tolerant to *Alternaria* disease forms of winter soft wheat has been developed. For the further researches the most toxigenic isolates has been selected.

Fig. 5. Bibl. 7.

УДК 633.11:632.938

Максимов И.В., Сурина О.Б., Трошина Н.Б. Оценка устойчивости растений пшеницы к фитопатогенам с использованием совместных культур // Сборник научных трудов Никит. ботан. сада. – 2009. – Т. 131. – С. 160-167.

Разработан способ выращивания возбудителей головневых, а так же септориоза совместно с каллусными культурами пшеницы. Обнаружено подавление под влиянием индукторов устойчивости роста головневых на каллусах и гриба *S. nodorum* на отрезках листьев. Получены данные об индукции активности защитных белков в тканях растений и каллусах. Разработан способ определения степени агрессивности штаммов возбудителя септориоза с использованием культур листьев пшеницы.

Ил. 4. Табл. 1. Библ. 18.

Максимов И.В., Сурина О.Б., Трошина Н.Б. Оцінка стійкості рослин пшениці проти фітопатогенів з використанням спільних культур // Збірник наукових праць Нікіт. ботан. саду. – 2009. – Т. 131. – С. 160-167.

Розроблено спосіб вирощування збудників сажкових, а також септоріозу спільно з каллусними культурами пшениці. Виявлено пригнічення під впливом індукторів стійкості росту сажкових на калусах та грибу *S. nodorum* на відтинках листків. Отримано дані про індукцію активності захисних білків у тканинах рослин і калусах. На відтинках листків розроблено спосіб визначення ступеня агресивності штамів збудника септоріозу.

Ил. 4. Табл. 1. Библ. 18.

Maksimov I.V., Surina O.B., Troshina N.B. Resistant evaluation of wheat to phytopatogenes using co-cultures // Collected scientific works of Nikit. Botan. Gard. – 2009. – V. 131. – P. 160-167.

The method of cultivating of bunt, smut and leaf blotch agents on wheat calluses and leaves has been worked out. The suppression under influence of resistant growth inductors of bunt and smut on wheat calluses and the *S. nodorum* on wheat leaf bits has been discovered. The results of inductions of the protective proteins activities in plant tissues and calluses have been obtained. The method of determination of aggressiveness level to leaf blotch agent isolate on wheat leaf bits has been worked out.

Fig. 4. Tabl. 1. Bibl. 18.

УДК 633.16:579.254.2

Танасиенко И.В., Емец А.И., Блюм Я.Б. Разработка метода эффективной трансформации ячменя (*Hordeum vulgare* L.) с помощью *Agrobacterium tumefaciens* // Сборник научных трудов Никит. ботан. сада. – 2009. – Т. 131. – С. 167-171.

Для усовершенствования протокола агробактериальной трансформации нами было протестировано влияние дополнительных физических параметров, таких как: вакуум инфильтрация (20 мин), ультразвук (1-3 с), последовательная обработка ультразвуком и вакуумом. Для подтверждения факта перемещения плазмидной ДНК в клетки-мишени проводили GUS-тест на транзистентную экспрессию гена β -глюкуронидазы в клетках эксплантов. Воздействие ультразвука приводило к увеличению эффективности трансформации в 1,35 раза, вакуума – почти в два раза. Последовательная обработка ультразвуком и вакуум инфильтрацией приводила к увеличению эффективности трансформации в 2,6 раза.

Ил. 2. Библ. 17.

Танасієнко І.В., Ємець А.І., Блюм Я.Б. Розробка методу ефективної трансформації ячменю (*Hordeum vulgare* L.) за допомогою *Agrobacterium tumefaciens* // Збірник наукових праць Нікіт. ботан. саду. – 2009. – Т. 131. – С. 167-171.

Для вдосконалення протоколу агробактеріальної трансформації нами був вивчений вплив додаткових фізичних параметрів, таких як: вакуум інфільтрація (20 хв), ультразвук (1-3 с), послідовна обробка ультразвуком та вакуумом. Для підтвердження факту переміщення плазмідної ДНК у клітини-мішені проводили GUS-тест на транзистентну експресію гену β -глюкоронідази в клітинах експлантів. Вплив ультразвуку призводив до збільшення ефективності трансформації в 1,35 раза, вакууму – майже у 2 рази. Послідовна обробка ультразвуком та вакуум-інфільтрацією приводила до збільшення ефективності трансформації в 2,6 раза.

Лл. 2. Бібл. 17.

Tanasienko I.V., Yemets A.I., Blume Ya.B. Advanced method of the effective barley (*Hordeum vulgare* L.) transformation using *Agrobacterium tumefaciens* // Collected scientific works of Nikit. Botan. Gard. – 2009. – V. 131. – P. 167-171.

The present study resulted in the development of an efficient protocol for *Agrobacterium*-mediated transformation used additional parameters such as vacuum infiltration (20 min), sonication (1-3 s') and both vacuum infiltration and sonication. To assess confirm the transfer of plasmid DNA to target cells histochemical assay have been used (Jefferson, 1987). It was found that application of vacuum infiltration led to 2,6 fold increase in transformation efficiency, application of sonication led to almost 2 fold increase in transformation efficiency. Using both sonication and vacuum infiltration at the same time led to 2,6 fold increase in transformation efficiency of *Agrobacterium*-mediated transformation.

Fig. 2. Bibl. 17.

УДК 582.736.3:575.16:577.152.1

Дьяченко Л.Ф., Тоцкий В.Н., Сичкарь В.И., Топтиков В.А. Экспрессивность множественных форм пероксидазы в онтогенезе сои // Сборник научных трудов Никит. ботан. сада. – 2009. – Т. 131. – С. 171-176.

Изучали электрофоретические спектры пероксидазы листьев 20 скороспелых сортов сои на трех стадиях онтогенеза растений. В начале цветения растений обнаруживается 15 изоформ, на стадии первого тройчатого листа – 16, в начале созревания бобов – 18. В процессе онтогенеза растений происходит не только появление/исчезновение отдельных изоформ фермента, но и динамические изменения экспрессивности большинства изоформ пероксидазы.

Ил. 1. Табл. 2. Библ. 8.

Дьяченко Л.Ф., Тоцький В.М., Січкарь В.І., Топтіков В.А. Експресивність множинних форм пероксидази в онтогенезі сої // Збірник наукових праць Нікіт. ботан. саду. – 2009. – Т. 131. – С. 171-176.

Вивчали спектри пероксидази листків 20 скоростиглих сортів сої на трьох стадіях онтогенезу рослин. На початку цвітіння рослин спектр складається з 15 ізоформ, на стадії

першого справжнього листка – з 16, на початку дозрівання бобів – з 18. У процесі онтогенезу рослин відбувається не тільки поява/зникнення окремих ізоформ ферменту, але й динамічні зміни експресивності більшості форм пероксидази.

Іл. 1. Табл. 2. Бібл. 8.

Diyachenko L.F., Totsky V.M., Sichkar V.S., Toptikov V.A. Multiply peroxidase forms expression during soybean ontogenesis // Collected scientific works of Nikit. Botan. Gard. – 2009. – V. 131. – P. 171-176.

The electrophoretical peroxidase spectrum in leaves of 20 early soybean varieties at three ontogenesis stages have been studied. Peroxidase spectrum have had 15 forms during flowering of the plants, during stage «the first trifoliolate leaf» – 16, and at the beginning of bean maturity – 18. At the process of soybean ontogenesis there was no appearance/disappearance of separate enzyme forms, but there were dynamic changes of the majority peroxidase forms.

Fig. 1. Tabl. 2. Bibl. 8.

УДК 575:577

Злацкая А.В., Шитикова Ю.В., Король Л.В. Изучение внутривидового и межвидового консерватизма локусов микросателлитов (SSR) // Сборник научных трудов Никит. ботан. сада. – 2009. – Т. 131. – С. 176-181.

Результаты исследования межсортового и межвидового полиморфизма в пределах семейства *Triticeae* с использованием микросателлитных SSR-маркеров показали, что наиболее дивергентными оказались субгеномы В в межсортовом и В-G в межвидовом сравнении, а наименее в обоих случаях – субгеномы (геном) D. Субгеном А и пара А-А^b занимала промежуточное положение в сравнении с субгеномами, рассмотренными выше. Анализ полиморфизма некоторых SSR пшеницы в геноме генетически отдаленного вида *Beta vulgaris* выявил ряд консервативных локусов. Некоторые SSR-маркеры пшеницы оказались пригодными для использования в анализе полиморфизма гибридов и линий этой культуры.

Ил. 1. Табл. 1. Библ. 13.

Злацька А.В., Шитікова Ю.В., Король Л.В. Вивчення внутрішньовидового і міжвидового консерватизму локусів микросателітів SSR // Збірник наукових праць Нікіт. ботан. саду. – 2009. – Т. 131. – С. 176-181.

Результати вивчення міжсортового і міжвидового поліморфізму в межах родини *Triticeae* з використанням микросателітних SSR-маркерів показали, що найбільш дивергентними виявилися субгеноми В у міжсортовому і В-G у міжвидовому порівнянні, а найменш дивергентними в обох випадках – субгеноми (геном) D. Субгеном А і пара А-А^b займала проміжне положення у порівнянні з субгеномами, поданими вище. Аналіз поліморфізму деяких SSR пшениці в геномі генетично віддаленого виду *Beta vulgaris* виявили ряд консервативних локусів. Деякі SSR-маркери пшениці виявились придатними для використання в аналізі поліморфізму гібридів і ліній цієї культури.

Іл. 1. Табл. 1. Бібл. 13.

Zlatska A.V., Shytikova Yu.V., Korol L.V. Studies of intraspecific and interspecific conservatism of microsatellite (SSR) loci // Collected scientific works of Nikit. Botan. Gard. – 2009. – V. 131. – P. 176-181.

The results of investigation of inter- and intraspecific polymorphism in *Triticeae* by utilization of microsatellite SSR-markers demonstrated that the most divergent appeared to be subgenomes В in intervarietal and В-G in interspecific comparisons. The less divergent in all cases were subgenomes (genomes) D. Subgenome А and pair of genomes А-А^b were in the intermediate position if compare to the subgenomes mentioned above. Analysis of polymorphism of particular wheat SSR in genome of genetically distant species *Beta vulgaris* revealed several conservative loci. Particular SSR-markers of wheat appeared to be useful for utilization in analysis of polymorphism of hybrids and lines of this culture.

Fig. 1. Tabl. 1. Bibl. 13.

УДК 577.212:004

Карпов П.А., Емец А.И., Матусов В.Г., Ныпорко А.Ю., Надеждина Е.С., Шашина Н.Ю., Блюм Я.Б. Биоинформационный поиск растительных гомологов ассоциированной с микротрубочками протеинкиназы MAST2 // Сборник научных трудов Никит. ботан. сада. – 2009. – Т. 131. – С. 181-187.

Обнаружено 34 растительных гомолога протеинкиназы MAST2 – серин/треониновой протеинкиназы 2, ассоциированной с микротрубочками (группа AGC) и участвующей в регуляции микротрубочек и клеточного деления. Показано, что ближайшим гомологом протеинкиназы MAST2 человека является белок с ранее неизвестной функцией A7PHB5_VITVI из *Vitis vinifera*, названный нами «GMLK» (Grape MAST2-Like Kinase). Анализ пространственной структуры GMLK подтвердил его принадлежность к серин/треониновым протеинкиназам группы AGC, гомологию MAST2 и цАМФ-зависимым протеинкиназам.

Ил. 2. Табл.1. Библ. 11.

Карпов П.А., Емец А.И., Матусов В.Г., Ныпорко О.Ю., Надеждина Е.С., Шашина Н.Ю., Блюм Я.Б. Біоінформаційний пошук рослинних гомологів асоційованої з микротрубочками протеїнкінази MAST2 // Збірник наукових праць Нікіт. ботан. саду. – 2009. – Т. 131. – С. 181-187.

Виявлено 34 рослинних гомологи протеїнкінази MAST2 – асоційованої із микротрубочками серин/треонінової протеїнкінази 2 (група AGC), що бере участь у регуляції микротрубочок та клітинного поділу. Показано, що найближчим гомологом протеїнкінази MAST2 людини є білок з раніше невідомою функцією A7PHB5_VITVI із *Vitis vinifera*, названий нами “GMLK” (Grape MAST2-Like Kinase). Аналіз просторової структури GMLK підтвердив його належність до серин/треонінових протеїнкіназ групи AGC, а також гомологію MAST2 і цАМФ-залежних протеїнкіназ.

Іл. 2. Табл.1. Бібл. 11.

Karpov P.A., Yemets A.I., Matusov V.G., Nyporko A.Yu., Nadezhkina E.S., Shashina N.Yu., Blume Ya.B. Bioinformatic search of plant protein kinases taking part in microtubule protein phosphorylation and cell division regulation // Collected scientific works of Nikit. Botan. Gard. – 2009. – V. 131. – P. 181-187.

34 plant homologs of human MAST2 (microtubule-associated serine/threonine-protein kinase 2 involved in microtubule and cell division regulation) have been found. It was identified that the closest plant homolog of human MAST2 kinase was a protein of unknown function A7PHB5_VITVI from *Vitis vinifera* (herein named as “GMLK” – Grape MAST2-Like Kinase). Analysis of GMLK’s three-dimensional structure confirmed its relationship to the AGC serine/threonine protein kinases, homology to the MAST2 and cAMP-dependent protein kinases.

Fig. 2. Tabl.1. Bibl. 11.

УДК 581.5:575.113

Рудышин С.Д. Проблемы биобезопасности при использовании ГМ-растений // Сборник научных трудов Никит. ботан. сада. – 2009. – Т. 131. – С. 187-192.

Распространение ГМ-растений – необратимый процесс. Осознание и предостережение – два принципа относительно их биобезопасности. Отсутствуют научные данные, что ДНК продуктов питания встраиваются в генетический аппарат клеток человека. Нет причин опасаться создания «суперсорняков».

Библ. 9.

Рудишин С.Д. Проблеми біобезпеки при використанні ГМ-рослин // Збірник наукових праць Нікіт. ботан. саду. – 2009. – Т. 131. – С. 187-192.

Поширення ГМ-рослин – незворотній процес. Усвідомлення і пересторога – два принципи усіх нормативних документів щодо їх біобезпеки. Відсутні наукові дані, що ДНК продуктів харчування вбудовуються в генетичний матеріал клітин людини. Немає причин боятися створення «супербур’янів».

Бібл. 9.

Rudyshin S.D. Biosafety problems with a GM-plants utilization // Collected scientific works of Nikit. Botan. Gard. – 2009. – V. 131. – P. 187-192.

GM-plants spreading – is an irreversible process. The realizing and warning are two principles about their biosafety. There are no scientific facts that DNA of nutrition products inserts in the genetic apparatus of human cells. There are no reasons to fear a creation of «superweeds».

Bibl. 9.

УДК 633.52:577.21

Шиша Е.Н., Емец А.И., Корховой В.И., Спивак С.И., Гузенко Е.В., Лемеш В.А., Картель Н.А., Блюм Я.Б. Эффективная регенерация побегов и агробактериальная трансформация льна-долгунца химерным геном *GFP-TUA6* // Сборник научных трудов Никит. ботан. сада. – 2009. – Т. 131. – С. 192-197.

Представлены данные по эффективной регенерации и агробактериальной трансформации различных сортов льна-долгунца химерным геном *GFP-TUA6*. С помощью ПЦР-анализа подтверждена трансгенная природа полученных линий. Результаты лазерной сканирующей конфокальной микроскопии показали успешную инкорпорацию химерного тубулина в нативные структуры кортикальных микротрубочек трансгенных линий льна.

Ил. 3. Библ. 18.

Шиша О.М., Ємець А.І., Корховий В.І., Співак С.І., Гузенко О.В., Лемеш В.А., Картель М.А., Блюм Я.Б. Ефективна регенерація пагонів та агробактеріальна трансформація льону-довгунця химерним геном *GFP-TUA6* // Збірник наукових праць Нікіт. ботан. саду. – 2009. – Т. 131. – С. 192-197.

Представлено дані щодо ефективної регенерації та агробактеріальної трансформації різних сортів льону-довгунця химерним геном *GFP-TUA6*. За допомогою ПЛР-аналізу підтверджено трансгенну природу отриманих ліній. Результати лазерної скануючої конфокальної мікроскопії показали успішну інкорпорацію химерного тубуліну в нативні структури кортикальних микротрубочок трансгенних ліній льону.

Іл. 3. Бібл. 18.

Shysha E.N., Yemets A.I., Korkhovy V.I., Spivak S.I., Guzenko E.V., Lemesh V.A., Kartel N.A., Blume Ya.B. Efficient plantlet regeneration and *Agrobacterium* transformation of flax by chimeric *GFP-TUA6* gene // Collected scientific works of Nikit. Botan. Gard. – 2009. – V. 131. – P. 192-197.

The data on efficient plantlets regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation of different flax cultivars by chimeric *GFP-TUA6* gene have been presented in this study. Transgenic nature of obtained lines was confirmed by PCR analysis. The successful incorporation of chimeric tubulin in the native structures of cortical microtubules was detected by confocal laser scanning microscopy.

Fig. 3. Bibl. 18.

УДК 633.49:577.21:58.085

Жук В.П., Олейник Т.Н., Блюм Я.Б., Емец А.И. Регенерация украинских сортов картофеля и их генетическая трансформация синтетическими *Cry*-генами // Сборник научных трудов Никит. ботан. сада. – 2009. – Т. 131. – С. 197-201.

Разработаны протоколы эффективной регенерации четырёх сортов картофеля украинской селекции Левада, Вернисаж, Свитанок и Зарево. Определен потенциал каллусообразования и регенерационная способность в культуре *in vitro* этих сортов. Разработан протокол агробактериальной трансформации этих сортов картофеля. Трансформацию осуществляли пятью плазмидами: p1Ac PRD, p1C PRD, p2A PRD, p1CST PRD и p2AST PRD, которые содержали синтетические *Cry*-гены (*Cry1Ac*, *Cry1C* и *Cry2A*). В ходе исследований были отобраны линии картофеля для последующего молекулярно-биологического анализа.

Ил. 1. Табл. 1. Библ. 17.

Жук В.П., Олійник Т.М., Блюм Я.Б., Ємець А.І. Регенерація українських сортів картоплі та

їх генетична трансформація синтетичними *Cry*-генами // Збірник наукових праць Нікіт. ботан. саду. – 2009. – Т. 131. – С. 197-201.

Розроблено протоколи ефективної регенерації чотирьох сортів картоплі української селекції: Левада, Вернісаж, Світанок і Зарево. Оцінено їх потенціал щодо калюсоутворення та регенераційну здатність у культурі *in vitro*. Розроблено протокол агробактеріальної трансформації цих сортів картоплі української селекції. Трансформацію здійснювали п'ятьма плазмідами: p1Ac PRD, p1C PRD, p2A PRD, p1CST PRD и p2AST PRD, що містили синтетичні *Cry*-гени (*Cry1Ac*, *Cry1C* и *Cry2A*). В ході досліджень було відселектовано лінії картоплі для подальшого молекулярно-генетичного аналізу.

Ил. 1. Табл. 1. Бібл. 17.

Zhuk V.P., Oliynik T.N., Blume Ya.B., Emets A.I. Regeneration of Ukrainian potato varieties and their genetic transformation synthetic by *Cry*-genes // Collected scientific works of Nikit. Botan. Gard. – 2009. – V. 131. – P. 197-201.

The protocols for efficient plant regeneration of four Ukrainian potato varieties have been worked out. The callus formation potential and the ability for plant regeneration *in vitro* for all these Ukrainian genotypes have been estimated. The protocols of *Agrobacterium* transformation of these varieties have been worked out. Transformation was conducted by using five vector constructs p1Ac PRD, p1C PRD, p2A PRD, p1CST PRD, p2AST PRD containing synthetic *Cry*-genes (*Cry 1Ac*, *Cry 1C* и *Cry 2A*) which provide resistance to wide spectrum of insects. As a result of experiments the potato lines have been picked up for further molecular-biological analysis.

Fig. 1. Tabl. 1. Bibl 17.

УДК 633.63:58.085

Дубровная О.В., Тищенко Е.Н., Сакало В.Д., Чугункова Т.В., Лялько И.И. Использование биотехнологических приемов для повышения сахаронакопления и устойчивости сахарной свеклы к неблагоприятным факторам окружающей среды // Сборник научных трудов Никит. ботан. сада. – 2009. – Т. 131. – С. 202-206.

Методами клеточной селекции получены растения сахарной свеклы с перекрестной устойчивостью к низким положительным температурам и одному из типов засоления – хлоридному или сульфатному. Изучено совместное влияние препаратов «Бетастимулин» и «Акварин» на биосинтетические процессы и продуктивность новых форм сахарной свеклы. Экспериментально доказано, что объединение двух биотехнологических подходов способствует одновременному улучшению селекционных и технологических качеств свеклы.

Ил. 1. Библ. 6.

Дубровна О.В., Тищенко О.М., Сакало В.Д., Чугункова Т.В., Лялько И.И. Використання біотехнологічних прийомів для підвищення цукронакопичення та стійкості цукрових буряків проти несприятливих чинників довкілля // Збірник наукових праць Нікіт. ботан. саду. – 2009. – Т. 131. – С. 202-206.

Методами клітинної селекції отримано рослини цукрових буряків з перехресною стійкістю до низьких позитивних температур та одного із типів засолення – хлоридного або сульфатного. Вивчено спільний вплив препаратів «Бетастимулін» та «Акварин» на біосинтетичні процеси та продуктивність нових форм цукрових буряків. Експериментально доведено, що поєднання двох біотехнологічних підходів сприяє одночасному поліпшенню селекційних та технологічних якостей буряків.

Ил. 1. Библ. 6.

Dubrovna O.V., Tishchenko E.N., Sakalo V.D., Chugunkova T.V., Lyalko I.I. Use of biotechnological methods for increasing sugar content and tolerance of sugar beet to stress factors of environment // Collected scientific works of Nikit. Botan. Gard. – 2009. – V. 131. – P. 202-206.

By methods of cell selection the sugar beet plants with cross tolerance to low positive temperatures and one of the types of salinity – chloride or sulphatic have been obtained. Influence of reagents «Betastimulin» and «Acvarin» on biosynthetic processes and efficiency of new forms of sugar beet have been studied. Association of two biotechnological approaches promoted simultaneous

improvement of breeding and technological qualities of a beet has been experimentally proved.

Fig. 1. Bibl. 6.

УДК: 635.11:581.143.5

Иваницкая В.В., Литвин Д.И., Емец А.И., Блюм Я.Б. Эффективная регенерация сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) для агробактериальной трансформации синтетическим геном *cryIAc* // Сборник научных трудов Никит. ботан. сада. – 2009. – Т. 131. – С. 206-209.

В процессе оптимизации протокола прямой регенерации сахарной свеклы был подобран оптимальный состав сред с разной концентрацией регуляторов роста для селекционной линии MM1/2; также оптимизирован протокол агробактериальной трансформации для данной линии. Трансформацию проводили, используя штамм LB 4440 *Agrobacterium tumefaciens*, содержащий бинарный вектор p1AcPRD, который несет синтетический *Cry*-ген – *cryIAc*, обеспечивающий устойчивость к насекомым-вредителям отряда Lepidoptera, и селективный маркерный ген *nptII*, обеспечивающий устойчивость к канамицину. В процессе работы были получены трансформанты, стабильно растущие на селективной среде на протяжении года.

Ил. 2. Библ. 11.

Иваницька В.В., Литвин Д.І., Ємець А.І., Блюм Я.Б. Ефективна регенерація цукрового буряку (*Beta vulgaris* L.) для агробактеріальної трансформації синтетичним геном *cryIAc* // Збірник наукових праць Нікіт. ботан. саду. – 2009. – Т. 131. – С. 206-209.

У процесі оптимізації протоколу регенерації цукрового буряку було отримано оптимальний склад середовищ з різною концентрацією регуляторів росту для селекційної лінії MM1/2; також для данної лінії оптимізовано протокол агробактеріальної трансформації. Трансформацію проводили використовуючи плазмиду LB 4440 *Agrobacterium tumefaciens*, що містила у собі бінарний вектор p1AcPRD із вбудованим синтетичним *Cry*-геном – *cryIAc*, що забезпечує стійкість проти комах-шкідників відділу Lepidoptera, і селективним маркерним геном *nptII* стійкості проти канамицину. В процесі роботи були отримані трансформанти, які стабільно росли на селективному середовищі протягом року.

Ил. 2. Библ. 11.

Ivanitska V.V., Lytvyn D.I., Yemets A.I., Blume Ya.B. Efficient sugar beet (*Beta vulgaris* L.) regeneration for agrobacterial transformation by synthetic *cryIAc* gene // Collected scientific works of Nikit. Botan. Gard. – 2009. – V. 131. – P. 206-209.

In the present work a protocol for direct regeneration of sugar beet MM1/2 selection line was optimized including choice of the most advantageous compositions of phytohormones. Protocol of agrobacterial transformation has been optimized for this line. Transformation has been applied using LB 4440 plasmid which contain binary vector p1AcPRD including *cryIAc* gene that providing resistance to the injurious insect of order of Lepidoptera and selective marker *nptII* gene providing resistance to kanamycin. During the work the transformed plants, stably growings for one year on selective medium have been obtained.

Fig. 2. Bibl. 11.

ВНИМАНИЮ АВТОРОВ

«Сборник научных трудов ГНБС» (свидетельство о государственной регистрации печатного средства массовой информации КВ № 3466, внесен в перечень специальных изданий по биологическим наукам 09.06.1999 г. – «Бюллетень ВАК» № 4 за 1999 г., с. 39) и «Бюллетень ГНБС» (свидетельство о государственной регистрации печатного средства массовой информации КВ № 3465, внесен в перечень специальных изданий по биологическим наукам 08.09.1999 г. – «Бюллетень ВАК» № 5 за 1999 г., с.26 и в дополнительный список специальных изданий по сельскохозяйственным наукам 15.01.2003 г. – «Бюллетень ВАК» № 2 за 2003 г., с. 8) издаются в Никитском ботаническом саду – Национальном научном центре (НБС-ННЦ).

РЕДАКЦИОННО-ИЗДАТЕЛЬСКИЙ СОВЕТ НБС-ННЦ ПРЕДЛАГАЕТ АВТОРАМ НОВЫЕ ПРАВИЛА ПРЕДСТАВЛЕНИЯ СТАТЬИ В РЕДАКЦИЮ

(приняты на заседании РИСО НБС-ННЦ 07.08.2008 протокол № 1)

Тематика статей: ботаника, охрана природы и заповедное дело, интродукция растений, дендрология, цветоводство, ландшафтный дизайн, биотехнология, биохимия, физиология и репродуктивная биология растений, агроэкология, энтомология и фитопатология, плодоводство и другие отрасли растениеводства, фитореабилитация человека и животных, научный маркетинг, методика исследований, история науки.

Принимаются статьи на украинском, русском и английском языках, набранные на компьютере (Word, шрифт Times New Roman, 14 pt., межстрочный интервал – 1,5; текст без переносов и выравнивания по ширине; размер всех полей 2,5 см; страницы не нумеруются) и распечатанные на бумаге формата А4 (1 экз.) с приложением копии на магнитном или оптическом носителе.

Статья должна иметь следующие элементы: постановка проблемы в общем виде и ее связь с важными научными или практическими задачами; анализ последних исследований и публикаций, в которых начато решение данной проблемы и на которые опирается автор; выделение нерешенных ранее частей общей проблемы, которым посвящается эта статья; формулирование целей статьи (постановка задачи); изложение основного материала исследования с полным обоснованием полученных научных результатов; выводы из данного исследования.

Порядок изложения материала следующий: название статьи жирными прописными буквами; Ф.И.О. автора(ов) прописными буквами, ученая степень – строчными курсивом; название учреждения, город (если статья не из НБС-ННЦ) и страна (если статья не из Украины) строчными буквами; текст статьи (разделы «Введение», «Объекты и методы исследования», «Результаты и обсуждение», «Выводы», «Список литературы» – в алфавитном порядке, сначала кириллицей, затем – латиницей, примеры см. ниже) – названия разделов по центру строчными жирными. Таблицы: слово «Таблица» с ее номером – справа, название таблицы – ниже по центру строчными жирными, текст и цифры в таблице – строчными обычными. Рисунки: подписи к рисункам – под рисунком по центру строчными жирными. Графики и диаграммы представляются в виде отдельных файлов в формате TIFF, JPEG.

Названия видов растений и животных даются на латинском языке (курсивом) с указанием автора (обычным шрифтом), например: *Quercus pubescens* Willd. При последующем упоминании этого же таксона его родовое название пишется сокращенно, а фамилия автора не приводится (*Q. pubescens*). Названия сортов растений в соответствии с «Международным кодексом номенклатуры для культурных растений» заключаются в одинарные кавычки, если перед этим названием нет слова «сорт». Для всех слов в названии сорта употребляются прописные начальные буквы (примеры: персик 'Золотой Юбилей', сорт персика Золотой Юбилей).

Рефераты на английском, русском и украинском языках (до 10 строк) подаются на отдельном листе по следующей форме: УДК, ниже – Ф.И.О. автора(ов), название статьи, ниже – текст реферата, под ним – количество таблиц, рисунков, источников (все строчными).

Объем рукописи, включая таблицы, рисунки и список литературы, для Трудов не должен превышать 22 страниц, для Бюллетеня – 8 страниц. В тексте статьи ссылки на литературу обозначаются цифрой в квадратных скобках.

Библиографическое описание в списке литературы делать по форме 23, представленной в

"Бюллетене ВАК України", № 6 за 2007 г. (с. 31-33).

ПРИМЕРЫ:

Характеристика источника	Пример оформления
Монографии: один, два или три автора	Сімонок В.П. Семантико-функціональний аналіз іншомовної лексики в сучасній українській мовній картині світу / Нац. юрид. акад. України. – Х.: Основа, 2000. – 331 с. – Бібліогр.: с. 291-329.
	Василенко М.В. Теорія коливань: Навч. посіб. – К.: Вища шк., 1992. – 430 с.
	Отраслевые проблемы текстильной промышленности: причины и пути решения: (Монография) / Р.Р. Ларина, О.Е. Ройтман; Донец, гос. акад. упр. – Севастополь: Изд. предприятие "Вебер"; Донецк: Б.и., 2002. – 131 с.: ил., табл. – Библиогр. с.: 121-124.
	Костіна Н.І. Моделювання фінансів / Н.І. Костіна, А.А. Алексеев, П.В. Мельник; Держ. податк. адмін. України, Акад. держ. податк. служби України. – Ірпінь: Акад. ДПС України, 2002. – 224 с.: іл., табл. – Бібліогр.: с. 217-222.
Больше трёх авторов	Оплата праці в сільськогосподарському виробництві / М-во аграр. політики України, Наук.–дослід. центр нормативів праці; Ю.Я. Лузан, В.В. Вітвіцький, О.А. Аврамчук та ін. – К.: Центр "Агропромпраця", 2000. – 462, [1] с.: іл., табл.
Многотомные издания	История русской литературы: В 4 т. / АН СССР. Ин-т рус. лит. (Пушкин. дом). – М., 1982. – Т. 3: Расцвет реализма. – 876 с.
	Інтелектуальна власність в Україні: правові засади та практика: У 4 т. / Акад. прав. наук України, Держ. патент. відомство України, Держ. агентство України з авт. і суміж. прав; За заг. ред. О.Д. Святоцького. – К.: Вид. Дім "Ін Юре", 1999. – Т. 1-4.
Переводные издания	Гайек Ф.А. Право, законодавство і свобода. Нове визначення ліберальних принципів справедливості і політичної економії / Пер. з англ. В. Дмитрук. – К.: Аквілон–Прес, 2000. – 447 с.
Справочники	Шишков М.М. США. Марочник сталей и сплавов ведущих промышленных стран мира: [Справочник] / М.М. Шишков, А.М. Шишков. – Донецк: ООО "Юго–Восток", 2002. – 234 с.: ил., табл.
Словари	Библиотечное дело: Терминолог. слов. / Сост.: И.М. Сусллова, Л.Н. Уланова. – 2-е изд. – М.: Книга, 1986. – 224 с.
Законодательные, нормативные акты	Господарський процесуальний кодекс України: Офіц. текст із змін. станом на 1 лип. 2002 р. / М-во юстиції України. – К.: Вид. дім "Ін Юре", 2002. – 129 с. – (Кодекси України)
Стандарты	ГОСТ 7.1-84. СИБИБД. Библиографическое описание документа. Общие требования и правила составления. – Взамен ГОСТ 7.1-76; Введ. 01.01.86. – М.: Изд-во стандартов, 1984. – 77 с.
Сборники научных трудов	Обчислювальна і прикладна математика: Зб. наук. пр. – К.: Либідь, 1993. – 99 с.
Депонированные научные работы	Меликов А.З., Константинов С.Н. Обзор аналитических методов расчета и оптимизации мультиресурсных систем обслуживания / Науч.-произв. корпорация "Киев, ин-т автоматики". – К., 1996. – 44 с. – Рус. – Деп. в ГНТБ Украины 11.11.96, № 2210 – Ук96. – Реф. в: Автоматизация производственных процессов. – 1996. – № 2.
Составные части книги	Литвин В.М. Акт проголошення незалежності України // Енциклопедія історії України. – К., 2003. – Т. 1: А-В. – С. 57–58.
сборника	Василенко Н.Є. Громадсько-політична та культурно-освітня діяльність І.М. Труби // Питання історії України. Історико-культурні аспекти: Зб. наук. праць. – Дніпропетровськ, 1993. – С. 72-79.

журнала	Митрофанова И.В., Казас А.Н., Хохлов С.Ю. Особенности клонального микроразмножения хурмы // Бюл. Никит. ботан. сада. – 1998. – Вып. 80. – С. 153-158. Perez K. Radiation therapy for cancer of the cervix // Oncology. –1993. – Vol. 7, № 2. – P. 89-96.
Тезисы докладов	Литвин В.М. Втрати України в Другій світовій війні // Українська історична наука на сучасному етапі розвитку: II Міжнар. наук. конгрес укр. істориків. Кам'янець-Подільський, 17-18 верес. 2003 р. – Кам'янець-Подільський; К.; Нью-Йорк; Острог, 2005. – Т. 1. – С. 23-36.
Диссертации	Петров П.П. Активність молодих зірок сонячної маси: Дис. ... доктора фіз.-мат. наук: 01.03.02; – Захищена 09.12.2005; Затв. 09.03.2006. – К., 2005. – 276 с.: іл. – Бібліогр.: с. 240-276.
Авторефераты диссертаций	Петров П.П. Активність молодих зірок сонячної маси: Автореф. дис. ... доктора фіз.-мат. наук / Головна астроном. обсерват. НАНУ. – К., 2005. – 35 с.
Препринты	Зелинский Ю.Б. О нелинейных выпуклых областях и аналитических полиэдрах / Ю.Б. Зелинский, В.Л. Мельник. – К.: Ин-т математики АН України, 1993. – 21 с. – (Препринт / АН Украины. Ин-т математики; 93, 94).
Пособия	Система оперативного управления предприятием "GroosBee XXI". Версия 3.30: Рук. пользователя. Ч. 5, гл. 9 Подсистема учета производства / Сост. С. Беслик. – Днепропетровск: Арт-Прес, 2002. – 186 с.: ил., табл.
Отчет о научно-исследовательской работе	Проведение испытаний и исследований теплотехнических свойств камер КХС-2-12-ВЗ и КХС-2-12-КЗЮ: Отчет о НИР (промежуточ.) / Всесоюз. заоч. ин-т пищ. пром-ти. – ОЦО 102ТЭ; № ГР 800571; Инв. № В 119692. – М., 1981. – 90 с.
Авторские свидетельства	Линейный импульсный модулятор: А.с. 1626362. Украина. МКИ НОЗК7/02 / В.Г. Петров – № 4653428/21; Заявл. 23.03.92; Опубл. 30.03.93, Бюл. № 13. – 4 с.: ил.
Патенты	Пат. 4601572 США, МКИ G 03 B 27. Microfilming system with zone controlled adaptive lighting: Пат. 4601572 США, МКИ G 03 B 27 D.S.Wise (США); McGraw-Hill Inc. – № 721205; Заявл. 09.04.85; Опубл. 22.06.86, НКИ 355/68. – 3 с.
Каталоги	Каталог млекопитающих СССР. Плиоцен – современность / АН СССР. Зоол. ин-т; Под ред. И.М. Громова, Г.И. Барановой. – Л.: Наука. Ленингр. отд-ние, 1981. – 456 с.
Электронный ресурс	Розподіл населення найбільш численних національностей за статтю та віком, шлюбним станом, мовними ознаками та рівнем освіти [Електронний ресурс]: За даними Всеукр. перепису населення 2001 р. / Держ. ком. статистики України; Ред. О.Г. Осауленко. – К.: CD-вид-во "Інфодиск", 2004. – 1 електрон, опт. диск (CD-ROM): цв; 12 см. – (Всеукр. перепис населення, 2001). – Систем. вимоги: Pentium-266; 32 Мб RAM; CD-ROM Windows 98/2000/NT/XP. – Заголовок з титул. екрану. Спадщина [Електронний ресурс]: Альм. Українознав. Самвидав. 1988-2000 рр. Вип. 1-4 / Ред. альм. М.І. Жарких. – Електрон. текстові дані (150 Мб). – К.: Корона тор, 2005. – 1 електрон, опт. диск (CD-ROM): цв; 12 см. – Систем. вимоги: Windows 95/98/ME//NT4/ 2000/XP. Acrobat Reader. – Заголовок з титул. екрану.

	Бібліотека і доступність інформації у сучасному світі: електронні ресурси науки, культурі та освіті: (Підсумки 10-ї міжнар. конф. "Крим–2003") [Електронний ресурс] / Л.Й. Костенко, А.О. Чекмарьов, А.Г. Бровкін, І.А. Павлуша // Бібл. Вісн. – 2003. – № 4. – С. 43. – Режим доступу до журн.: http://www.nbu.gov.ua/articles/2003/03klinko.htm .
	Форум: Електрон, інформ. бюл. – 2005. № 118. – Режим доступу: http://www.mcforum.vinnitsa.com/mail-list/118.html . – Заголовок з екрану.

Статья должна быть подписана автором(ами) на последней странице. На отдельной странице печатается адрес, телефон, e-mail первого или ответственного автора. К тексту статьи прилагается направление от учреждения, где выполнялась работа, рецензия и экспертное заключение установленной формы о возможности опубликования статьи, для иногородних – также один конверт с маркой. Статьи аспирантов и соискателей сопровождаются отзывом научного руководителя.

Редакционно-издательский совет оставляет за собой право редактировать текст статьи, согласовывая отредактированный вариант с автором, а также отклонять не соответствующие требованиям и неправильно оформленные рукописи.

Рукописи статей отправляйте по адресу:

Редакционно-издательский совет Никитского ботанического сада, пгт. Никита, г. Ялта, АР Крым, 98648, Украина

Телефоны: (0654) 33-56-16, 33-53-98

E-mail НБС–НИЦ: nbs1812@gmail.com

nbg@yalta.crimea.ua

СОДЕРЖАНИЕ

Третьякова И.Н., Барсукова А.В., Савельев С.С., Сиренко А.С. Сочетание классической селекции и применения современных методов биотехнологии для сохранения генофонда хвойных видов Сибири	5
Митрофанова И.В. Соматический эмбриогенез и органогенез как основа биотехнологических систем получения и сохранения декоративных и плодовых культур	9
Молканова О. И. Генетические банки растений в ботанических садах России	22
Навалинскене М., Самуйтене М., Григальюнайте Б., Юодкайте Р., Штукенене Г., Дапкунене С. Фитопатологический контроль генофонда декоративных растений в Литве	27
Ухер Ю. Селекция, оценка и создание генобанка <i>Carthamus tinctorius</i> L. в Чешской Республике	32
Зыков К.И., Клименко З.К. Спонтанная мутационная изменчивость количественных признаков и её генетические аспекты на примере махровости цветков роз	37
Недолужко А.И., Недолужко А.В. Межвидовая гибридизация – перспективный метод сохранения генетических ресурсов рода <i>Chrysanthemum</i> L.	43
Набиева А.Ю. Клональное микроразмножение сортов <i>Hemerocallis</i> L. и <i>Hosta</i> L. при использовании эксплантов тканей и органов цветка	47
Майстренко Г.Г., Новикова Т.И., Селютин И.Ю., Сидорова К.К. Клональное микроразмножение редкого сибирского вида <i>Gueldenstaedtia monophylla</i> Fisch. .	50
Банаев Е.В., Новикова Т.И. Новый декоративный искусственный гибрид <i>Alnus incana</i> (L.) Moench. x <i>A. hirsuta</i> (Spach) Turcz. ex Rupr.	55
Власова А.Б., Панкратов В.С., Спиридович Е.В., Решетников В.Н. RAPD и ISSR-генотипирование перспективных форм курительского чая (<i>Potentilla fruticosa</i> L.) коллекции Центрального ботанического сада НАН Беларуси	59
Егорова Н.А., Ставцева И.В., Инюткина А.Г., Чуб Л.Н., Лолойко А.А. Культура каллусных тканей и соматическая изменчивость у эфиромасличных растений	63
Титова М.В., Шумило Н.А., Куличенко И.Е., Орешников А.В., Носов А.М. Оптимизация выращивания суспензионных культур клеток <i>Dioscorea deltoidea</i> Wall и <i>Polyscias filicifolia</i> Bailey в полупроточном режиме в биореакторах различного объема	68
Круглова Н.Н., Круглова А.Е. Размножение борца северного в каллусной культуре <i>in vitro</i> на основе феномена эмбриодогении	73
Рубос К., Ифолис А., Митрофанова И., Неллас К., Кутинас Н., Рубос А. Особенности формирования и развития сферобластов у маслины европейской (<i>Olea europaea</i> L.)	76
Смыков А.В. Экспериментальный мутагенез в селекции персика	81
Еремин Г.В., Еремин В.Г. Использование генофонда рода <i>Prunus</i> L. в селекции клоновых подвоев косточковых культур	90
Митрофанова О.В., Митрофанова И.В., Чирков С.Н., Ежов В.Н., Лесникова-Седошенко Н.П. Биотехнологические системы диагностики вируса шарки сливы (<i>Plum pox virus</i>) и отбора толерантных сортов косточковых плодовых культур	94
Кузнецова А.П., Щеглов С.Н. Системный анализ изменчивости при создании методов ускоренной оценки устойчивости форм рода <i>Cerasus</i> Mill. к коккомикозу	103
Лукичева Л.А. Новые районированные и перспективные сорта черешни селекции	

Никитского ботанического сада	107
Корзина Н.В. Микроразмножение перспективных сортов черешни (<i>Prunus avium</i> L.) в условиях <i>in vitro</i>	112
Клименко С.В. Айва обыкновенная (<i>Cydonia oblonga</i> Mill.) в лесостепи Украины: итоги интродукции и селекции	117
Баскакова В.Л. Перспективный исходный материал и характер наследования в селекции груши на устойчивость к парше	122
Корнова К. Влияние минерального состава питательной среды и типа ауксина на укоренение <i>in vitro</i> при микроразмножении груши	126
Левченко С.В., Волюнкин В.А., Виноградов Б.А., Толкачева Н.В. Хемоселекция винограда на наличие аромата	130
Кайя Я., Эвчи Г., Пекан В., Гюсер Т., Илмаз М.И. Селекция подсолнечника (<i>Helianthus annuus</i> L.) на устойчивость к имидазолину	134
Лавриненко Ю.А. Эколого-генетическая изменчивость географически отдаленного исходного материала зерновых культур	138
Хайленко Н.А. Биотехнологические подходы в получении межвидовых гибридов с мягкой пшеницей	144
Яруллина Л.Г., Трошина Н.Б., Сурина О.Б., Максимов И.В. Применение совместного культивирования каллусных культур пшеницы (<i>Triticum aestivum</i> L.) с патогенными грибами в исследовании механизмов фитоиммунитета	148
Терлецкая Н.В. Повреждающее действие абиотических стрессов на растительные клетки зерновых злаков	152
Дениско Т.В., Игнатова С.А., Бабаянц О.В. Разработка условий <i>in vitro</i> для прогнозирования толерантности мягкой пшеницы к грибам разных видов рода <i>Alternaria</i> Nees.	156
Максимов И.В., Сурина О.Б., Трошина Н.Б. Оценка устойчивости растений пшеницы к фитопатогенам с использованием совместных культур	160
Танасиенко И.В., Емец А.И., Блюм Я.Б. Разработка метода эффективной трансформации ячменя (<i>Hordeum vulgare</i> L.) с помощью <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	167
Дьяченко Л.Ф., Тоцкий В.Н., Сичкарь В.И., Топтиков В.А. Экспрессивность множественных форм пероксидазы в онтогенезе сои	171
Злацкая А.В., Шитикова Ю.В., Король Л.В. Изучение внутривидового и межвидового консерватизма локусов микросателлитов (SSR)	176
Карпов П.А., Емец А.И., Матусов В.Г., Ныпорко А.Ю., Надеждина Е.С., Шашина Н.Ю., Блюм Я.Б. Биоинформационный поиск растительных гомологов ассоциированной с микротрубочками протеинкиназы MAST2	181
Рудышин С.Д. Проблемы биобезопасности при использовании ГМ-растений	187
Шиша Е.Н., Емец А.И., Корховой В.И., Спивак С.И., Гузенко Е.В., Лемеш В.А., Картель Н.А., Блюм Я.Б. Эффективная регенерация побегов и агробактериальная трансформация льна-долгунца химерным геном <i>GFP-TUA6</i>	192
Жук В.П., Олейник Т.Н., Блюм Я.Б., Емец А.И. Регенерация украинских сортов картофеля и их генетическая трансформация синтетическими <i>Cry</i> -генами	197
Дубровная О.В., Тищенко Е.Н., Сакало В.Д., Чугункова Т.В., Лялько И.И. Использование биотехнологических приемов для повышения сахаронакопления и устойчивости сахарной свеклы к неблагоприятным факторам окружающей среды	202
Иваницкая В.В., Литвин Д.И., Емец А.И., Блюм Я.Б. Эффективная регенерация сахарной свеклы (<i>Beta vulgaris</i> L.) для агробактериальной трансформации синтетическим геном <i>cryIAc</i>	206

Реферати	210
Правила для авторів	236

ЗМІСТ

Третьякова І.М., Барсукова А.В., Савельєв С.С., Сіренко А.С. Сполучення класичної селекції та застосування сучасних методів біотехнології для збереження генофонду хвойних видів Сибіру	5
Митрофанова І.В. Соматичний ембріогенез і органогенез як основа біотехнологічних систем одержання та збереження декоративних і плодкових культур	9
Молканова О.І. Генетичні банки рослин у ботанічних садах Росії	22
Навалінскене М., Самуйтене М., Грігалюнайте Б., Юодкайте Р., Штукенене Г., Дапкунене С. Фітопатологічний контроль генофонду декоративних рослин у Литві..	27
Ухер Ю. Селекція, оцінка та створення генобанку <i>Carthamus tinctorius</i> L. у Чеській Республіці	32
Зиков К.І., Клименко З.К. Спонтанна мутаційна мінливість кількісних ознак та її генетичні аспекти на прикладі махровості квіток троянд	37
Недолужко А.І., Недолужко А.В. Міжвидова гібридизація – перспективний метод збереження генетичних ресурсів роду <i>Chrysanthemum</i> L.	43
Набієва А.Ю. Клональне мікророзмноження сортів <i>Hemerocallis</i> L. і <i>Hosta</i> L. при використанні експлантів тканин і органів квітки	47
Майстренко Г.Г., Новікова Т.И., Селютіна И.Ю., Сидорова К.К. Клональне мікророзмноження рідкісного сибірського виду <i>Gueldenstaedtia monophylla</i> Fisch.	50
Банаєв Е.В., Новікова Т.И. Новий декоративний штучний гібрид <i>Alnus incana</i> (L.) Moench. x <i>A. hirsuta</i> (Spach) Turcz. ex Rupr.	55
Власова А.Б., Панкратов В.С., Спірідовіч Є.В. RAPD та ISSR-генотипування перспективних форм курільського чаю (<i>Potentilla fruticosa</i> L.) колекції Центрального ботанічного саду НАН Білорусі	59
Єгорова Н.О., Ставцева І.В., Інюткіна А.Г., Чуб Л.М., Лолойко О.А. Культура калусних тканин і соматональна мінливість у ефіроолійних рослин	63
Титова М.В., Шумило Н.А., Куличенко І.С., Орешніков А.В., Носов А.М. Оптимізація вирощування суспензійних культур клітин <i>Dioscorea deltoidea</i> Wall та <i>Polyscias filicifolia</i> Bailey у напівпроточному режимі в біореакторах різного об'єма	68
Круглова Н.Н., Круглова А.Є. Розмноження аконіту північного в калусній культурі <i>in vitro</i> на основі феномену ембріодогенії	73
Рубос К., Іфоліс А., Митрофанова І., Неллас К., Кутінас Н., Рубос А. Особливості формування та розвитку сферобластів у маслини європейської (<i>Olea europaea</i> L.)	76
Смиков А.В. Експериментальний мутагенез в селекції персика	81
Єрьомін Г.В., Єрьомін В.Г. Використання генофонду роду <i>Prunus</i> L. у селекції клонових підщеп кісточкових культур	90
Митрофанова О.В., Митрофанова І.В., Чирков С.М., Єжов В.М., Леснікова-Седошенко Н.П. Біотехнологічні системи діагностики вірусу шарки сливи (<i>Plum pox virus</i>) та добору толерантних сортів кісточкових плодкових культур .	94
Кузнецова А.П., Щеглов С.Н. Системний аналіз мінливості при створенні методів прискореної оцінки стійкості форм роду <i>Cerasus</i> Mill. проти кокомікозу	103
Лукічова Л.О. Нові районовані та перспективні сорти черешні Никітського ботанічного саду	107

Корзіна Н.В. Мікророзмноження перспективних сортів черешні (<i>Prunus avium</i> L.) в умовах <i>in vitro</i>	112
Клименко С.В. Айва звичайна (<i>Cydonia oblonga</i> Mill.) в лісостепу України: підсумки інтродукції і селекції	117
Баскакова В.Л. Перспективний вихідний матеріал та характер успадкування в селекції груші на стійкість проти парші	122
Корнова К. Вплив мінерального складу поживного середовища й типу ауксину на укорінення <i>in vitro</i> при мікророзмноженні груші	126
Левченко С.В., Волинкін В.О., Виноградов Б.А., Толкачова Н. В. Хемоселекція винограду на наявність аромату	130
Кайя Я., Євчі Г., Пекан В., Гюсер Т., Ілмаз М.І. Селекція соняшника (<i>Helianthus annuus</i> L.) на стійкість до імідазоліну	134
Лавриненко Ю.О. Еколого-генетична мінливість географічно віддаленого вихідного матеріалу зернових культур	138
Хайленко Н.О. Біотехнологічні підходи для отримання міжвидових гібридів з м'якою пшеницею	144
Ярулліна Л.П., Прошина Н.О., Суріна О.Б., Максимов І.О. Застосування спільного культивування калусних культур пшениці (<i>Triticum aestivum</i> L.) з патогенними грибами у дослідженні механізмів фітоімунітету	148
Терлецька Н.В. Ушкоджувальна дія абіотичних стресів на рослинні клітини зернових злаків	152
Дениско Т.В., Ігнатова С.О., Бабаянц О.В. Розробка умов <i>in vitro</i> для прогнозування толерантності м'якої пшениці до грибів різних видів роду <i>Alternaria</i> Nees.	156
Максимов І.В., Сурина О.Б., Трошина Н.Б. Оцінка стійкості рослин пшениці проти фітопатогенів з використанням спільних культур	160
Танасієнко І.В., Ємець А.І., Блюм Я.Б. Розробка методу ефективною трансформації ячменю (<i>Hordeum vulgare</i> L.) за допомогою <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	167
Дьяченко Л.Ф., Тоцький В.М., Січкач В.І., Топтіков В.А. Експресивність множинних форм пероксидази в онтогенезі сої	171
Злацька А.В., Шитікова Ю.В., Король Л.В. Вивчення внутрішньовидового і міжвидового консерватизму локусів мікросателітів SSR	176
Карпов П.А., Ємець А.І., Матусов В.Г., Нипорко О.Ю., Надєждіна Е.С., Шашина Н.Ю., Блюм Я.Б. Біоінформаційний пошук рослинних гомологів асоційованої з мікротрубочками протейнінази MAST2	181
Рудишин С.Д. Проблеми біобезпеки при використанні ГМ-рослин	187
Шиша О.М., Ємець А.І., Корховий В.І., Співак С.І., Гузенко О.В., Лемеш В.А., Картель М.А., Блюм Я.Б. Ефективна регенерація пагонів та агробактеріальна трансформація льону-довгунця химерним геном <i>GFP-TUA6</i>	192
Жук В.П., Олійник Т.М., Блюм Я.Б., Ємець А.І. Регенерація українських сортів картоплі та їх генетична трансформація синтетичними <i>Сту</i> -генами	197
Дубровна О.В., Тищенко О.М., Сакало В.Д., Чугункова Т.В., Лялько І.І. Використання біотехнологічних прийомів для підвищення цукронакопичення та стійкості цукрових буряків до несприятливих чинників довкілля	202
Іваніцька В.В., Литвин Д.І., Ємець А.І., Блюм Я.Б. Ефективна регенерація цукрового буряку (<i>Beta vulgaris</i> L.) для агробактеріальної трансформації синтетичним геном <i>cryIAc</i>	206
Реферати	210
Правила для авторів	236

CONTENTS

Tretyakova I.N., Barsukova A.V., Savelyev S.S., Sirenko A.S. Combination of classical breeding and application of modern methods of biotechnology for gene preservation of Siberian conifer species	5
Mitrofanova I.V. Somatic embryogenesis and organogenesis as a base of biotechnological system of ornamental plants and fruits obtaining and preservation	9
Molkanova O.I. Plant gene banks in botanical gardens of Russia	22
Navalinskenė M., Samuitenė M., Grigaliūnaitė B., Juodkaitė R., Štukėnienė G., Dapkūnienė S. Phytopathological control of ornamental plant genefund in Lithuania	27
Uher J. Safflower breeding, evaluation and genepool maintenance in the Czech Republic	32
Zykov K.I., Klimenko Z.K. Spontaneous mutational variability of quantitative characteristics and its genetic aspects on the example of double rose flowers	37
Nedoluzhko A.I., Nedoluzhko A.V. Interspecific hybridization – the perspective method of genetic resources preservation of genus <i>Chrysanthemum</i> L.	43
Nabieva A.Y. Clonal micropropagation of <i>Hemerocallis</i> and <i>Hosta</i> cultivars using the explants from tissues and organs of flower	47
Maistrenko G.G., Novikova T.I., Selyutina I.Yu., Sidorova K.K. Clonal micropropagation of rare Siberian species <i>Gueldenstattia monophila</i> Fisch.	50
Banaev E.V., Novikova T.I. New ornamental artificial hybrid <i>Alnus incana</i> (L.) Moench. x <i>A. hirsuta</i> (Spach) Turcz. ex Rupr.	55
Vlasova N.B., Pankratov V.S., Spiridovich E.V., Reshetnikov V.N. RAPD and ISSR fingerprinting of perspective forms of Shrubby Cinquefoil (<i>Potentilla fruticosa</i> L.) in the collection of the Central Botanical Gardens of NAS of Belarus	59
Yegorova N.A., Stavtseva I.V., Inyutkina A.G., Chub L.N., Loloiko A.A. Callus culture and somaclonal variability of essential oil plants	63
Titova M.V., Shumilo N.A., Kulichenko I.E., Oreshnikov A.V., Nosov A.M. Semicontinuous cultivation of <i>Dioscorea deltoidea</i> Wall and <i>Polyscias filicifolia</i> Bailey cell suspension cultures in bioreactors of different types and volumes	68
Kruglova N.N., Kruglova A.E. The propagation of aconite in callus culture <i>in vitro</i> on the basis of embryoidogeny phenomenon	73
Roubos K., Ifoulis A., Mitrofanova I., Nellas C., Koutinas N., Rubos A. Peculiarities of sphaeroblast formation and development in <i>Olea europaea</i> L.	76
Smykov A.V. Experimental mutagenesis in peach selection	81
Eremin G.V., Eremin V.G. Use of the genetic diversity of <i>Prunus</i> L. in selection of clonal rootstocks of stone fruits	90
Mitrofanova O.V., Mitrofanova I.V., Chirkov S.N., Ezhov V.N., Lesnikova-Sedoshenko N.P. Biotechnological systems of Plum pox virus diagnostics and selection of resistant varieties of stone fruit crops	94
Kuznetsova A.P., Stcheglov S.N. Systematic variability analysis during creation of express estimation methods for resistant forms of <i>Cerasus</i> Mill. to coccomycosis ..	103
Lukichova L.A. The new regionalized and perspective sweet cherry varieties bred in Nikitsky Botanical Gardens	107
Korzina N.V. Micropropagation of perspective sweet cherry (<i>Prunus avium</i> L.) varieties in conditions <i>in vitro</i> Korzina N.V. Micropropagation of perspective sweet cherry (<i>Prunus avium</i> L.) varieties in conditions <i>in vitro</i>	112

Klymenko S.V. Quince (<i>Cydonia oblonga</i> Mill.) in the forest-steppe of Ukraine: results of introduction and breeding	117
Baskakova V.L. Perspective initial material and character of inheritance in pear breeding on scab resistance	122
Kornova K. The effect of the mineral content of culture medium and the type of auxin on <i>in vitro</i> rooting of micropropagated pear plants	126
Levchenko S.V., Volynkin V.A., Vinogradov B.A., Tolkachyeva N.V. Grape chemobreeding for aroma	130
Kaya Y., Evci G., Pekcan V., Gucer T., Yilmaz M.I. The resistant breeding to imidazolinone herbicide group in sunflower (<i>Helianthus annuus</i> L.)	134
Lavrynenko Yu. Ecological and genetic variability of geographically distant material of corn cultures	138
Khailenko N.A. Biotechnological methods of obtaining of soft wheat interspecific hybrids	144
Yarullina L.G., Troshina N.B., Surina O.B., Maksimov I.V. Using of co-cultures of wheat (<i>Triticum aestivum</i> L.) cells with pathogenic fungi in the study of phytoimmunity mechanisms	148
Terletskaya N.V. Damaging action of abiotic stresses on plant cells of grain cereals	152
Denisko T.V., Ignatova S.A., Babayants O.V. Elaboration of conditions <i>in vitro</i> for forecasting of soft wheat tolerance to the fungi of different species of the genus <i>Alternaria</i> Nees.	156
Maksimov I.V., Surina O.B., Troshina N.B. Resistant evaluation of wheat to phytopatogenes using cocultures	160
Tanasienko I.V., Yemets A.I., Blume Ya.B. Advanced method of the effective barley (<i>Hordeum vulgare</i> L.) transformation using <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	167
Diyachenko L.F., Totsky V.M., Sichkar V.S., Toptikov V.A. Multiply peroxidase forms expression during soybean ontogenesis	171
Zlatska A.V., Shytikova Yu.V., Korol L.V. Studies of intraspecific and interspecific conservatism of microsatellite (SSR) loci	176
Karpov P.A., Yemets A.I., Matusov V.G., Nyporko A.Yu., Nadezhdina E.S., Shashina N.Yu., Blume Ya.B. Bioinformatic search of plant protein kinases taking part in microtubule protein phosphorylation and cell division regulation	181
Rudyshin S.D. Biosafety problems with a GM plants utilization	187
Shysha E.N., Yemets A.I., Korkhovy V.I., Spivak S.I., Guzenko E.V., Lemesh V.A., Kartel N.A., Blume Ya.B. Efficient plantlet regeneration and <i>Agrobacterium</i> transformation of flax by chimeric <i>GFP-TUA6</i> gene	192
Zhuk V.P., Oliynik T.N., Blume Ya.B., Emets A.I. Regeneration of Ukrainian potato varieties and their genetic transformation synthetic by <i>Cry</i> -genes	197
Dubrovnyaya O.V., Tishchenko E.N., Sakalo, Chugunkova T.V., Lyalko I.I. Use of biotechnological methods for increasing sugar content and tolerance of sugar beet to stress factors of environment	202
Ivanitska V.V., Lytvyn D.I., Yemets A.I., Blume Ya.B. Efficient sugar beet (<i>Beta vulgaris</i> L.) regeneration for agrobacterial transformation by synthetic <i>cryIAc</i> gene	206
Summaries	210
Rules for the authors	236

Печатается по постановлению редакционно-издательского совета
Никитского ботанического сада

**Актуальные проблемы прикладной генетики, селекции и
биотехнологии растений**

Сборник научных трудов

Том 131

Редактор Е.А. Бордунова

Компьютерная верстка Т.В. Шишовой

[http: // www.nbgns.com](http://www.nbgns.com)

Свидетельство о государственной регистрации КВ № 3466 от 09.09.98 г.

Подписано в печать 02.10.2009 г. Формат 210x297. Бумага офсетная – 80 г/см².
Печать ризографическая. Уч.-изд. л. 28. Тираж 500 экз. Заказ № 336.

98648, Ялта, Никитский ботанический сад, редакционно-издательская группа.
Тел. (0654) 33–56–16, 33–53–98.

Типография ФЛП Бражникова Н.А., тел. (0652) 70–63–31, 8 050–648–89–34