

6231-II	-//-	72±2,8
середнє		82,2±2,2
6000	НМС 0,005	77±2,2
6008	-//-	80±1,8
6019	-//-	66±3,0
6027-II	-//-	78±2,2
6066	-//-	91±2,6
середнє		78,4±2,4

Висновки

Таким чином, аналіз рослин гібридно-мутантних популяцій озимої м'якої пшениці за використання НЕС 0,005% та НМС 0,005% засвідчує, що суттєвого зниження рівня перезимівлі в порівнянні з контролем не спостерігалось. Коливання показника перезимівлі по окремих комбінаціях схрещування залежали від генотипів рослин гібридних популяцій.

Література

1. *Моргун В.В., Логвиненко В.Ф.* Мутационная селекция пшеницы.-К.: Наукова думка, 1995.-626 с.
2. *Матвієць В.Г., Мошенко М.М., Шудря П.П.* Результати селекційної роботи з озимою пшеницею на Весело подільській дослідно-селекційній станції // Зб. наук. праць ІЦБ УААН.-К.-2004,-Вип.7.-С. 55-64.
3. *Якимчук Р.А., Моргун В.В.* Генетична активність низьких доз фізичних та хімічних мутагенних факторів на озимій пшениці// Наук. вісник Ужгородського державного ун-ту: Сер. Біологія.-2000.-№8.-С.167-171.
4. *Ковтун В.И., Гричаникова Т.А.* Селекция озимой пшеницы на морозозимостойкость и продуктивность // Сб. Селекция и технология возделывания озимой пшеницы, твердой и тургидной пшеницы, тритикале. Зерноград, 2001.- С. 106-110.

Резюме.

Представлено результати перезимівлі рослин гібридно-мутантних популяцій озимої м'якої пшениці другого-третього покоління після обробки хімічними мутагенами вихідних гібридних форм.

Представлены результаты перезимовки растений гибридно-мутантных популяций озимой мягкой пшеницы второго-третьего поколений после обработки химическими мутагенами исходных гибридных форм.

We report above spend the winter of hibrid plants second and third generation of different population winter soft wheat after influences chemical mutagens.

**РЕШЕТНИКОВ В.Н., СПИРИДОВИЧ Е.В., МАКЕДОНСКАЯ Н.В., ЧИЖИК О.В.
АНТИПОВА Т.В., БРЕЛЬ Н.Г**

*Центральный Ботанический сад Национальной Академии наук Беларуси,
Беларусь, 220012, Минск, ул. Сурганова 2В, belsyringa@mail.ru*

ИЗУЧЕНИЕ ГЕНОФОНДА СИРЕНИ В ЦБС НАН БЕЛАРУСИ

Коллекция сирени ЦБС НАН Беларуси, созданная методом прививки с 1954-1964гг., состоит из более 200 таксонов. Она является достаточно обширной по видовому, сортовому и гибриднему разнообразию и постоянно пополняется новыми сортами. Она также служит источником для селекционной работы и размножения перспективных и редких сортов.

В коллекции представлены 23 вида и 200 сортов разного срока цветения с простыми (60%) и махровыми (40%) цветками с широкой цветовой гаммой: белой (18%), лиловой (48%), розовой (14%), пурпурной и фиолетовой (20%). Идет пополнение новыми сортами корнесобственного происхождения, которые позволят омолодить коллекцию. Еще одним направлением работы с коллекцией сирени в ЦБС является сохранение генетического биоразнообразия в культуре *in vitro*. В настоящее время в коллекции *in vitro* сохраняется 30 сортов сирени. Оптимизируются биотехнологические приемы их эффективного микроклонирования. Ведется поиск лучших агротехнических приемов и методов адаптации клонированного растительного материала. Идет создание маточных плантаций оздоровленного сортового материала. Параллельно проводится молекулярно-генетическое маркирование клонов сирени, полученных в культуре *in vitro*.

Данные, полученные на основе многолетних фенологических наблюдений, изучения особенностей роста и цветения, нуждаются в систематизации и дополнении биохимическими характеристиками. Сложность генетической интерпретации морфологических признаков, связанная с полигенным наследованием и, как правило, сильным влиянием среды на фенотипическое проявление признака, зачастую ограничивает использование методов традиционного описания морфологических и цитологических характеристик растений.

Материалы и методы

Начиная с 2004 г. в ЦБС НАН Беларуси начаты работы по изучению генома сирени помощью RAPD-метода, позволяющего идентифицировать имеющиеся в коллекции дикорастущие виды и культурные сорта.

Молекулярно-генетические методы анализа, основанные на проведении полимеразной цепной реакции (ПЦР), за последние 20 лет стали одними из самых популярных и используются в настоящее время для изучения многих видов организмов. Они отличаются высокой эффективностью, производительностью, хорошей воспроизводимостью и относительной экономичностью. Все вышеперечисленные достоинства в полной мере относятся к RAPD-методу, основанному на изучении произвольно-амплифицированной полиморфной ДНК (RAPD) [1]. Простота этого метода обеспечивается тем, что он не требует предварительного знания специфической последовательности амплифицируемой ДНК, поэтому для его проведения используются праймеры, отобранные произвольным образом.

Для RAPD-анализа генома сирени из коллекции ЦБС НАН Беларуси были отобраны следующие представители: 4 вида *Syringa amurensis*, *S. pekinensis*, *S. chinensis*, *S. vulgaris* и следующие сорта сирени обыкновенной: Хорошее настроение, Павлинка, Лунный свет, Вера Хоружая, Президент Гречи, Лебедушка, Минчанка, Красавица Москвы, Радж Капур, Реомюр, Эстер Стейли, Нестерка, Президент Пуанкаре и сирень группы Престона -Роялти. Препараты суммарной ДНК получали по методике [2] из листьев растений. В работе использовали 10 олигонуклеотидных десятичленных праймеров. Продукты ПЦР разделяли и визуализировали по стандартным методикам [3].

Результаты и обсуждение

Первым этапом работы при использовании молекулярных методов исследования ДНК растений, является получение высокоочищенной геномной ДНК из различных растительных тканей. Несмотря на существование ряда опубликованных протоколов по выделению тотальной ДНК растений, при работе со сложными для исследования древесными культурами, к которым относится и сирень, необходима модификация этих методик. Это связано с наличием в клетках этих растений большого количества вторичных метаболитов, в том числе эндогенных полисахаридов и фенольных соединений, которые трудно отделить от ДНК. Образцы ДНК, полученные нами по

нескольким стандартным методикам [4, 5] содержали большое количество примесей и не могли быть использованы для дальнейшего RAPD-анализа. Модификация протокола выделения тотальной растительной ДНК с помощью СТАВ-буфера, позволила получить высококачественную тотальную ДНК сирени. В результате данного этапа работы также установлено, что наиболее подходящим растительным материалом являются молодые, активно растущие побеги и листья.

Следующий этап работы состоял в оптимизации RAPD-метода и идентификации праймеров, которые обнаруживают полиморфизм применительно к отобраным видам и сортам коллекции сирени. Испытано 10 произвольных десятичленных праймеров, различающихся по нуклеотидной последовательности и проценту G-C пар нуклеотидов. Проведенное электрофоретическое фракционирование продуктов полимеразной цепной реакции препаратов ДНК с этими произвольными десятичленными праймерами (RAPD) позволило выявить широкий спектр амплимерных зон. Следует отметить, что из 10 использованных праймеров, полиморфные спектры были получены по 6 из них для изучаемых образцов ДНК сирени. Анализ по данным праймерам у исследованных образцов обнаружил амплимерные зоны, 29 из которых были полиморфны. На основании полученных RAPD-спектров для всех исследованных сортов сирени были составлены многолокусные RAPD-паспорта. Следует отметить, что использовали амплимерные зоны, электрофоретическая идентификация которых была наглядна и легка, а генетическая детерминация не вызывала никаких сомнений. Для количественной оценки полиморфизма и определения уровня дивергенции между исследуемыми сортами сирени результаты RAPD-анализа были представлены в виде матрицы состояний бинарных признаков, где присутствие фрагмента принималось за 1, отсутствие – за 0. Величина размера каждой амплифицированной зоны вычислялась относительно электрофоретической подвижности маркеров с известной молекулярной массой. Обозначение зон производилось по названию праймера, использованного для полимеразной цепной реакции, и размера зоны (в парах нуклеотидов) в надстрочнике.

Показано, что популяции различаются по генетической вариабельности их представителей, которая выражалась не только в наличии полиморфных локусов в ДНК некоторых растений, но и в варьировании интенсивности гомологичных фрагментов в профилях амплификации ДНК у разных растений.

Для стабильного поддержания коллекции *in vitro* наряду с подбором оптимального состава питательных сред, используемого гормонального баланса немаловажным условием является сохранение целостности генотипа полученных микропобегов. Изменчивость среди растений, регенерированных *in vitro*, бывает очень высокой. Наиболее вероятными источниками генетической вариабельности могут быть мутации, хромосомные нарушения, а также возникновение полиплоидных клеток. Эти нарушения накапливаются главным образом при культивировании каллусных тканей. Следует отметить, что в нашем случае микропобеги сирени получали прямым органогенезом из апикальных и аксиллярных почек, без образования каллуса. Таким образом, этап при котором наблюдается накопление генетических отклонений, а именно – культивирование каллуса, отсутствует в разработанной нами технологии. Для подтверждения генетической идентичности полученных клонов с исходными генотипами проведено сравнение продуктов RAPD-PCR полученных клонов с продуктами RAPD-PCR исходных генотипов. Для анализа использовали праймеры показавшие наибольший полиморфизм на различных генотипах сирени .

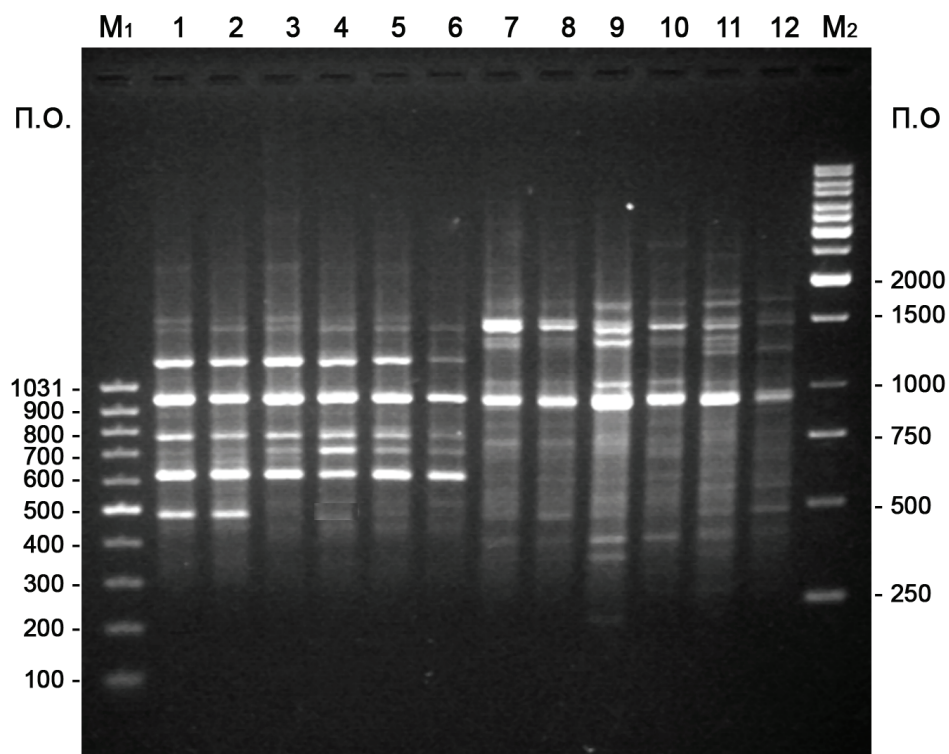


Рисунок 1 - RAPD-анализ ДНК исходных сортов и микроклонов сирени.

Оligo18: 1 - сорт М.Шолохов; 2 - микроклон М.Шолохов; 3 - сорт Флора; 4 - микроклон Флора; 5 - сорт Жемчужина; 6 - микроклон Жемчужина; **Оligo19:** 7 - сорт М.Шолохов; 8 - микроклон М.Шолохов; 9 - сорт Флора; 10 - микроклон Флора; 11 - сорт Жемчужина; 12 - микроклон Жемчужина; **M1** – маркеры размеров ДНК (100bp DNA Ladder, Fermentas); **M2** – маркеры размеров ДНК (1kb DNA Ladder, Fermentas).

При сравнении продуктов RAPD-PCR полученных клонов с продуктами RAPD-PCR исходных сортов различий не обнаружено, что может служить доказательством генетической идентичности полученных клонов и материнских сортов. Таким образом, разработанная система микроклонального размножения сирени может использоваться для получения генетически однородных побегов широкого спектра генотипов сирени.

Выводы

Проведенная работа позволила перевести исследования растений сирени на качественно новый уровень, систематизировать по ряду биохимических показателей. В результате проведенных исследований отработан метод выделения высокоочищенной геномной ДНК из листьев сирени, подобраны эффективные праймеры и оптимизированы условия проведения ПЦР, адаптирован метод RAPD-анализа для паспортизации сирени.

Изучение коллекции сирени ЦБС НАН Беларуси в рамках выполненных проектов позволила создать компьютерную базу данных, которая объединяет сведения по систематике, фенотипические признаки, геоботанические показатели, условия культивирования, биохимические характеристики, а также рекомендации по их использованию в различных отраслях народного хозяйства республики.

Литература

1. Сиволап Ю.М., Календарь М.Н., Чеботарь С.В. Генетический полиморфизм злаковых растений при помощи ПЦР с произвольными праймерами.- в: Цитология и генетика, – 1994, 28:54-61.
2. Doyle J.J., Doyle J.L. Isolation of plant DNA from plant tissue / Focus.— V.12.— 1990.— P. 13–15.

3. *Westermeyer R.* Electrophoresis in practice (Third Edition).–WILEY-VCH Verlag: Weinheim, 2001.– 349 p.
4. *Kim K.J., Jansen R.K.* A chloroplast DNA phylogeny of lilacs (*Syringa*, Oleaceae): plastom groups show a strong correlation with crossing groups // *Am. Bot.* 1998. V. 85. № 9. P. 1338-1351.
5. *Li J., Alexander J., Zhang D.* Paraphyletic *Syringa* (Oleaceae): evidence from sequences of nuclear ribosomal DNA ITS and ITS regions // *System. Botany J.* 2002. V. 27. №33. P.592-597.

Резюме

Найден быстрый и простой метод выделения ДНК из листовой ткани сирени, подобраны эффективные праймеры и оптимизированы условия проведения полимеразной цепной реакции. Адаптирован метод RAPD-анализа для популяционно-генетических исследований с составлением многолокусных RAPD-паспортов сирени. Подтверждена генетическая стабильность полученных микропоголов и материнских сортов.

The new milestone in selective-genetic investigation of syringa is to find molecular markers on DNA basis, which allow to carry out genotyping of cultivars of this culture. The rapid and easy method of DNA isolation from leaf tissue of syringa is found, effective primers are selected and the conditions for PCR are optimized. The method of RAPD analysis are adapted for population-genetic investigations and for syringa passportisation.

РЯБЧУН В.К.¹, КРИВОШЕЄВА О.В.¹, ВЕДМЕДЕВА К.В.²

¹ *Інститут рослинництва ім. В.Я. Юр'єва УААН,*

Національний центр генетичних ресурсів рослин України

² *Інститут олійних культур УААН*

61060, Харків, Московський проспект., 142, E-mail: ncpgru@kharkov.ukrtel.net

ФОРМУВАННЯ ТА ВЕДЕННЯ НАЦІОНАЛЬНОЇ БАЗОВОЇ КОЛЕКЦІЇ СОНЯШНИКУ В УКРАЇНІ

Наявність широкого генетичного різноманіття культури соняшнику і її диких родичів дозволяє ефективно вирішувати теоретичні і практичні питання створення нових більш досконалих сортів і гібридів. Ефективна селекційна робота базується на основі цілеспрямованого залучення нового вихідного матеріалу з визначеними донорськими властивостями.

Для довгострокового зберігання, забезпечення ефективного використання генетичного різноманіття соняшнику в селекційних, наукових, навчальних і інших програмах та обміну колекційними зразками із зарубіжними генбанками в Інституті рослинництва ім. В.Я. Юр'єва УААН та Інституті олійних культур УААН з 1992 року цілеспрямовано формується базова колекція цієї культури.

Основними напрямками роботи є пошук та інтродукція зразків, подальше їх вивчення за комплексом ознак та формування на цій основі ознакових колекцій, паспортизація зразків генофонду та створення інформаційної бази даних, зберігання зразків генофонду у життєздатному стані та генетичній стабільності, забезпечення селекційних та наукових установ, учбових закладів зразками та інформацією про генофонд культури.

Особлива увага має приділятися мобілізації та всебічному вивченню генетичних ресурсів з метою формування базової, ознакових, генетичних, спеціальних та інших колекцій.