

ювенильный материал по комплексу биохимических показателей до начала микрорепродуцирования, что позволяет ориентироваться не только на ростовую активность, отмечаемую визуально.

Литература

1. Бузун Г.А., Джемухадзе К.М., Милешко Л.Ф. Определение белка в растения с помощью амидо-черного // Физиол. раст.-1982.-Т.29.-В.-С.198-204.

2. Жесткова И.М., Молотковский Ю.Г. Регулирование фотосинтеза в интактных хлоропластах шпината и клетках эвглены кверцетином и бикарбонатом // Физиол. раст.- 1984.-Т.31.-В.2.-С.266-272.

3. Карначук Р.А., Венгеровская Е.И., Постовалова В.М., Ревина Т.А. Об активности фотосинтетического аппарата некоторых видов *Sedum L.*, адаптированных к свету разного качества // Физиол. раст.- 1981.-Т.28.-В.1.-С.66-72.

4. Полякова Л.В. Особливості мікрорепродуцирования сіяньців дуба звичайного (*Quercus robur L.*) *in vitro* залежно від показників вторинного обміну // Лісівництво і агролісомеліорація.-2006.-В.109.-С.236-243.

5. Ewald D., Naujoks G. Large scale testing of tissue culture of several adult larch clones and of factors influencing the growth behavior of adult oak clones and after transfer to soil // Cost Action 822.-2000.- P.333-336.

6. Haukioja E., Ossypov V., Koricheva J., Hankanen T., Larsson S., Lempa K. Biosynthetic origin of carbon-based secondary compounds: cause of variable responses of woody plants to fertilization? // J.Chemoecology.-1998.-N3.-P.133-139.

7. Julkunen-Tiitto R. Phenolic constituents in leaves of northern willows: methods for the analysis of certain phenolics // J.Agric.Food Chem.-1985.-V.33.-P.213-217.

8. Parker J. Phenolics in black oak bark and leaves // J.Chem.Ecol.-1977.-V.33.-N5.- P.871-880.

Резюме

Листья сеянцев дуба черешчатого анализировали на содержание некоторых групп веществ первичного и вторичного обмена. Из вторичных биохимических признаков определяли степень гликозилирования флавонолов. Определенное сочетание этого признака с уровнем содержания хлорофилла и белка позволяет оценить и дифференцировать сеянцы в плане их потенциальной продуктивности и устойчивости к мучнистой росе.

Листя сіяньців дуба звичайного аналізували на вміст деяких сполук первинного та вторинного обміну. Певне відношення такого показника, як ступінь гликозилування флавонолів, до вмісту хлорофілу і білка дозволяє оцінити і диференціювати сіяньці у плані їх потенційної продуктивності та стійкості до борошнистої роси.

Biochemical characters of oak seedlings for purpose of micropropagation *in vitro*. Some traits of first and second metabolites were analysed in oak (*Quercus robur L.*) seedlings leaves. Defined meaning of flavonol glucosylation grade and level of chlorophyll and protein is possible to use for estimation of potential properties of productivity and resistance to mildew (*Microspheera alphitoides*).

СОРОКА А.И.

Институт масличных культур УААН

Украина, 70417, г. Запорожье, ул. Весенняя 1, e-mail: oilseed@mail.zp.ua

ВЛИЯНИЕ ВОЗРАСТА ЗАРОДЫШЕЙ ПОДСОЛНЕЧНИКА ПРИ ИХ КУЛЬТИВИРОВАНИИ *IN VITRO* НА ЧАСТОТУ И НЕКОТОРЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ НИХ РАСТЕНИЙ

Подсолнечник как основная масличная культура Украины требует к себе

повышенного внимания, что обуславливает привлечение в селекционный процесс методов и приемов, облегчающих и ускоряющих создание его новых форм. Из целого ряда перспективных методов одним из наиболее доступных биотехнологических подходов является метод культуры незрелых зародышей. Этот биотехнологический прием на подсолнечнике используется в разных аспектах, например, для получения отдаленных гибридов, введения в культурные сорта желаемых признаков, а также для ускорения создания новых форм данной культуры [1-5].

Как показано для многих культур, возраст незрелых зародышей имеет существенное значение для сохранения их высокой жизнеспособности и получения из зародышей полноценных растений. Слишком молодые зародыши требуют питательной среды значительно более сложного состава, их сложно выделять из соцветий, они отстают в росте, характеризуются рядом морфологических изменений, легко образуют каллус, что зачастую нежелательно. Зародыши, взятые на очень поздних стадиях развития, труднее вводить в культуру, поскольку они сильнее повреждаются болезнями и вредителями в полевых условиях. В связи с вышеизложенным целью нашей работы было изучить влияние возраста незрелых зародышей подсолнечника на выход жизнеспособных растений, а также исследовать влияние эмбриокультуры на некоторые характеристики полученных растений.

Материалы и методы

В качестве материала для исследований использовали зародыши культурного подсолнечника *Helianthus annuus* L. трех гибридов, двух линий и сорта Прометей, предоставленных лабораторией селекции межлинейных гибридов подсолнечника Института масличных культур УААН (ИМК). После зацветания растений в полевых условиях их самоопыляли, а затем через 14 или 21 день (у гибридов 1812 x 1811, 1813 x 1811, 1814 x 1811) или 1-2 недели (у сорта) из корзинок выделяли незрелые зародыши и высаживали асептически на искусственную питательную среду. Питательная среда представляла собой модифицированную среду МС (Murashige, Skoog, 1962) со сниженным вдвое содержанием минеральных веществ и повышенным содержанием витаминов. Чашки с высаженным материалом культивировали в темноте 1 сутки, а затем при 16-часовом фотопериоде при температуре 20-25°C. После прорастания зародышей сформированные растеньица пересаживали в почву и анализировали количество прижившихся растений.

Для изучения влияния возраста зародышей при их доращивании *in vitro* на признаки полученных из них растений использовали выделенные через 8-10 дней (приблизительно 1 неделя) и 14-15 дней (около 2 недель) зародыши двух линий - ЗЛ-809 и ЗЛ-95, которые доращивали на той же питательной среде, что и в предыдущем случае. Полученные проростки высаживали в почву. После 2-х недельной акклиматизации их пересаживали в открытый грунт на опытном участке ИМК, где они и находились до созревания. Анализировали высоту растения, сроки зацветания и длительность вегетационного периода.

Результаты и обсуждение

Незрелые зародыши гибридов подсолнечника начинали рост на искусственной питательной среде через несколько дней культивирования *in vitro*. Так, зародыши гибридов с участием отцовской линии 1811 прорастали через 5-7 дней. Однако это происходило только у образцов, зародыши которых формировались в условиях *in vivo* 21 день. Лишь у образца 1814 x 1811 не отмечено развитие за этот период. Зародыши, выделенные через 14 дней после самоопыления, в течение этого периода еще не успевали образовать ни корней, ни побегов. Эти структуры появлялись лишь через 10-14 дней с частотой 15,8-25,0% в зависимости от генотипа. Через 14 дней культивирования незрелые зародыши возрастом 21 день формировали корни и побеги с частотой до 85,7%. После высадки полученных растений в сосуды с почвой их приживаемость (в целом по вариантам) составила около 58% для 14-дневных

зародышей и около 80% - для 21-дневных. В целом же можно констатировать, что нормальные растения подсолнечника возможно получать как из зародышей двух-, так и трехнедельного возраста.

Безусловно, возраст зародышей существенно влияет на эффективность получения из них растений, причем не только у гибридов, но и у сортового материала. Чем моложе зародыши, тем сложнее подобрать для них условия дальнейшего развития. Как видно на рисунке, из зародышей сорта Прометей 14-дневного возраста было получено 60,6% растений, а из 7-дневного - лишь 3,1%. Кроме того, ткани молодых зародышей значительно чаще дедифференцируются и образуют каллус. Это в конечном результате также снижает долю полученных из зародышей нормальных растений. Так, для сорта Прометей частота формирования каллуса у 7-дневных зародышей была более чем в два раза выше чем у 14-дневных (Рис.). У отдельных генотипов количество зародышей, которые образуют каллус, может достигать значительной величины и доходить до 70%.

Высокая частота каллусообразования, в свою очередь, негативно сказывалась на доли полученных из незрелых зародышей растений. Нормальные растения образовывались преимущественно из зародышей старшего возраста. И хотя из молодых растений также было получено определенное количество взрослых растений, однако их частота была низкой и для сорта Прометей не превышала в наших опытах 5%.

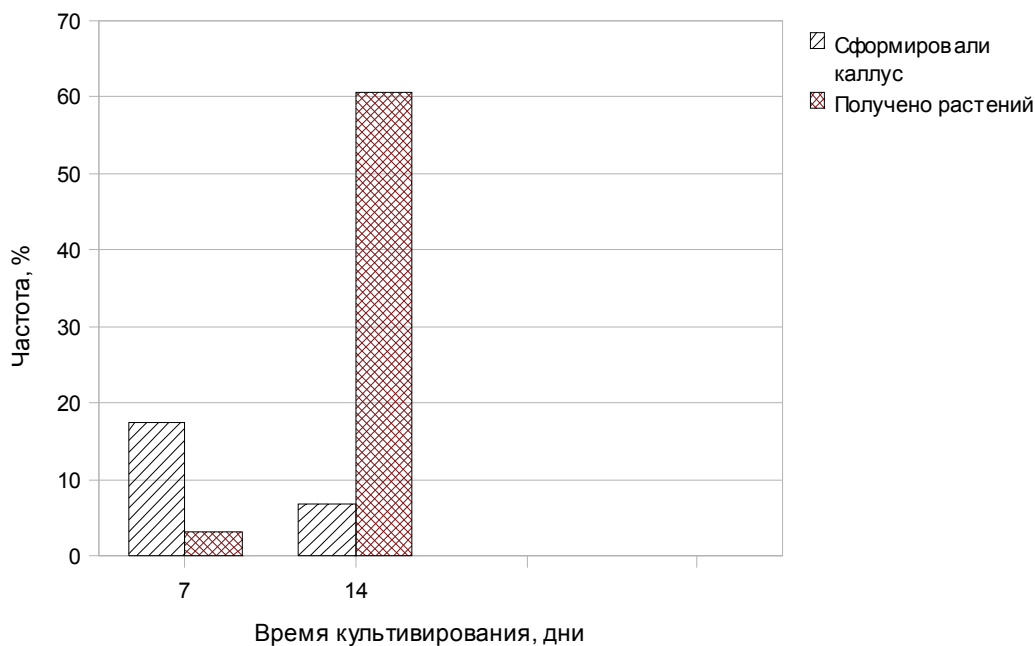


Рис. Эффективность культивирования зародышей разного возраста у сорта подсолнечника Прометей

При использовании метода эмбриокультуры важно знать характеристики растений, полученных из зародышей соответствующего возраста. В связи с этим мы изучали каким образом возраст зародышей подсолнечника влияет на отдельные характеристики продуктивности и состояние экспериментальных растений.

Как было установлено, возраст зародышей подсолнечника существенно повлиял на некоторые количественные характеристики полученных из них растений. Для обеих изученных линий характерным было то, что более молодые зародыши формировали и более низкие растения (Табл.). Вероятно, срок 8-9 дней *in vivo* недостаточен для того, чтобы генетическая программа, отвечающая за развитие вегетативных органов, в частности, признаков, обеспечивающих нормальную высоту изученных линий подсолнечника, полностью включилась в работу. Однако, сроки зацветания растений, полученных из зародышей разного возраста, практически не различались. Это говорит о

том, что сокращение времени развития вегетативной сферы растений приводило к удлинению периода развития генеративных органов (возможно, из-за недостаточного накопления необходимых ассимилятов на предыдущих фазах развития). Задержки в развитии вегетативной сферы при культивировании более молодых зародышей приводили и к удлинению вегетационного периода в целом. Правда, здесь сказались некоторые генотипические различия между линиями. Так, растения линии ЗЛ-809, в отличие от ЗЛ-95, имели одинаковую длину вегетационного периода, независимо от возраста использовавшихся зародышей.

Таблица

Влияние возраста зародышей на некоторые количественные характеристики полученных из них растений у двух линий подсолнечника

Признак	Линия ЗЛ-95		Линия ЗЛ-809	
	8-9 дн.	14-15 дн.	8-9 дн.	14-15 дн.
Высота, см	69,8±4,85	86,2±2,59**	44,3±1,68	55,8±2,58***
Сроки зацветания, дн.	76,5±1,32	75,7±0,84	67,7±0,96	66,4±0,53
Вегетационный период, дн.	127,5±1,74	118,9±1,73***	114,1±0,98	114,8±1,16

Прим. **, *** - различия между зародышами разного возраста существенны при $P < 0,01$ и $0,001$ соответственно.

Сравнивая высоту растений, полученных через культуру зародышей, с высотой растений тех же образцов, выращенных в полевых условиях, было установлено, что степень ингибирования признака «высота растений» при культивировании зародышей на искусственной питательной среде зависела от генотипа. Оказалось, что у линии ЗЛ-809 ингибирование было более сильным, чем у линии ЗЛ-95. Так, степень снижения высоты растений линии ЗЛ-809 для однонедельных зародышей составила 2,1 раза, а для линии ЗЛ-95 - 1,3 раза. Также различались между собой по высоте и растения, полученные из одно- и двухнедельных зародышей (Табл.). Растения, полученные из более развитых зародышей, были выше. Для линии ЗЛ-809 эта разница составила 11,5%, а для линии ЗЛ-95 - 16,4%.

Выводы

Зародыши подсолнечника как одно-, так двух- и трехнедельного возраста формируют в условиях *in vitro* растения, однако частота выхода растений выше при культивировании более зрелых зародышей.

Возраст зародышей влияет на такие признаки как высота растений и длина вегетационного периода. С уменьшением возраста зародышей высота растений уменьшается, а вегетационный период удлиняется.

Отмечены некоторые генотипические различия между образцами при культивировании зародышей разного возраста по признакам длина вегетационного периода и высота растений.

Литература

1. Пушкаренко А.Я. Культура *in vitro* незрелых гибридных зародышей подсолнечника // Сборник научных трудов ОСГИ / Одесса, 1992. - С. 31-38.
2. Bohorova N. In vitro plant development of seeds of *Helianthus* interspecific hybrids // CR Acad. Sci. Bulg., 1982. - V.35. - N1. - P.105-107.
3. Christov M., Shindrova P., Encheva V., et al. Development of fertility restorer lines originating from interspecific hybrids of genus *Helianthus* // *Helia*. - 1996. - 19, № 24. - С. 65-72.
4. Faure N., Serieys H., Cazaux E., Kaan F., Berville A. Partial Hybridization in Wide Crosses between Cultivated Sunflower and the Perennial *Helianthus* Species *H. mollis* and *H. orgyalis* // *Annals of Botany*. - 2002. - 89, № 1. - С. 31-39.
5. Krauter R., Steinmetz A., Friedt W. Efficient interspecific hybridization in the genus *Helianthus* via "embryo rescue" and characterization of the hybrids // *Theor. Appl. Genet.*, 1991. - V.82. - P.521-525.

6. *Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant., 1962. - V.15. - P.473-497.*

Резюме

Изучали влияние возраста незрелых зародышей подсолнечника при их доращивании *in vitro* на частоту образования и некоторые признаки полученных из зародышей растений. Установлено, что зародыши всех возрастов формируют в условиях *in vitro* растения, однако возраст зародышей влияет на такие признаки как высота растений и длина вегетационного периода.

Вивчали вплив віку незрілих зародків соняшника при їхньому дорощуванні *in vitro* на частоту утворення й деякі ознаки отриманих із зародків рослин. Встановлено, що зародки кожного віку формують в умовах *in vitro* рослини, однак вік зародків впливає на такі ознаки як висота рослин і довжина вегетаційного періоду.

Influence of age of sunflower immature embryos after *in vitro* germination and growth on the frequency of adult plant production and some traits of the plants raised from the embryos was studied. It was found that embryos of any age can produce plants under *in vitro* conditions, however, the age of embryos was influencing such traits as plant height and vegetative period length.

ТРЕТЬЯКОВА И.Н., ИВАНИЦКАЯ А.С., БАРСУКОВА А.В., ИЖБОЛДИНА М.В., НОСКОВА Н.Е.

Институт леса им. В.Н. Сукачева СО РАН

Россия, 660036, Красноярск, Академгородок, e-mail: culture@ksc.krasn//ru

БИОТЕХНОЛОГИИ ХВОЙНЫХ IN VITRO: ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ

На основании свойства тотипотентности клеток в биотехнологии микрклонального размножения хвойных появились два новых направления – соматический и микроспориальный эмбриогенез. Андроклиния *in vitro* – феномен перехода спорогенных клеток с гаметофитного пути развития, на спорофитный путь в культуре *in vitro*, представляет собой одно из перспективных направлений для получения гаплоидных и дигаплоидных растений-регенерантов в современных биотехнологических исследованиях. Это явление активно изучается у различных представителей покрытосеменных растений [Круглова, Горбунова, 1997, 2001; Круглова, Куксо, 2006] то время как у голосеменных растений подобные исследования редки и только начинаются [Иванова и др. 2006]. Соматический эмбриогенез - это асексуальный способ размножения, был открыт 20 лет назад у *Picea abies* [Hagman et al]. Полученные эмбриогенные клеточные линии сохраняют компетентность длительный период времени и позволяют получить генетически однородный селекционный материал улучшенных форм. Несмотря на активные исследования в области соматического эмбриогенеза у хвойных, регенерация растений данным способом все еще остается проблематичной для большинства видов. Критическим моментом является процесс созревания соматических зародышей, поскольку он влияет на жизнеспособность полученных *de novo* зародышей, и особенно на их способность прорасти и продуцировать нормальные растения-регенеранты.

Изучение соматического и микроспориального эмбриогенеза открывает большие перспективы в познании процесса клеточной дифференцировки и реализации морфогенетических программ в эмбриогенезе и раннем онтогенезе растительного