

Отже, доведено вплив форми заліза і його кількості у штучних живильних середовищах на вирощування ожини, малини і смородини. За часткою вітрифікованих рослин значну перевагу мало використання добрива *Ferrilene 4.8 Orto* – Orto порівняно з сірчаноокислим залізом + хелатним агентом.

УДК 633.11:631.523.085:581

БІОХІМІЧНА ОЦІНКА СОМАКЛОНАЛЬНИХ ВАРІАНТІВ ТРИТИКАЛЕ ОЗИМОГО З ПІДВИЩЕНОЮ СОЛЕСТІЙКІСТЮ

С.В. Пикало, С.І. Волощук

Миронівський інститут пшениці імені В.М. Ремесла НААН, Україна

e-mail: mwheats@ukr.net

Засолення є одним з важливих абіотичних чинників в обмеженні продуктивності рослин. Засоленими вважається 7–10% зрошуваних сільськогосподарських угідь в Україні. Хоча мінерали є необхідними для рослин, але надмірна їх кількість у ґрунті шкідлива для них. Рослини, що піддаються впливу засолення, страждають від надлишку іонів або дефіциту води і окислювального стресу, пов'язаного з утворенням активних форм кисню (АФК). Це спричиняє пошкодження ліпідів, білків і нуклеїнових кислот. Окислювальний стрес в умовах засолення вважають одним з основних уражуючих факторів у клітинах рослин. Ряд робіт присвячено вивченню реакції на сольовий стрес і толерантності на рівні рослин, а також у культурі тканин.

Відомо також, що у відповідь на стресор у тканинах рослини утворюються супероксиданіон (O_2^-), пероксид водню (H_2O_2) і гідроксильний радикал (OH^\cdot), з яких лише H_2O_2 відносно стабільний у розчині. У культурі клітин різних рослин спостерігали двофазне збільшення вмісту АФК у відповідь на стресовий чинник – через 1 і 4–5 год. після обробки. Перший пік вважають неспецифічним збільшенням вмісту АФК, а другий – специфічним.

Мета роботи – дослідити активність антиокислювальних ферментів після циклу прямої клітинної селекції у толерантних і нестійких соматоклональних ліній.

Використовували сорти тритикале озимого Обрій миронівський (відносно толерантний) та АДМ 4 (сприйнятливий). Калюсні культури отримували з двотижневих незрілих зародків розміром 1,0–1,7 мм на автоклавованому середовищі Мурашіга і Скуга (МС). Після 4 тижнів інкубації проводили субкультивування калюсів на свіже середовище, а ще через 4 тижні – на середовище з додаванням різних концентрацій NaCl (50, 100, і 150 мМ). Після цього калюси субкультивували на середовищі МС без NaCl протягом чотирьох тижнів. Для перевірки стабільності ознаки солестійкості калюсні лінії, які нормально росли на середовищі без NaCl, знову переносили на середовище МС з 150 мМ NaCl і пасажували протягом 4 тижнів. Калюсні лінії, що вижили і показали нормальний ріст на даному етапі, вважали NaCl-толерантними. Їх пересаджували на свіже середовище і додатково вирощували протягом чотирьох тижнів та використовували для біохімічних досліджень. Визначали сиру масу калюса, вміст білка, малонового діальдегіду та аскорбінової кислоти, а також активність таких ферментів, як супероксиддисмутаза (СОД), аскорбатпероксидаза (АПО) і каталаза (КАТ), за допомогою яких рослини захищають клітини і субклітинні системи від згубного впливу АФК. Вміст білка визначали методом Лоурі, перекисне окислення ліпідів – за вмістом малонового діальдегіду, використовуючи 0,5% розчин тіобарбітурової кислоти в 20% трихлороцтовій кислоті (спектрофотометрично при 532 нм з корекцією неспецифічного поглинання при 600 нм). Вміст аскорбату визначали з використанням реактиву Фоліна за поглинанням продукту при 730 нм, використовуючи за стандарт аскорбінову кислоту. Активність СОД визначали по інгібуванню автоокислення пірогалолу методом Маркланда спектрофотометрично при 429 нм і виражали її в од./мг білка (за одиницю приймається 50%

інгібування автоокислення пірогалолу). Активність АПО визначали за зменшенням поглинання при 290 нм, розраховуючи кількість аскорбату, окисленого до дегідроаскорбату. Активність КАТ визначали по розкладанню H_2O_2 і зниженню поглинання при 240 нм спектрофотометрично. Активність пероксидази визначали за допомогою пірогалолу за поглинанням продукту реакції (пурпурогаліну) при 420 нм.

Зі збільшенням стресового навантаження маса калюсів зменшувалася в обох групах калюсних ліній, однак у неселектованій – більшою мірою. Ступінь окислювального пошкодження (перекисне окислення) ліпідів визначали за кількістю маленового діальдегіду (МДА). Вміст МДА толерантних калюсів був меншим порівняно з неселектованими калюсними лініями (табл. 1).

Таблиця 1

Вплив NaCl на сирі масу і вміст МДА у селектованих і неселектованих калюсів тритикале озимого сорту Обрій Миронівський

Концентрація NaCl (мМ)	Сира маса калюса, мг		МДА (нМ/г сирі маси)	
	неселектовані	селектовані	неселектовані	селектовані
0 (Контроль)	578,0±0,67	580,0±0,45	54,0±0,75	52,6±0,13
50	506,6±0,34	565,3±0,83	74,0±0,75	71,6±0,13
100	447,6±0,97	540,0±0,56	89,0±0,86	78,3±0,21
150	249,3±0,53	314,6±0,36	113,6±0,54	89,0±0,43

Максимальний вміст білка відмічено в обох групах калюсних ліній при концентрації селективного агента 50 мМ. Вміст аскорбінової кислоти виявився максимальним при 50 мМ NaCl у групі неселектованих ліній і при 100 мМ – у групі селектованих, причому за дії стресора в більших концентраціях вміст аскорбату у селектованих ліній був майже удвічі вищим (табл. 2).

Таблиця 2

Вплив NaCl на вміст білка та аскорбінової кислоти у селектованих і неселектованих калюсів тритикале озимого сорту Обрій Миронівський

Концентрація NaCl (мМ)	Білок, мг/г сирі маси		Аскорбінова кислота, мг/г сирі маси	
	неселектовані	селектовані	неселектовані	селектовані
0 (Контроль)	21,6±0,43	25,2±0,66	18,5±0,43	21,7±0,46
50	27,2±0,87	39,01±0,58	19,7±0,36	25,5±0,48
100	20,21±0,56	24,01±0,79	16,1±0,81	39,4±0,54
150	16,41±0,32	18,24±0,68	13,2±0,42	25,1±0,26

Пероксид водню H_2O_2 є шкідливим побічним продуктом, який утворюється в результаті стресових умов. Щоб запобігти пошкодженню клітини, його необхідно швидко перетворити на менш небезпечні речовини, такі як газоподібний кисень і молекули води. Отже, каталаза відіграє важливу роль у зниженні пошкоджень, пов'язаних зі стресом. Припускають, що функція каталази у клітині – видалити основну частину H_2O_2 , тоді як пероксидаза залучена, головним чином, у розщепленні залишкового H_2O_2 , який не був розщеплений каталазою. Виявлено, що активність всіх чотирьох досліджених антиокислювальних ферментів збільшувалась під дією стресового фактора в обох групах ліній, однак це збільшення мало нелінійний характер з максимумом у неселектованих ліній при 50 мМ NaCl, у селектованих – 100 мМ (табл. 3).

Нами відзначено, що активність як каталази, так і пероксидази збільшилася в калюсах, толерантних до NaCl. З цього можна зробити висновок, що каталаза/пероксидаза, можливо, функціонували спільно, щоб оперативним чином видалити H_2O_2 при мінімальних затратах.

Тому як інший критерій добору генотипів, стійких до сольового стресу на рівні калюсних культур, було вибрано активність пероксидази. Для візуального визначення пероксидази перед посадкою на селективне середовище в чашки Петрі розкладали нейлонову сітку, на якій розміщували частину оцінюваного калюса. Через 4 год. культивування на

Вплив NaCl на активність антиокислювальних ферментів у селектованих і неселектованих калюсів тритикале озимого сорту Обрій Миронівський

Концентрація NaCl (мМ)	СОД (од./мг білка)		АПО (од./мг білка)		КАТ (од./мг білка)	
	неселектовані	селектовані	неселектовані	селектовані	неселектовані	селектовані
0 (Контроль)	41,0±0,76	42,6±0,34	0,89±0,23	0,87±0,67	24,32±0,57	23,94±0,44
50	44,8±0,45	50,5±0,56	1,42±0,12	2,44±0,56	21,01±0,71	27,58±0,48
100	38,4±0,36	75,8±0,65	0,74±0,34	2,85±0,67	15,32±0,64	41,74±0,54
150	31,4±0,65	50,6±0,48	0,56±0,56	1,97±0,56	11,64±0,46	28,18±0,26

селективному середовищі сітку як підкладку разом з калюсами перенесли на середовище МС з 500 мг/мл гваяколу. Чашки ставили в термостат на 3 год. при 24°C. Пероксидазна активність проявлялась у вигляді почервоніння калюсів. Використання прижиттєвого фарбування калюсів показало, що толерантні калюсні лінії фарбувались у 80–90% випадків, тоді як нестійкі – тільки у 10–20%.

З відібраних на селективному середовищі калюсних ліній отримано рослини-регенеранти. При цьому слід зазначити, що з сорту Обрій Миронівський регенеранти отримано після двох циклів селекції на середовищі зі 150 мМ NaCl, тоді як для сорту АДМ 4 – тільки після одного.

Таким чином, на основі отриманих даних можна припустити, що толерантність калюсних ліній до підвищених концентрацій (150 мМ) NaCl забезпечується за рахунок підтримки цілісності мембран і підвищених рівнів антиоксидантної активності.

УДК 633.11:631.523.085:581.143.6:631.524.86.01

СТВОРЕННЯ ВИХІДНОГО МАТЕРІАЛУ ДЛЯ СЕЛЕКЦІЇ ТРИТИКАЛЕ ГЕКСАПЛОЇДНОГО З ВИКОРИСТАННЯМ МЕТОДІВ БІОТЕХНОЛОГІЇ

М.В. Харченко, С.І. Волощук

Миронівський інститут пшениці імені В.М. Ремесла НААН, Україна

e-mail: mwheats@ukr.net

Первинні тритикале, або пшенично-житні амфідиплоїди, що отримані від схрещування пшениці твердої з житом, відіграють важливу роль у селекції сортів з високим адаптивним потенціалом. Проте отримані гібридні зернівки мають низьку життєздатність, а селекційне використання обмежене низькою фертильністю, обумовленою цитологічною нестабільністю мейозу в материнських клітинах пилку. Тому актуальною є розробка і застосування методів, які підвищують ефективність отримання та цитогенетичну стабільність первинних тритикале, що прискорює селекційний процес.

Синтез гібридних популяцій для отримання первинних тритикале зазвичай проводять шляхом схрещування твердих пшениць та жита з подальшим застосуванням культури зародків і колхіцинування; схрещування озимих м'яких пшениць та жита з подальшим запиленням пшенично-житних гібридів F₁ гексаплоїдними тритикале або F₁ міжсортних гібридів гексаплоїдних тритикале; схрещування 42-хромосомних тритикале з м'якою пшеницею з подальшим бекросом гексаплоїдними тритикале або пилком F₁ міжсортних гібридів тритикале; схрещування 42-хромосомних тритикале з м'якою пшеницею з подальшим бекросом гексаплоїдною пшеницею. Основною проблемою отримання інтрогресивних форм є несумісність віддалених видів. Розв'язанню цих проблем сприяють нетрадиційні технології *in vitro*, що відкривають широкі перспективи гібридизації між таксономічно віддаленими видами.