

19. Harabin Z. Przydatnosc zrzesow do biologicznego zagospodarowania zwalow gornictwa wegla kamiennego / Z Harabin, Z. Strzyszcz // Sylwan, – 1975. – R. 119. – № 9. – S. 73–79.

*Показано, что на песчаных литозёмах взаимодействие между ольхой и сосной в сомкнутых древостоях зависит от содержания в них илистых фракций, глубины залегания почвенных вод, особенностей микрорельефа и использованных схем смешения древесных пород.*

***Песок, ольха чёрная, сосна обыкновенная, древесная растительность, древостой, лесные культуры.***

*It is shown that on the sand soils interaction between an alder and pine in closed stands depends on maintenance in them silty factions, depth of bedding of soil waters, features of micro relief and used charts of mixing of arboreal breeds.*

***Sand, alder black, pine-tree usual, arboreal vegetation, stand, plantations.***

УДК 57.085.2:001.8:582.671

## **ISSR-АНАЛІЗ ГЕНЕТИЧНОЇ ОДНОРІДНОСТІ РОСЛИН-РЕГЕНЕРАНТІВ МАГНОЛІЇ КОБУС (*MAGNOLIA KOBUS* DC.)**

***О.В. Дубін, кандидат сільськогосподарських наук  
І.М. Бобошко-Бардин, кандидат сільськогосподарських наук***

*Досліджено генетичну однорідність рослин-регенерантів магнолії кобус (*Magnolia kobus* DC.) за використання п'яти ISSR-праймерів (ACC)6G, (CTC)6A, (AGC)6G, (TCG)6G, (GTG)6A і (GAG)6G. Підтверджено ідентичність між рослинами-донорами, експлантами та адаптованими саджанцями-регенерантами. Доведено високу генетичну стабільність геномів магнолії кобус за мікроклонального розмноження її в умовах *in vitro*.*

***Мікроклональне розмноження, рослина-донор, рослина-регенерант, соматоклональна мінливість, ПЛР, ISSR-PCR маркер, геном.***

Культура тканин є унікальною експериментально створеною біологічною системою, що являє собою популяцію дедиференційованих соматичних клітин, здатних регенерувати різні органи і навіть цілісну систему [2, 4, 5]. Її широко використовують у дослідженнях з організації та функціонування геному у процесі регенерації, адаптації до стресових умов росту, при збереженні, оздоровленні та швидкому розмноженні цінних генотипів.

На хромосомному рівні дослідження соматклональної мінливості проводять вже досить тривалий час.

Висока генетична мінливість деревних рослин зумовлює значний поліморфізм рослин одного виду за їх декоративністю, енергією росту та іншими ознаками. Кількісні та якісні мутації, цитологічні порушення, зміни послідовності ДНК, активація і припинення експресії генів проявляються в клітинах, тканинах та органах рослин в культурі *in vitro*, а також у рослин-регенерантів [6]. Для селекції така мінливість має практичне значення, оскільки саме вона є джерелом генетичного різноманіття, яке використовується для надання рослинам бажаних ознак (підвищення декоративності, зміни часу цвітіння, стійкості до хвороб та шкідників, гербіцидів, соле-, морозо- та посухостійкості, стійкості до інших абіотичних стресів [9].

Нині для вирішення низки теоретичних та практичних завдань особливу увагу приділяють молекулярно-генетичним методам досліджень. У селекційній роботі з декоративними деревними рослинами активно впроваджуються дослідження із застосуванням молекулярно-генетичних маркерів [1, 3, 6, 8]. Використання новітніх методів досліджень і ДНК-технологій відкривають нові можливості у генетиці та селекції декоративних рослин і дозволять суттєво поглибити вивчення генетичної структури популяцій декоративних деревних рослин.

З великої кількості молекулярно-генетичних методів широкого вжитку набули ті, що базуються на полімеразній ланцюговій реакції (ПЛР). Одним із напрямів ПЛР, які не потребують знання первинної структури ДНК, є ампліфікація міжмікросателітних послідовностей (ISSR-PCR). Цей тип маркерів виявився не тільки зручним та інформативним, а й надійним інструментом для визначення генетичної мінливості як окремих особин, так і різних таксономічних одиниць.

**Мета дослідження** – тестування генетичної однорідності рослин-донорів магнолії кобус (*Magnolia kobus* DC.) та особин, отриманих в умовах асептичної культури *in vitro*, за використання ампліфікації міжмікросателітних послідовностей.

**Матеріали та методика дослідження.** Матеріалом для проведення досліджень були: листки донорських дерев магнолії кобус (*Magnolia kobus* DC.) з НБС ім. М.М. Гришка НАН України; асептична культура, отримана шляхом мікроклонального розмноження і рослини-регенеранти, одержані шляхом прямого морфогенезу та адаптовані до умов *in vivo*.

Геномну ДНК виділяли з листових дисків рослин за використання СТАВ-методу [7]. Полімеразно-ланцюгову реакцію проводили на ампліфікаторі Терцик (ДНК-технологія, Росія [7]) за таким температурним режимом: початкова денатурація тривала – 4 хв. за 94 °С; 32 цикли: 30 с за 94 °С, 30 с за 58 °С, 2 хв. за 72 °С; термінальна елонгація – 5 хв. за 72 °С;

Реакційна суміш об'ємом 20 мкл містила: 67 мМ Tris-HCl (pH 8,8), 17 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,01 % Tween-20, 0,2 мМ dNTP, 1 од. Таг-полімерази, 40 нг геномної ДНК, 2,0 мМ MgCl<sub>2</sub> та 0,4мкМ праймера. У роботі було використано 12 ISSR-праймерів з тринуклеотидними коровими послідовностями та одним якірним нуклеотидом на 3'-кінці (див. таблицю).

### Нуклеотидні послідовності використаних у роботі ISSR-праймерів

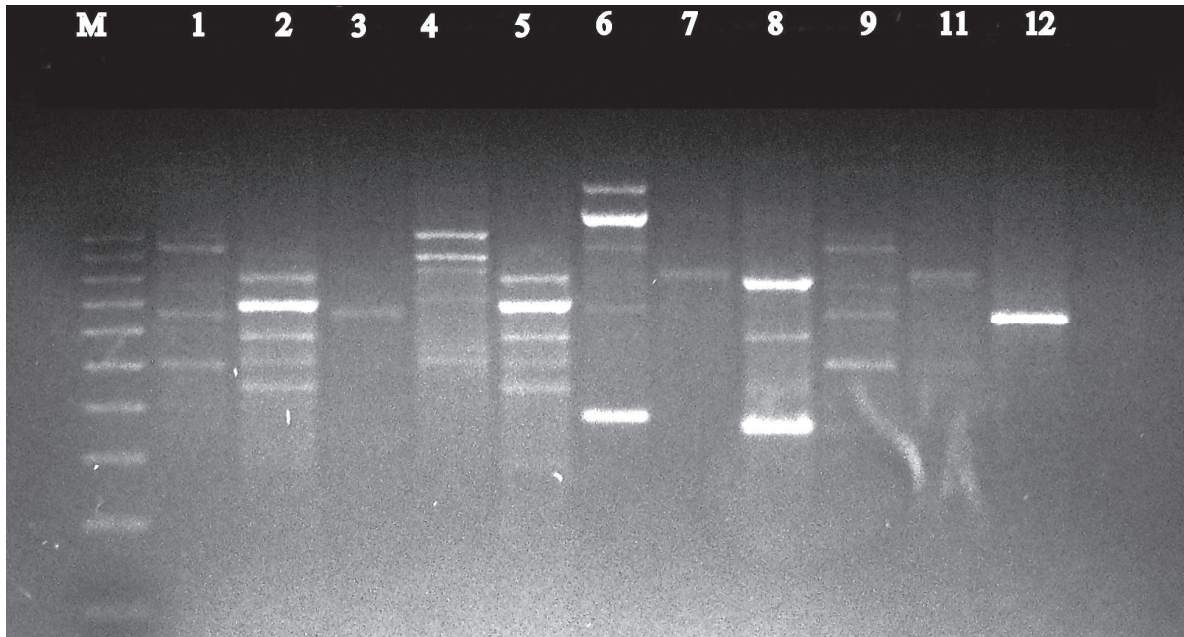
№	Праймер	Нуклеотидна послідовність, 5→3
1	(ACC)6G	ACC ACC ACC ACC ACC ACC G
2	(CTC)6A	CTC CTC CTC CTC CTC CTC A
3	(TCG)6G	TCG TCG TCG TCG TCG TCG G
4	(AGC)6G	AGC AGC AGC AGC AGC AGC G
5	(TCG)6G	TCG TCG TCG TCG TCG TCG G
6	(GTG)6A	GTG GTG GTG GTG GTG GTG A
7	(CTC)6C	CTC CTC CTC CTC CTC CTC C
8	(GAG)6G	GAG GAG GAG GAG GAG GAG G
9	(ACC)6G	ACC ACC ACC ACC ACC ACC G
10	(AGC)6C	AGC AGC AGC AGC AGC AGC C
11	(GCT)6A	GCT GCT GCT GCT GCT GCT A
12	(CCA)6G	CCA CCA CCA CCA CCA CCA G

Електрофоретичне розділення продуктів ампліфікації проводили у 2 %-му агарозному гелі за використання 1×TBE-буфера. Після закінчення електрофорезу гель обробляли бромистим етидієм (5 мкг/мл) та фотографували ПЛР-продукти за допомогою цифрового фотоапарата. Молекулярну масу ПЛР-продуктів визначали за маркером GeneRuler 100 bp (Fermentas).

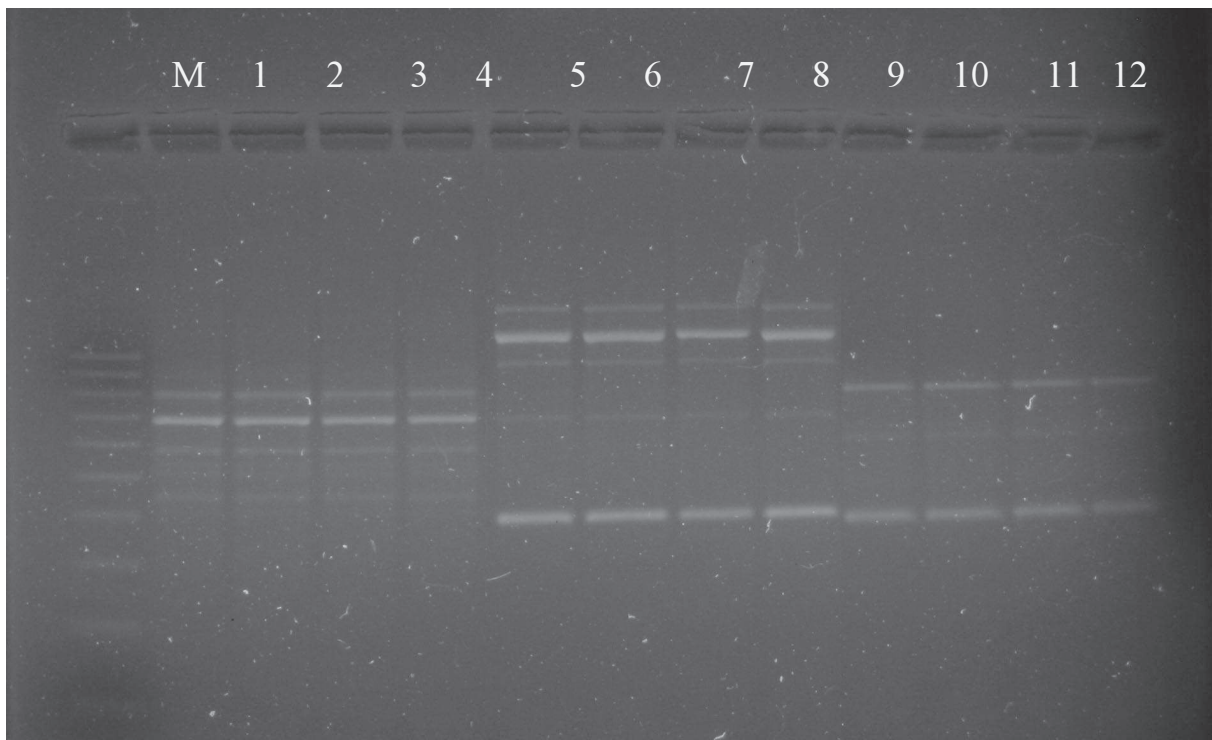
**Результати дослідження.** З метою виявлення інформативних молекулярно-генетичних маркерів, які б дали змогу проводити аналіз змін геному магнолії за умов мікроклонального розмноження в асептичній культурі, на першому етапі роботи ми провели скринінг 12 ISSR-праймерів з тринуклеотидними коровими послідовностями (рис. 1). За картиною ампліфікації використаних праймерів, отримані початкові спектри мали такі характеристики: відсутність продуктів ампліфікації ((CCA)6G); дифузні спектри без чітких дискретних смуг ((TCG)6G, (CTC)6C і (AGC)6C); спектри з недостатньою для подальшого аналізу кількістю ампліконів ((AGC)6G і (GCT)6A) та спектри з чіткими ПЛР-продуктами ((ACC)6G, (CTC)6A, (AGC)6G, (TCG)6G, (GTG)6A і (GAG)6G).

Оптимізація умов проведення полімеразно-ланцюгової реакції у перших трьох випадках (зміна концентрації реagentів реакційної суміші та варіювання температури відпалу праймерів) не приводила до значного покращення спектрів. Тому тестування генетичної однорідності рослин магнолії здійснювали за використання праймерів з нуклеотидними послідовностями: (ACC)6G, (CTC)6A, (AGC)6G, (TCG)6G, (GTG)6A і (GAG)6G.

Молекулярно-генетичний аналіз культури тканин, органів і адаптованих саджанців-регенерантів *M. kobus* за використання методу ISSR-PCR з праймерами (ACC)6G, (CTC)6A, (AGC)6G, (TCG)6G, (GTG)6A і (GAG)6G показав абсолютну ідентичність між відповідними рослинами-донорами, експлантами та адаптованими саджанцями-регенерантами (рис. 2).



**Рис. 1. Спектри ампліфікації продуктів ISSR-PCR на етапі початкового скринінгу праймерів:**  
 М – маркер молекулярної маси; 1–12 – тестовані праймери



**Рис. 2. Електрофоретичне розділення продуктів ампліфікації ISSR-PCR з праймерами (TCG)6G, (GTG)6A та (GAG)6G:**  
 1, 5, 9 – донорська рослина; 2, 6, 10 – рослина-регенерант; 3, 4, 7, 8, 11, 12 – адаптований саджанець-регенерант; М – маркер молекулярної маси (GeneRuler 1kb DNA Ladder, GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Fermentas))

**Висновок.** Отримані результати свідчать про відносну генетичну стабільність геномів магнолії кобус за мікроклонального розмноження її в

умовах *in vitro* та дають підстави для використання отриманих культур тканин і органів з метою збереження генофонду даного виду та його декоративних форм, отримання великої кількості посадкового матеріалу з бажаними ознаками та властивостями.

### Список літератури

1. Использование молекулярно-генетического метода на основе ПЦР для формоспецифичного анализа дуба (*Quercus robur*) / [Карпеченко К.А., Семенова В.А., Землянухина О.А., Карпеченко Н.А.] [Электронный ресурс] / Режим доступа до сайту : <http://conf.nsc.ru/cfgrs2011/reportview/54100>
2. Кунах В. А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. — К. : Логос, 2005. — 724 с.
3. Молекулярно-генетические исследования плюсовых деревьев сосны обыкновенной / [Милютин Т.Н., Новиков П.С., Шейкина О.В.] [Электронный ресурс] / Режим доступа до сайту : <http://botanicblog.ru/public/biotech-2010/stat405>
4. Сельскохозяйственная біотехнологія учеб. / [В. С. Шевелуха, Е. А. Калашникова, С. В. Дегтярев и др.] ; под ред. В. С. Шевелухи. — М. : Высш. школа, 1998. — 416 с.
5. Сидоров В.А. Биотехнология растений. Клеточная селекция. — К. : Наук. думка, 1990. — 279 с.
6. Kaeppler S. M., Kaeppler H.F., Rhee Y. Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants // *Plant Molec. Biol.* — 2000. — Т. 43. — Р. 179–188.
7. Sambrook J. *Molecular Cloning: Laboratory Manual* / J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis. — N.Y. : Cold Spring Harbor Univ. Press, 1989. — 1626 p.
8. Tremblay L., Levasseur C., Tremblay F.M. Frequency of somaclonal variation in plants of black spruce (*Picea mariana*, Pinaceae) and white spruce *P. glauca*, Pinaceae) derived from somatic embryogenesis and identification of some factors involved in genetic instability // *Am. J. Bot.* — 1999. — Vol. 86, №10. — P. 1373–1381.
9. Veilleux R.E., Johnson A.T. Somaclonal variation: molecular analysis, transformation interaction, and utilization // *Plant Breeding Reviews.* — 1998. — Vol. 16. — P. 229–268., Duncan R.R. Tissue culture-induced variation and crop improvement // *Adv. Agron.* — 1997. — Vol. 58. — P. 201–240.

*Исследована генетическая однородность растений-регенерантов магнолии кобус (*Magnolia kobus* DC.) с использованием пяти ISSR -праймеров (ACC)6G, (CTC)6A, (AGC)6G, (TCG)6G, (GTG)6A и (GAG)6G. Подтверждена идентичность между растениями-донорами, експлантами и адаптированными саженцами-регенерантами. Доказана высокая генетическая стабильность геномов магнолии кобус с использованием микроклонального размножения ее в условиях *in vitro*.*

***Микроклональное размножение, растение-донор, растение-регенерант, соматоклональная изменчивость, полимеразная цепная реакция (ПЦР), ISSR- PCR маркер, геном.***

*Investigated genetic homogeneity of plants regenerants of magnolia kobus (*Magnolia kobus* DC.) with using of five ISSR markers (ACC)6G, (CTC)6A, (AGC)6G, (TCG)6G, (GTG)6A and (GAG)6G. An identity is confirmed between plants-donors, eksplants and by the adapted transplants*

*regenerants. High genetic stability of genomes magnolia kobus is well-proven by micropropagation in the in vitro conditions.*

***Mikropropagation, plant-donor, plant-regenerant, somaklonala changeability, polymerase chain reaction (PCR), ISSR- PCR marker, genome.***

УДК 630\*232

## **ВПЛИВ ДЕФОРМУВАННЯ КРОНИ НА РІСТ САДЖАНЦІВ СОСНИ ЗВИЧАЙНОЇ В КУЛЬТУРАХ ПРИМІСЬКОЇ ЗОНИ КИЄВА**

***I.В. Іванюк, кандидат сільськогосподарських наук***

*Розглянуто вплив деформування крони на ріст саджанців сосни звичайної в молодих культурах приміських лісів зеленої зони, наведено динаміку росту в перші роки після деформації крон.*

***Лісові культури, сосна звичайна, деформація крони, приміські ліси, зелена зона.***

Однією з проблем, яку щорічно вирішують лісівники в передноворічні свята, є боротьба з самовільним вирубуванням саджанців сосни і ялини на новорічні ялинки з молодих культур та різновікових насаджень. Захист насаджень цих порід культур силами лісової охорони не завжди достатньо ефективний. Використання побілки крон розчином вапна, обробка саджанців відходами паливо-мастильних матеріалів, також не забезпечують їх цілковитого збереження. Розв'язанню цієї проблеми сприяє деформування крони саджанців шляхом видалення бічних бруньок та обрізування гілок. Вивченням питань впливу видалення бруньок та обрізування гілок у саджанців хвойних, що зростають у культурах, в різний час займалися П. Г. Кроткевич [2], В. П. Тимофеев [3], П. П. Ізюмський [1] та інші науковці-лісівники.

У приміських лісах, головна мета деформування крони у саджанців сосни звичайної полягає у наданні їй форми, непридатної для новорічних ялинок. Особливо це стосується саджанців, які зростають поблизу доріг та населених пунктів. Унаслідок обрізання гілок покращується доступ опадів до ґрунту, збільшується його освітленість та прогрівання, інтенсифікується діяльність ґрунтових мікробоценозів та поліпшується якість стовбурної деревини.

**Мета дослідження** – встановлення впливу деформування крони на ріст саджанців сосни звичайної в молодих культурах приміських лісів зеленої зони Києва.

**Матеріали та методика дослідження.** Об'єктом дослідження були саджанці сосни звичайної (*Pinus sylvestris* L.) які зростали в приміських