

the point of emission ammonia concentration decreases in the air: 20 m – 2,5 (in summer) and 1,5 times (in winter), 100 m – 27 and 25 times respectively. The annual average actual concentration of ammonia exceeds the maximum allowable concentration in 26 times (the distance from the point of emission – 100 m) and hydrogen sulfide concentration – in 11 times.

Conclusions. The results of our researches show that the level of air pollution in the zone of a livestock complex is high on indicators of concentrations of harmful gases – ammonia and hydrogen sulfide. It is dangerous for the health of people living in the area and for the environment in general (acidification, eutrophication and disturbance of the natural balance of ecosystems).

Keywords: environmental assessment, atmospheric air, livestock complex, ammonia, hydrogen sulfide.

УДК 631.52.001.73:633.85

АПРОБАЦІЯ АГРОБАКТЕРІАЛЬНОЇ ТРАНСФОРМАЦІЇ СОНЯШНИКА МЕТОДОМ *IN PLANTA*

С. В. Богульська

Уманський національний університет садівництва

Досліджено ефективність трансформації форм соняшника методом *in planta*. Використовували штам *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404, плазмиду, яка містить *bar*-ген, що визначає стійкість до гербіциду із діючою речовиною фосфінотріцин – Баста. Відбір фосфінотріцин-резистентних форм T_0 проведено по сходах соняшника, у фазі розвитку 4–6 пар справжніх листків, шляхом обприскування гербіцидом.

Ключові слова: ріпак ярий, агробактерії, трансформація, метод *in planta*, фосфінотріцин.

Соняшник – основна олійна культура України. Насіння його районованих сортів і гібридів містить 50 – 52% олії, а селекційних – 60%. Порівняно з іншими олійними культурами соняшник забезпечує найбільший вихід олії з одиниці площі (750 кг/га в середньому по Україні).

Проте висока забур'яненість посівів та засміченість ґрунтів насінням і зачатками бур'янів створюють гостру конкуренцію рослинам соняшника, призводять до значних втрат поживних речовин і вологи, затінення й пригнічення їх, і врешті-решт – до зниження врожайності гібридів та сортів соняшника [2]. Використання гербіцидів суцільної дії є високоефективним методом боротьби із дводольними, однодольними, одно- та багаторічними бур'янами [3].

Для створення рослин стійких до гербіцидів усе більше уваги приділяють методам трансформації, що дозволяють запобігти довготривалим маніпуляціям з рослинами реципієнтами. Сьогодні можливо отримати трансгенні рослини без будь-яких процедур *in vitro*. За використання природної системи трансформації рослин Ті-плазмідами (від англ. *tumor inducing*) ґрунтових агробактерій (*Agrobacterium tumefaciens*), завдяки яким можна вводити чужорідні гени та порівняно великі генні конструкції в геном дводольних та деяких однодольних рослин [1]. Для цього використовують метод, який називається *in planta* і запропонований Bechtold зі співавт. у 1993 році [5].

Метою дослідження була апробація агробактеріальної трансформації соняшника методом *in planta*.

Методи дослідження. Дослідження проводилися на кафедрі генетики, селекції рослин та біотехнології Уманського національного університету садівництва протягом 2011 – 2013 років у два етапи: лабораторний та польовий.

Об'єктом досліджень слугували стерильні батьківські форми гібридів соняшника Український F₁, Український скоростиглий, Українське сонечко, які внесені до Державного Реєстру України. Для агробактеріальної трансформації рослин з двостатевими квітами використали стерильні форми, це дало можливість синхронізувати процес запліднення і вбудування Т-ДНК в геном рослин шляхом ізоляції цих форм і наступного запилення.

Для трансформації використовували ґрунтові бактерії (*Agrobacterium tumefaciens*) штаму LBA4404, що несе бінарну векторну конструкцію з неонкогенною ділянкою Т-ДНК, яка має цільовий ген *bar* – стійкості до гербіциду Баста та селективні гени стійкості до антибіотиків.

У лабораторії нарощували агробактерії на живильному середовищі LB (Лурія-Бертані), додавали антибіотики 50 мг/л канаміцину, 50 мг/л рифампіцину, 25мг/л гентоміцину. Культивування бактерій проводили на шейкері (150 – 200 об/хв) в темноті при температурі 28 °С протягом доби. Після нарощування бактерій додавали сахарозу та поверхнево-активну речовину *Silwet L-77* [4].

У польових умовах (*in planta*) кошики ізолювали бязевими ізоляторами до розкриття квітів. Коли розкрилися 3 – 4 рядки квіток соняшник штучно запилювали, чистою тканиною знімали пилок з фертильних рослин і переносили на стерильні. Стерильні рослини, які знаходилися близько до фертильних для потрапляння на них пилку, притискали кошиками один до одного. Через 1,5 години (час проростання пилкової трубки соняшника) шляхом занурення кошиків у суспензію з агробактеріями проводили інокуляцію протягом 1хв. Кошики залишали на 24 години в умовах підвищеної вологості і після цього накривали бязевими ізоляторами для досягання насіння.

Результати дослідження. Агробактеріальною суспензією було оброблено: 25 рослин стерильної форми гібриду Український F₁, 20 рослин стерильної форми гібриду Українське сонечко та 23 рослини стерильної форми гібриду Український скоростиглий. Отримане насіння висівали на дослідних ділянках згідно з строками посіву даної культури. У фазі 4 – 6 справжніх листків соняшник обприскували гербіцидом Баста 7мл/л (таб.1).

1. Частота трансформації T₀ соняшника отриманих методом *in planta*, 2012 р.

Гібриди соняшника	Загальне	Кількість білих	Кількість	Частота
	число сходів	рослин	зелених рослин	трансформації
	шт.	шт.	шт.	%
Український F ₁	956	947	9	0,4*±0,02**
Українське сонечко	523	518	5	1,1*±0,14**
Український скоростиглий	754	750	4	0,6*±0,3**

Примітка * – достовірно за використання коефіцієнта Стьюдента (p = 0,05), ** – ± стандартна похибка.

Кількість рослин до обробітку гербіцидом становила: стерильна форма батьківська гібриду Український F₁ – 956 рослин, стерильна батьківська форма гібриду Українське сонечко – 523 рослини та стерильна батьківська форма гібриду

Український скоростиглий – 754 рослини.

Після обприскування гербіцидом на четвертий день більшість рослин стали «білими» і загинули. В результаті загинуло: 947 рослин стерильної батьківської форми гібриду Український F₁, 518 рослин стерильної батьківської форми гібриду Українське сонечко та 750 рослин стерильної батьківської форми гібриду Український скоростиглий – не стійкі до дії гербіциду. Рослини соняшника T₀, які вижили після дії гербіциду мали зелене забарвлення та подовжували формувати вегетативні органи згідно з фазами онтогенезу. Усього вижили: Український F₁ – дев'ять рослин, Українське сонечко – п'ять рослин та Український скоростиглий – чотири рослини. Частота трансформації склала: стерильна форма гібриду Український F₁ – 0,4%, стерильна форма гібриду Українське сонечко – 1,1%, стерильна форма гібриду Українське скоростиглий – 0,6% відповідно.

Для встановлення факту успадкування гена *bar* (що визначає стійкість до гербіциду із діючою речовиною фосфінотріцин) в наступному поколінні, стерильні стійкі форми запилювали не стійким до дії гербіциду закріплювачем стерильності (таб.2).

2. Успадкування фосфінотріцин-резистентності T₁ соняшника, 2013 р.

Гібриди соняшника	Всього рослин						Но*	χ^2
	до обробітку		загинуло		резистентних			
	шт.	%	шт.	%	шт.	%		
Український F ₁	141	100	62	44,0	79	56,0	1:1	2,0496
Українське сонечко	122	100	54	44,3	68	55,7	1:1	1,6066
Український скоростиглий	138	100	74	53,6	64	46,4	1:1	0,7246

Примітка. 1. Но* – теоретично очікуване співвідношення між нестійкими та толерантними рослинами. 2. Максимально допустиме значення $\chi^2_{05} = 3,84$; $\chi^2_{01} = 6,63$.

Отримано сходи соняшника до обробітку гербіцидом у такій кількості: Український F₁ – 141 шт., Українське сонечко – 122 шт., Український скоростиглий – 138 шт., які взяті за 100%. Відбір рослин соняшника за фенотипом проведено шляхом обприскування гербіцидом. В наслідок дії гербіциду загинуло: 62 шт, що становить 44,3% рослин стерильної батьківської форми гібрида Український F₁, 54 шт, що становить 44,0% рослини стерильної батьківської форми гібрида Українське сонечко та 74 шт, що становить 53,6% рослини стерильної батьківської форми гібрида Український скоростиглий. Отримано резистентних рослин: Український F₁ – 79 шт, що становить 55,7%, Українське сонечко – 68шт, що становить 56,0% та Український скоростиглий – 64 шт, що становить 46,4% відповідно. Таким чином, отримали резистентні до гербіциду стерильні форми T₁ соняшника.

У особин виявили відносно рівне співвідношення між кількістю нестійких і стійких до гербіциду нащадків. Це свідчить про експресію вбудованого гену *bar* та гетерозиготність вихідних трансгенних матеріалів за домінантним трансгеном. Відповідно із генетичними закономірностями у стерильних форм T₁ між рослинами що загинули і стійкими, співвідношення становить 1:1.

Рослини соняшника з перенесеними генами стійкості фенотипово не відрізнялися від звичайних рослин (не трансгенних). Можна припустити, що введена в геном рослин конструкція *bar* не впливає на експресію функціональних та структурних генів рослин.

Висновки. В результаті апробації агробактеріальної трансформації соняшника методом *in planta* отримано: дев'ять стійких до гербіциду рослини стерильної батьківської форми гібриду Український F₁, п'ять рослин стерильної батьківської форми гібриду Українське сонечко та чотири рослини стерильної батьківської форми гібрида Український скоростиглий.

Частота трансформації склала: Український F₁ – 0,4%, стерильна форма гібриду Українське сонечко – 1,1%, стерильна форма гібриду Українське скоростиглий – 0,6% відповідно.

Після запилення отриманих форм, у поколінні соняшника T₁ відбулося розчеплення 1:1 між не стійкими і стійкими рослинами, що вказує на експресію вбудованого гену стійкості та гетерозиготність вихідних матеріалів за домінантним трансгеном.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Викторэк-Смагур А. Сравнение двух методов трансформации *Arabidopsis thaliana*: погружение цветочных почек и вакуумная инфильтрация / А. Викторэк-Смагур, К. Хнатушко-Конка, А. К. Кононович // Физиология растений. – 2009. – Т. 56. – № 4. – С. 619 – 628.
2. Бур'яни в землеробстві України: прикладна гербологія / [І.Д. Примак, Ю.П. Манько, С.П. Танчик та ін.]. — Біла Церква, 2005. — 664 с.
3. З.Клайв Джеймс. Світовий стан комерціалізованих біотехнологічних генетично модифікованих культур: 2000 – 2010 рік: [Електронний ресурс]. — Режим доступу: <http://www.isaaa.org> // Міжнародна служба з впровадження агробіотехнологічних розробок (ISAAA).
4. Чумаков М. И. Агробактериальная трансформация неповрежденных растений / М. И. Чумаков, И. В. Курбанова, Г. К. Соловова // Физиология растений. – 2002. – Т. 49. – №6. – С. 898 – 903.
5. Bechtold D. In Planta Agrobacterium Mediated Gene Transfer by Infiltration of Adult *Arabidopsis thaliana* Plants / D. Bechtold, J. Ellis, G. Pelletier // R. Acad. Sci., Life Sci. – 1993. – V. 316. – P. 1194 – 1199.

Одержано 18.03.2014

Аннотація

С. В. Богульская

Апробация агробактериальной трансформации подсолнуха методом *in planta*

Исследовали эффективность агробактериальной трансформации растений подсолнечника методом *in planta*, с применением штамма *Agrobacterium tumefaciens* LVA4404, содержащим бинарный вектор, а также *bar*-ген, который определяет устойчивость к фосфинотрицину, активного действующего вещества гербицида – Баста. В качестве реципиента использовали стерильные отцовские формы гибридов подсолнечника, внесенных в государственный реестр сортов и гибридов Украины. Для агробактериальной трансформации растений с двуполыми цветками использовали стерильные формы, это дало возможность синхронизировать процесс оплодотворения и интеграции Т-ДНК в геном растений, путем изоляции этих форм и последующего опыления.

Проведен анализ устойчивости к гербициду полученных форм T₀ подсолнуха, после обработки агробактериальной суспензией и опыления стерильных растений. Отбор фосфинотрицин-резистентных форм T₀ проведен по всходах подсолнечника, в фазе развития 4 – 6 пар настоящих листков, путем обпрыскивания растений гербицидом. С целью изучения наследования генетически модифицированного признака, а именно

устойчивости растений подсолнечника к гербициду, проведено опыление полученных форм. Для чего стерильные формы подсолнечника опыляли пыльцой фертильных растений тех же гибридов и по всходам проводили обработку гербицидом. Установлено, что трансген передается путем гибридизации и наследуется как доминантный.

Полученные данные свидетельствуют о экспрессии гена *bar* и гетерозиготности исходных трансгенных материалов за доминантным трансгеном. Согласно генетическим закономерностям между растениями что погибли и устойчивыми, соотношение у T_1 составило 3:1. Из этого следует, что единственный соответствующий ген локализован в одной хромосоме.

Существенным преимуществом данного метода является отсутствие этапа регенерации *in vitro*. А также его легкость в использовании и не большие финансовые затраты.

Ключевые слова: яровой рапс, агробактерии, трансформация, метод *in planta*, фосфинотрицин.

Annotation

S. V. Bohulska

Approbation of agrobacterial transformation of sunflower by *in planta* method

High weediness of crops and weed infestation of soil create intense competition to sunflower plants, lead to significant losses of nutrients and moisture, their shading and suppression, and finally to reduction of yields of sunflower hybrids and varieties. Usage of non-selective herbicides is highly efficient method of combating dicotyledonous, monocotyledonous, annual and perennial weeds.

*The aim of the research was the approbation of agrobacterial transformation of sunflower by *in planta* method. As the recipient sterile parent forms of sunflower hybrid Ukrainskyi F1, Ukrainskyi skorostyglyi, Ukrainske sonechko, registered in the State Register of Ukraine, were taken. We took sterile forms because it gives the possibility to control the process of pollination and fertilization by isolating these forms and further pollination. That's why for agrobacterial transformation of plants with bisexual flowers sterile forms were used, which makes it possible to synchronize the process of fertilization and incorporation of T-DNA into the genome of plants.*

*By individuals a relatively equal ratio of quantity of herbicide resistant and nonresistant offsprings were revealed. This shows the expression gene *bar* and heterozygosity of initial transgenic materials with dominant transgene. According to the genetic patterns by sterile forms T_1 between plants that died and stable ratio is 1:1.*

Keywords: sunflower, agrobacteria, transformation, *in planta* method, phosphinothricin.

УДК 634.11.:663.2593:663.1:653

ШКІДЛИВИЙ ЕНТОМОАКАРИКОМПЛЕКС ПРОМИСЛОВИХ НАСАДЖЕНЬ ЯБЛУНІ В ЛІСОСТЕПУ

**І.С. Кравець, Д.М. Адаменко, кандидати сільськогосподарських наук
Уманський національний університет садівництва**

Викладено матеріали досліджень складу шкідливого ентомоакарикокомплексу промислових насаджень яблуні в Лісостепу.

Ключові слова: ентомоакарикокомплекс, промислові насадження яблуні, ряди і види шкідливих організмів.

В Україні садівництво здавна є традиційною галуззю сільського господарства. Впродовж 1991 – 2007 рр. площа плодово-ягідних насаджень скоротилася на 73,3%,