

ммоль/л у опытных. В содержимом прямой кишки концентрация фосфора снизилась в контрольной группе до $0,71 \pm 0,05$ ммоль/л, в опытной – до $0,54 \pm 0,02$ ммоль/л.

Заключение. Проанализировав результаты, полученные в ходе опытов на курах-несушках родительского стада по влиянию различных витаминно-минеральных добавок, можно отметить следующее:

1. Наибольшая активность протео-, липо-, амилолитических ферментов у кур-несушек кросса «Беларусь-9» 170-330-дневного возраста отмечалась в тонком кишечнике. По мере удаления от желудка активность ферментов снижается. У кур-несушек со 170-ти до 330-дневного возраста активность протео-, липо-, амилолитических ферментов и щелочной фосфатазы снижается. Активность щелочной фосфатазы, протеолитических и амилолитических ферментов в слизистой оболочке двенадцатиперстной кишки несколько выше, чем в слизистой тощей кишки. Липолитические ферменты проявляли большую активность в слизистой оболочке тощей кишки. В содержимом толстого кишечника ферментативная активность низкая. Добавление в рацион кур-несушек йодсодержащего препарата «Кайод» увеличивает активность щелочной фосфатазы, протео-, липо-, амилолитических ферментов в кишечнике.

2. Ферментативная активность слизистой кишечника у кур породы «Плимутрок» по мере удаления от желудка убывает. В период с 240 до 330-дневного возраста активность исследуемых ферментов в кишечнике кур снижается. Замена в рационе кур минеральной добавки ракушка на пикумин не оказала отрицательного влияния на изменение активности пищеварительных ферментов.

3. У кур-несушек кросса «Беларусь-9» 170-дневного возраста содержание кальция от желудка к тонкому отделу кишечника увеличивается, а затем уменьшается в толстом отделе. К 200-дневному возрасту концентрация кальция в желудке увеличивается у птиц обеих групп и постепенно уменьшается в тонком отделе, но в прямой кишке его количество увеличивается в обеих группах. В период интенсивной яйцекладки (280 дней) содержание общего кальция в тонком отделе кишечника было меньше, чем в желудке, затем в слепых отростках несколько возросло и снизилось в содержимом прямой кишки. К концу опыта (330 дней) концентрация кальция в контрольной группе уменьшалась от желудка к началу толстого отдела кишечника, но в прямой кишке его количество увеличилось. В опытной группе содержание кальция увеличивалось от желудка до слепых отростков и затем снизилось в прямой кишке.

В распределении неорганического фосфора в отделах ЖКТ у кур различных возрастных групп наблюдалась тенденция к увеличению его количества в тонком и начале толстого отдела кишечника, а затем уменьшению в прямой кишке. Причем у кур, получавших премикс «Айдеко», содержание фосфора, начиная с 200-дневного возраста, было более выше, чем у кур, получавших основной рацион.

Список использованной литературы. 1. Активность пищеварительных ферментов при различных дозах селена в рационе кур/В.Ю. Васильев, В.А. Каптюшин//Биолог. основы и технол. методы интенсиф. птицевод. – М., 1989. – С. 15-18. 2. Тихонова Н.И. К вопросу о ферментативной активности кишечника у эмбрионов и кур / Н.И. Тихонова//Биологически активные вещества в жизни растений и животных. – Минск, 1973. – С. 90-94. 3. Активность ферментов панкреатического сока у кур в связи с концентрацией в нем макроэлементов/ Ц.Ж. Батоев, С.Г. Смолин//Морфология и физиология с/х животных. – Благовещенск, 1989. – С. 109 – 114. 4. К анатомии и физиологии мышечного желудка птиц/ Ц.Ж. Батоев [и др.] //Материалы Междунар. конф. ветеринарных морфологов. – Улан-Удэ: Бурятск. с.-х. академия. – 1988. – С. 27-31. 5. Батоев Ц.Ж. Пищеварительная функция поджелудочной железы у кур, уток и гусей / Ц.Ж. Батоев. – Улан-Удэ: Бурят. кн. изд-во, 1993. – С. 120. 6. Георгиевский В.И. Минеральное питание сельскохозяйственной птицы / В.И. Георгиевский. – М: Колос, 1970. – С. 55-60. 7. О роли отделов тонкого кишечника в пищеварении животных / Ц.Ж. Батоев [и др.] // Вест. Бурят. уни-та. Сер. 2. – 2003. – № 4. – С. 120–121. 8. Смолин С.Г. Биохимический состав сока поджелудочной железы у птиц, свиней и собак: учебное пособие / С.Г. Смолин. - Дальн. ГАУ. – Благовещенск, 1995. – 47 с.

УДК 633.853.494

ПОЛУЧЕНИЕ РЕГЕНЕРАНТОВ РАПСА ИЗ ГИПОКОТИЛЕЙ ЧЕРЕЗ ПЕРВИЧНЫЙ ОРГАНОГЕНЕЗ

Добровольский С.А., Кубарев В.С., Шишлов М.П.*, Курдеко А.П.**

*Республиканское унитарное предприятие «Научно-практический центр по земледелию», г. Жодино, Республика Беларусь, 222160

**УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», г. Витебск, Республика Беларусь, 210026

Проведены исследования по изучению процессов регенерации и методов повышения эффективности культивирования *in vitro* органов и тканей рапса, достижения стабильного выхода полноценных регенерантов. Изучалось влияние различных биологически активных веществ на индукцию стеблевого и корневого морфогенеза гипокотилей рапса в условиях культуры *in vitro*. Была изучена возможность получения полноценных регенерантов рапса из сегментов гипокотилей путем прямой регенерации.

The researches on the study of regeneration processes and methods of improvement of the efficiency of cultivation in vitro of rape organs and tissues, achievement of stable yield of proper regenerants were conducted. The influence of different biologically active substances of the induction of stalk and root morphogenesis of rape hypocotyls in the conditions of culture in vitro was established. The possibility of obtaining of rape regenerants from hypocotyl segments by straight regeneration was studied.

Введение. Дефицит кормового растительного белка в животноводстве продолжает оставаться одной из основных проблем полноценного кормления животных. В настоящее время в животноводстве Республики Беларусь дефицит кормового растительного белка составляет около 500 тысяч тонн. Благодаря высокому продуктивному потенциалу и содержанию в семенах сырого протеина, все большее значение приобретает такая сель-

скохозияственная культура, как рапс, шрот которой является ценным белковым ингредиентом при приготовлении комбикормов.

Благодаря достижениям отечественных и зарубежных селекционеров содержание антипитательных веществ, в частности эруковой кислоты и глюкозинолатов, у данной сельскохозяйственной культуры сведено к минимуму, что способствует значительному повышению качества шрота из семян рапса.

Во многих странах мира созданы и трансгенные сорта рапса, а также сорта, полученные биотехнологическими методами, отличающиеся улучшенным качеством семян и устойчивостью к вредителям, болезням и гербицидам тотального действия. Селекционеры нашей республики также имеют большой опыт работы с данной культурой. Ими созданы высокоурожайные сорта рапса, которые занимают основные посевные площади в Республике Беларусь под этой культурой. При этом наши сорта не уступают зарубежным аналогам по качеству продукции и урожайности. В настоящее время ведется интенсивная работа по дальнейшему улучшению существующих сортов рапса и созданию новых форм с использованием биотехнологических методов.

Одним из важнейших подходов к созданию новых сортов рапса с применением биотехнологических методов, в результате которых могут быть получены формы с новыми утилитарными признаками, является агробактериальный трансгенез. Следует заметить, что в результате агробактериальной трансформации все показатели регенерации значительно снижаются. Поэтому особое внимание следует обратить на то, что при создании трансгенных форм методами агробактериального трансгенеза необходимо достижение стабильно-высокой частоты регенерации из трансформируемых частей, т.е. процессов морфо-стебле и -ризогенеза с последующим получением полноценных растений, способных давать семена и наследующих приобретенные признаки в потомстве.

Цель исследований направлена на изучение процессов регенерации и повышение эффективности методов культуры *in vitro* органов и тканей рапса, достижения стабильного выхода полноценных регенерантов.

Материалы и методика исследований. В работе изучалось влияние различных биологически активных веществ на индукцию стеблевого и корневого морфогенеза гипокотилей рапса в условиях культуры *in vitro*. Схема эксперимента включала три этапа лабораторных исследований:

- I. Изучение морфогенной способности гипокотилей;
- II. Совмещение ризо- и морфогенеза на одном экспланте (получение полных регенерантов);
- III. Выявление роли ПВП (ПолиВинилПирролидон) в морфогенезе.

Источником эксплантов для экспериментов служили семена рапса: сорта Лидер (озимый) в двух вариантах, полученные проращиванием на среде $\frac{1}{2}$ MS в темноте (5-7 дней) и на свету (7-10 дней). (I); два сорта рапса – Смак (яровой) и Лидер (озимый) – различного онтогенетического возраста (II); два сорта рапса Милена (озимый) и Магнат (озимый).

Семена стерилизовали путём отмывания их в смеси анионного (15%) и неионогенного (5%) поверхностно-активного вещества, трёхкратной отмывке стерильной дистиллированной автоклавированной водой, кратковременной обработкой 70° спиртом (три минуты), трёхкратной отмывке стерильной дистиллированной водой и выдерживанием двадцать минут в 5% растворе хлорамина.

Культивирование донорных растений и эксплантов проводили при температуре 20-22 °С, освещенности 6000 лк и фотопериоде 16 часов.

Результаты исследований и их обсуждение.

I. Посадка эксплантов – сегментов гипокотилей – проводилась на среду MS макросоли 25мл/л, микросоли 0,5мл/л, дополненная витаминами по B₅, CaCl – 168 мг/л, Бензиладенин (БА) – 4мл/л, Кинитин (КИН) – 2мг/л, Нафтилуксусная кислота (НУК) – 0,1мг/л, AgNO₃ – 5мг/л, активированный уголь – 5мг/л и укрепленная 6 г/л микробиологического агара.

Через три недели культивирования были получены следующие результаты (Табл. 1)

Таблица 1. Морфогенная способность гипокотилей рапса.

Параметр	Эксплант	Эксплант: медиальная часть гипокотилия
Каллусы с новообразованиями		51,9%
Классические каллусы		34,6%
Отсутствие морфогенеза		13,4%

Наблюдалось 3 типа образования морфогенных структур (новообразований): 1 тип: из дистальных шарообразных каллусообразований; 2 тип: из медиальной части гипокотилия; 3 тип: в редких случаях эксплант разламывался на 2 части и из разлома выходили регенеранты. Наряду с нормальными морфогенными структурами, наблюдалось образование витрифицированных, которые отличались более ярким зеленым цветом и полным отсутствием ризогенеза, в дальнейшем все витрифицированные регенеранты погибли. Классические каллусы представляли собой шарообразные образования светло-зеленого цвета, образующиеся на месте среза или поранения. Не классические каллусы представляли собой наростание каллусных масс иного цвета (от белого до бурого) непосредственно на всем зародыше (или на одном его полюсе).

Далее морфогенных структуры были пересажены для укоренения на среду $\frac{1}{2}$ MS. Для большинства регенерантов отмечается затрудненный ризогенез, большая часть морфогенных структур погибла. Те же, кому удалось образовать корни, были перенесены в искусственную почву Биона-312 для адаптации к нормальным условиям после «пробирочного» шока и в дальнейшем были пересажены в нормальную почву. На данный момент в условиях фитотронно-тепличного комплекса растет второе поколение.

II. Была изучена возможность получения полноценных регенерантов рапса из сегментов гипокотилей путем прямой регенерации. Использовались два сорта рапса – Смак (яровой) и Лидер (озимый). Донорные растения различного онтогенетического возраста были получены на безгормональной среде $\frac{1}{2}$ MS, укрепленной 6

г/л агара. В опыте было по 4 варианта на каждый сорт (табл. 2).

Таблица 2. Схема эксперимента по получению эксплантов рапса

Сорт	Возраст донорного растения, дни	Свет	Эксплант	Длина сегмента, См.	Кол-во сегментов от семядолей до корня, шт.
Лидер	5	Есть	гипокотиль	1-2	3
Смак	5	Есть	гипокотиль	1-2	3
Лидер	5	Нет	гипокотиль	1-2	3
Смак	5	Нет	гипокотиль	1-2	3
Лидер	15	Есть	гипокотиль	1-2	3
Смак	15	Есть	гипокотиль	1-2	3
Лидер	15	Нет	гипокотиль	1-2	3
Смак	15	Нет	гипокотиль	1-2	3

Сегменты гипокотилей были пронумерованы от семядолей к корням как I (ближе к верхушке часть растения - апикальная), II (средняя часть - медиальная) и III (прикорневая часть - базальная). Посадка сегментов гипокотилей была проведена на среду MS, дополненную витаминами по B₅, гормонами 4мг/л БА, 2мг/л КИН, 0,1мг/л НУК, 3% сахарозы, 500мг/л Поливинилпирролидон (ПВП), 5мг/л активированного угля и 5 мг/л азотно-кислого серебра и укрепленная 6г/л агара. Добавление в культуральную среду ПВП обусловлено сорбирующей способностью данного полимера, что совместно со схожим действием активированного угля позволяет более эффективно связывать токсические метаболиты развивающихся эксплантов и в результате обеспечивает развитие корней на нижней (погруженной) части экспланта.

Таблица 3. Влияние условий выращивания донорных образцов рапса и возраста эксплантов на их регенерационную способность (%).

Вариант опыта: С-свет, цифра-возраст экспланта	Регенеранты, %			Каллус типичный, %			Наличие только корней, %			Каллус нетипичный, %		
	№ сегмента			№ сегмента			№ сегмента			№ сегмента		
	I*	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III
Смак - 5	4,7	0	4,7	14	4,7	0	9,5 ^a	23,8 ^a	28,5 ^a	4,7	4,7	0
Смак - С, 5	7,1	2,3	0	19 ^a	23,8 ^a	7,1 ^a	0	0	7,1	7,1	7,1	19
Лидер - 5	0	0	0	0	0	0	42,8 ^a	14 ^a	7 ^a	7	14	14
Лидер - С, 5	10,5	5,2	0	10	15	5	0	0	10	15	10	15
Смак - 15	5	0	0	15	0	0	10	5	20	0	25	20
Смак-С, 15*	28	9,3	6,2	6,2	6,2	3,1	0	6,2	12,5	0	6,2	12,5
Лидер-15	11,7	5,8	2,9	2,9	2,9	11,7	11,7	23,5	11,7	2,9	2,9	8,8
Лидер-С, 15	13,7	6,8	6,8	3,4	6,8	3,4	3,4	6,8	13,7	10,3	13,7	10,3

В результате было установлено, что наибольшей способностью к образованию полноценных регенерантов* обладают апикальные сегменты гипокотилей (табл.3). Наиболее компетентными по возрасту донорными растениями для взятия эксплантов являются 15 дневные, а по отношению к свету – выращенные при освещении. Данный факт можно объяснить тем, что в 5 дневных растениях еще недостаточно выражены различия между апикальной и базальной частями, в то время как в 15 дневных данные отличия полностью проявляются. У этилированных растений произошло отставание развития от роста и экспланты не готовы к морфогенезу. В отношении к каллусогенной способности наиболее перспективны вторые сегменты пятидневных эксплантов, освещенные более предпочтительны. Корни более интенсивно образуются на 5 дневных неосвещенных эксплантах.

Деление каллуса на типичный и нетипичный определялось по цвету, консистенции и морфогенному потенциалу. А именно: из светло-зеленого, средне-плотного каллуса при пересадке на морфогенную среду возможно достижение регенерации и получение морфогенных структур, а из темного или белого (бурого, желтого), плотного или слишком рыхлого каллуса достижение регенерации представляется затруднительным.

Особенность модификации данной среды заключается в том, что на выходе образуются т.н. полные (полноценные) регенеранты, которые имеют в достаточной степени развитые корни и листья (в некоторых случаях стебли), что весьма удобно, т.к. не требует дополнительных пересадок. Полноценными регенерантами называются в том случае, когда с развившимися листьями и корнями они могут нормально произрастать вне культуры *in vitro* и давать потомство. Развитие листьев и корней происходит полярно – на одном полюсе листовые структуры, а на противоположном – корни.

Регенеранты с достаточно развитыми листовыми структурами, но без корней, были пересажены на укореняющую среду MS, дополненную гормоном ИМК (2мг/л) и укрепленную 6г/л агара. После развития корней полные регенеранты пересаживались в искусственную почву Биона-312.

Полные регенеранты, с развитыми листовыми структурами (часто фасцированными) и корнями, сразу пересаживались в искусственную почву Биона-312 для адаптации к нормальным условиям. Следует отметить, что не все регенеранты быстро адаптируются – основным показателем готовности к нормальным условиям является рост стебля. Однако во многих случаях растения остаются маленькими, образуют листовую розетку и

остаются в таком состоянии весьма продолжительное время («ждущие» растения на данный момент в искусственной почве – 14 месяцев, в сосудах с нормальной почвой – 18 месяцев). Предполагается, что такие задержки в развитии вызваны накоплением экзогенных фитогормонов, в то время как полноценное растение в состоянии само их синтезировать, поэтому, пока организм «утилизует» «лишние» фитогормоны, растение находится в «замедленном» состоянии. Достигнув определенной стадии развития в искусственной почве, растения пересаживались в нормальную почву. Пересадка регенерантов (полноценных и не полноценных) из культуры *in vitro* в искусственную почву проводилась через каждые три недели.

III. Выявление роли ПВП (ПолиВинилПирролидона) в первичном морфогенезе

Использовались два сорта рапса Милена (озимый) и Магнат (озимый). Донорные растения получали на среде MS с половинным содержанием солей. Сегменты гипокотыля вычленились из нижней половины проростка (дистальная часть гипокотыля), длина сегмента – 1,5 – 2 см. Посадка сегментов на вышеуказанную среду (2 и 3) (первый вариант - концентрация ПВП – 0,5 г/л, второй вариант – концентрация ПВП 1г/л)

Таблица 4. Получено регенерантов рапса в контроле и опыте (%).

Сорт/концентрация ПВП	1ая неделя культивирования	2ая неделя культивирования	4ая неделя культивирования
Милена 0,5 (контроль)	(77%)	(77%)	(85%)
Магнат 0,5 (контроль)	(61%)	(61%)	(77%)
Милена 1	(62,5%)	(71%)	(75%)
Магнат 1	(47%)	(52%)	(58%)

Увеличение концентрации ПВП не привело к увеличению выхода регенерантов, и оптимальной концентрацией является 500мг на литр.

Полученные данные также свидетельствуют о лучшей отзывчивости сорта Милена на культивирование *in vitro*, по сравнению с сортом Магнат, при чем максимальная результативность регенерации достигается на 4ую неделю культивирования – после начинается проявляться токсичное действие продуктов метаболизма эксплантов, негативное влияние пролонгированного воздействия ионов серебра, истощение среды питательными веществами.

Заключение. Полученные данные указывают на возможность получения полных регенерантов рапса в культуре *in vitro* без дополнительных пассажей и пересадок за счёт правильно подобранных концентраций фитогормонов и биологически активных веществ, позволяющих реализовать принципы тотипотентности и полярности вегетативных органов растения. В результате на погруженной в культуральную среду части экспланта образуется корень, а на противоположной – морфогенные структуры. Использование данных веществ значительно упрощает и удешевляет процесс получения полных регенерантов, позволяет за сравнительно короткий промежуток времени получить широкий спектр различных форм, что важно для селекционного процесса, т.к. позволяет отобрать ценные в белковом отношении образцы для дальнейшей работы и включения в производственный процесс.

Литература. 1. Cardoza, V. Increased Agrobacterium-mediated transformation and rooting efficiencies in canola (*Brassica napus* L.) from hypocotyls segment explants/ V. Cardoza, C.N. Stewart//Plant Cell Reports. (2003) 21:599-604 2. Kahrizi, Danial. Simultaneous substitution of Gly96 to Ala and Ala183 to Thr in 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase gene of *E. coli* (k12) and transformation of rapeseed (*Brassica napus* L.) in order to make tolerance to glyphosate/ Danial Kahrizi, Ali Hatfe Salmanian, Afsoon Afshari, Ahmad Moieni, Amir Mousavi// Plant Cell Reports.(2006). DOI 10.1007/s00299-006-0208-4 3. Wang, W.C. Development of a novel Agrobacterium-mediated transformation method to recover transgenic Brassica napus plants/ W.C. Wang, G. Menon, G.Hansen// Plant Cell Reports. (2003) 22:274-281 4. Perry, Sharyn E. The MADS-Domain Protein AGAMOUS-Like 15Accumulates in Embryonic Tissues with Diverse Origins/ Sharyn E. Perry, Melissa D. Lehti, Donna E. Fernandez//Plant Physiology, May 1999, Vol. 120, pp. 121-129 5. Fukuoka, Hiroyuki. Developmental Stage-Specific and Nitrate-Independent Regulation of Nitrate Reductase Gene Expression in Rapeseed/ Hiroyuki Fukuoka, Taiichi Ogawa, Harufumi Minami, Hiroshi Yano, Yasunobu Ohkawa// Plant Physiology. (1996) 111:3947 6. Zou, Jitao. Induction of Lipid and Oleosin Biosynthesis by (+)-Abscisic Acid and Its Metabolites in Microspore-Derived Embryos of Brassica napus L. cv Reston/ Jitao Zou, Garth D. Abrams, Dennis L. Barton, David C. Taylor// Plant Physiology. (1995) 108:563-571 7. Hays, Dirk B. The role of gibberellins in embryo axis development/ Dirk B. Hays, Edward C. Yeung, Richard P. Pharis//Journal of Experimental Botany, August 2002, Vol. 53, No. 375, pp. 1747-17518. Boutilier, Kim. Ectopic Expression of BABY BOOM Triggers a Conversion from Vegetative to Embryonic Growth/ Kim Boutilier, Remko Offringa, Vijay K. Sharma, Henk Kieft and ot.//The Plant Cell, August 2002, Vol. 14, 1737-1749 9. Segui-Simarro, Jose M. Mitogen-activated protein kinases are developmentally regulated during stress-induced microspore embryogenesis in Brassica napus L./ Jose M. Segui-Simarro, Pilar S. Testillano, Stefan Jouannic, Yves Henry, Maria C. Risueno//Histochem Cell Biol. (2005) 123:541-551 10. Wilen, Ronald W. Effects of Abscisic Acid and High Osmoticum on Storage Protein Gene Expression in Microspore Embryos of Brassica napus/ Ronald W. Wilen, Roger M. Mandel, Richard P. Pharis, Larry A. Holbrook, and Maurice M. Moloney// Plant Physiol. (1990) 94, 875-881 11. Rood, Stewart B. Endogenous Gibberellins and Shoot Growth and Development in Brassica napus/ Stewart B. Rood, Roger Mandel, and Richard P. Pharis// Plant Physiol. (1989) 89, 269-273 12. De Block, Marc. Transformation of Brassica napus and Brassica oleracea Using Agrobacterium tumefaciens and the Expression of the bar and neo Genes in the Transgenic Plants/ Marc De Block, Dirk De Brouwer, and Paul Tenning// Plant Physiol. (1989) 91, 694-701