

205-225.

3. Cheng M., Fry J., Pang S., Zhou H., Horinaka C., Duncan D., Conner T., Wan Y. Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens* // Plant Physiol. – 1997. – Vol. 115. – P. 971–980.
4. Peters N., Ackerman S. Davis E.A. A modular vector for *Agrobacterium*-mediated transformation of wheat // Plant Molecular Biology Reporter. –1999. – Vol. 17. – P. 323-331.
5. Jones, H., Wilkinson M., Doherty A., Wu H. High throughput *Agrobacterium* transformation of wheat: a tool for functional genomics, In: Wheat production in stressed environments. Proceedings of the 7th International Wheat Conference, 27 November - 2 December 2005, Mar Del Plata, Argentina, H.T. Buck, J.E. Nisi & N. Salomon. (Ed.). – 2007. – P. 693-699.
6. Jones H., Doherty A., Wu. H. Review of methodologies and a protocol for the *Agrobacterium*-mediated transformation of wheat // Plant methods. – 2005. – Vol. 1. – №5.
7. Bhalla P.L., Ottenhof H.H., Singh, M.B. Wheat transformation—an update of recent progress // Euphytica. – 2006. – Vol. 149. – P. 353-366.
8. Opabode J.T. *Agrobacterium*-mediated transformation of plants: emerging factors that influence efficiency // Biotechnology and Molecular Biology Review. – 2006. – Vol. 1. – P. 12-20.
9. Kumlshn, J., Hensel G. Genetic transformation technology in the triticeae // Breeding Science. – 2009. – Vol. 59. – P. 553-560.
10. Hess D., Dressler K., Nimmrichter R. Transformation experiments by pipetting *Agrobacterium tumefaciens* into the spikelets of wheat (*Triticum Aestivum* L) // Plant Sci. – 1990. – Vol. 72. – P. 233–244.
11. Zhao T.J., Zhao S.Y., Chen H.M., Zhao, Q.Z., Hu, Z.M., Hou B.K., Xia, G.M. Transgenic wheat progeny resistant to powdery mildew generated by *Agrobacterium* inoculum to the basal portion of wheat seedling // Plant Cell Reports. – 2006. – Vol. 25. – P. 1199-1204.
12. Chen D., Dale P. A comparison of methods for delivering DNA to wheat: the application of wheat dwarf virus DNA to seeds with exposed apical meristems // Transgenic Res. – 1992. – Vol. 1. – P. 93–100.

GONCHARUK O.M.¹, **BAVOL A. V.**¹, **MORGUN B. V.**², **DUBROVNA O. V.**¹

¹*Institute of Plant Physiology and Genetics, NAS of Ukraine*

03022, 31/17 Vasylkivska St., 03680, Kyiv, Ukraine, e-mail: dubrovny@ukr.net

²*Institute of Cell Biology and Genetic Engineering, NAS of Ukraine*

148 Acad. Zabolotnoho St., 03680, Kyiv, Ukraine

AGROBACTERIUM-MEDIATED TRANSFORMATION OF THE BASAL PORTION OF WHEAT SEADLING

Aims. The aim of our work was to study the effectiveness of the basal portion of wheat seedlings as explants for *Agrobacterium*-mediated transformation. **Methods.** We has been used the method of *Agrobacterium*-mediated transformation and PCR to display results. **Results.** As a result of genetic transformation we obtained resistant to kanamycin plants. Transgenic status of the four obtained forms was confirmed by PCR. **Conclusions.** The data suggest that basal portion of wheat seedlings can be used for *Agrobacterium*-mediated transformation of wheat.

Key words: *Triticum aestivum* L., *Agrobacterium*-mediated transformation, wheat.

ГУЛЯЄВА Г.Б., БОГДАН М.М

Інститут фізіології рослин і генетики НАН України,

Україна, 03022, м. Київ, вул. Васильківська 31/17, e-mail: prasya_2010@ukr.net

ВПЛИВ ОБРОБКИ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИМИ РЕЧОВИНАМИ НА ФЕРМЕНТАТИВНУ АКТИВНІСТЬ КОМПОНЕНТІВ АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ РОСЛИН ОЗИМОЇ ПШЕНИЦІ

Сучасні сорти рослин мають досить обмежений потенціал стійкості проти шкідливих організмів. Тому захист рослин є невід'ємним компонентом агротехнології та може підвищувати врожайність сільськогосподарських культур на 23 % і більше [5, 7, 9]. Найвищу рентабе-

льність можна отримати, застосовуючи препарати, що діють проти комплексу хвороб [5, 7].

Відомо три групи механізмів стійкості рослин до стресових факторів: 1) стрес-індуковане новоутворення макромолекул із захисними властивостями, 2) синтез спільних осмолітів з мно-

жинними протекторними функціями, 3) антиоксидантні системи [3, 8]. Однією з ранніх відповідей на дію стресових факторів є утворення на клітинній поверхні активних форм кисню (АФК), зокрема супероксиду і пероксиду водню [8, 12]. Клітинною системою захисту від цих радикалів і їх похідних є антиоксидантна система. До антиоксидантних ферментів відносяться супероксидисмутази, каталази, пероксидази та ін. Їх синтез індукується у відповідь на підвищення рівня вільних радикалів [8]. За літературними даними, пероксидаза пов'язана з цілим рядом метаболічних перетворень, що відбуваються в клітині [3, 15].

Важлива роль каталази відома в якості однієї з термінальних оксидаз рослинної клітини, що відповідає за розкладання перекису, та фактору, що бере участь у регуляції зміни фаз аеробних і анаеробних процесів, окисленні перекисів в пероксисомах при фотодиханні [8]. Встановлено, що розчинні пероксидази, представлені цитоплазматичною та слабо зв'язаною з клітинною стінкою ферментативними формами, які найбільш чутливі до впливу стресових факторів. Одним з основних механізмів системної фітостійкості, вважається утворення активних форм кисню, в тому числі перекису водню, в зв'язку з цим, рядом авторів запропоновано в якості біоіндикаторів розвитку стійкості рослин визначати зміну активності розчинних і слабо зв'язаних з клітинною стінкою форм пероксидаз [4].

Дослідженню впливу різних абіотичних факторів на пероксидазну активність присвячені численні роботи [1, 4, 6, 11–13, 15]. Вивчаючи вплив різних факторів на пероксидазну активність соку коренів хрону, Давидова встановила, що хімічний склад соку і його пероксидазна активність залежать від факторів, що визначають умови росту рослин - кількості вологи, складу ґрунту і освітленості. У дослідженнях Г.Ф. Давидова та О.А. Ярмакова встановили зв'язок пероксидазної активності лікарських трав від температури навколишнього середовища [5].

Представляють також інтерес дослідження Половникова М.Г., рослин у районах з різним рівнем забруднення атмосферного повітря, яким виявлені достовірні зміни активності залізовміс-

них ферментів: збільшення активності пероксидази і деяке зниження активності каталази. При цьому стійкі види рослин в порівнянні з нестійкими характеризувалися більш низькими значеннями даних показників [3]. В якості ферменту, підвищення активності якого може свідчити про забезпеченість рослин фосфатами у вигляді макроергічних зв'язків АТФ та показником стійкості рослин, ми визначали активність ферменту АТФази. АТФаза рослинних тканин складається з декількох ферментативних систем, біологічна роль яких ще недостатньо повно вивчена. АТФази звільняють енергію пірофосфатних зв'язків при гідролізі АТФ: $\text{АТФ} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{АДФ} + \text{P}_n$. У зв'язку з цим АТФазі належить велика роль на заключному етапі енергетичного обміну клітини.

У мітохондріях знайдено кілька АТФаз, що активуються двовалентними катіонами (Ca^{2+} , Mg^{2+}) та розрізняються за характером залежності від рН середовища.

Показано, що фосфор активує мембранну H^+ -АТФазу, яка підтримує цитоплазматичний рН і регулює мембранний іонний транспорт [2]. Первинно-активний транспорт іонів в більшості випадків здійснюється транспортними АТФази (іонними насосами), джерелом енергії для яких є гідроліз АТФ або пірофосфат. У мембранах хлоропластів і мітохондрій при роботі систем первинно-активного іонного транспорту джерелом енергії є діяльність окисно-відновних ланцюгів. Особливу роль у створенні різниці потенціалів на мембрані належить мембранному ферменту H^+ -АТФазі. Її функція полягає в тому, що вона перекачує протони з клітини назовні, підтримуючи рН цитоплазми близько до нейтрального (що важливо для протікання багатьох ферментативних процесів), а також створює на мембрані різницю потенціалів, значно визначаючи електричні властивості вищих рослин [2, 10].

Метою досліджень було визначення впливу різних факторів, таких як обробка фунгіцидом і позакоренева обробка поживними елементами на ферментативну активність пероксидази, каталази – компонентів антиоксидантної системи, а також АТФазну активність коренів рослин озимої пшениці.

Матеріали та методи

Дослідження впливу обробки біологічно активними речовинами на активність антиоксидантних ферментів проводили в лабораторних та вегетаційних умовах. Лабораторний дослід проводився за схемою: 1. Контроль: $\frac{1}{2}$ X-A + $\frac{1}{4}$ P (0,06 мМоль/л P); 2. $\frac{1}{2}$ X-A + $\frac{1}{4}$ P (0,06

мМоль/л P) + обробка 3 %-м р-ном монофосфат калію; 3. $\frac{1}{2}$ X-A + $\frac{1}{4}$ P (0,06 мМоль/л P) + позакоренева обробка 3 %-м р-ном монофосфат калію + 2 %-м р-ном MgSO_4 + 0,05 % CuSO_4 . Вегетаційні досліді проводили у вегетаційному будинку на території Інституту фізіології рослин

і генетики НАН України. Об'єкт дослідження - озима пшениця сорту Фаворитка. Рослини, по 12 штук, вирощували в посудинах Вагнера на 8 кг сірого опідзоленого ґрунту на варіантах без обробки і з обробкою рослин фунгіцидом амістар екстра 280 SC в фазі кущення, виходу в трубку та цвітіння-колосіння. Схема досвіду: 1. Контроль N₉₀K₉₀P₄₅; 2. N₉₀K₉₀P₄₅ + позакоренева обробка 3 %-м р-ном МКФ; 3. N₉₀K₉₀P₄₅ + обробка амістар екстра 280 SC; 4. N₉₀K₉₀P₄₅ + позакоренева обробка 3 %-м р-ном МКФ + 2 %-й розчин MgSO₄ + 0,05 % CuSO₄ + обробка амістар екстра 280 SC.

Активність антиоксидантних ферментів визначали на другу добу після обробки біологічно активними речовинами. Активність ферменту каталази (І.ІІ.І.6) визначали титрометричним

Результати та обговорення

Отримані нами результати визначення активності ферментів антиоксидантної системи каталази і пероксидази в коренях 14-денних рослин озимої пшениці свідчать про вплив позакореневої обробки на показники активності ферментів, що входять до антиоксидантної системи. Нашими дослідженнями (табл. 1) встановлено зниження активності каталази (І.ІІ.І.6) на 25 % за позакореневої обробки 3 %-м розчином монофосфату калію і в 1,7 рази – з 1,28 до 0,74 мл O₂ г⁻¹ хв⁻¹ за позакореневої обробки сумішшю елементів живлення P + Mg + Cu. Поряд із цим активність пероксидази (І.ІІ.І.7) в коренях дещо зросла – на 17,5 % при обробці монофосфатом і майже вдвічі – при позакореневій обробці сумішшю елементів живлення P + Mg + Cu.

методом, а пероксидази (І.ІІ.І.7) - за методом Бояркіна [3] і виражали в умовних одиницях на мг сирої ваги тканин. Активність ферменту каталази (І.ІІ.І.6) виражали у кількості O₂, що утворився в результаті дії ферменту за 1 хв на 1 г сирої речовини (мл O₂*г⁻¹*хв⁻¹). Визначення активності ферменту АТФази в тканинах коренів озимої пшениці проводили за методом, що оснований на визначенні приросту неорганічного фосфору в середовищі в ході АТФазної реакції. Реакцію починали з додавання в зразки розчину АТФ відповідної концентрації та припиняли, додаючи розчин ТХУ. Оптичну щільність вимірювали на ФЕК. Активність ферменту визначали за кількістю неорганічного фосфату, відщепленого від аденозинтрифосфату АТФ-азою та виражали в мкг P г⁻¹ сирої речовини год⁻¹[3].

За дослідженнями В.С. Миколаївського [14], існує зв'язок посилення аеробного дихання із зростанням активності термінальних оксидаз. За його даними зміна якості та активності окисно-відновних ферментів може служити не тільки певним показником реакції рослинного організму до несприятливих факторів середовища, але і для оцінки пристосування рослин до умов існування. Тому зміна активності антиоксидантних ферментів в тканинах коренів 14-денних рослин (підвищення активності пероксидази і зниження активності каталази) може бути показником підвищення адаптивних можливостей рослин в умовах позакореневої обробки, оскільки реакція на будь-які впливи на рослинний організм є неспецифічною.

Таблиця 1. Ферментативна активність в коренях 14 денних рослин озимої пшениці (лабораторний дослід)

Контроль: ½ X-A + 1/4 P(0,06 мМоль/л P)	½ X-A + 1/4 P (0,06 мМоль/л P) + позакоренева обробка 3 %-м монофосфатом калію	½ X-A + 1/4 P(0,06 мМоль/л P) + позакоренева обробка 3 %-м монофосфатом калію + 2 %-м р-ом MgSO ₄ + 0,05 % CuSO ₄
Активність каталази (І.ІІ.І.6) (мл O ₂ ·г ⁻¹ ·хв ⁻¹)		
1,28 ± 0,06	0,96 ± 0,05	0,74 ± 0,04
Активність пероксидази (І.ІІ.І.7), г ⁻¹ ·с ⁻¹		
1,37 ± 0,7	1,61 ± 0,07	2,92 ± 0,1

Визначення активності каталази (І.ІІ.І.6) і пероксидази (І.ІІ.І.7) в прапорцевих листках озимої пшениці в фазі колосіння-цвітіння в умовах вегетаційного досвіду мало подібну тенденцію (табл. 2). Активність ферменту каталази (І.ІІ.І.6) знизилася на 7,8 % (при позакореневій обробці 3 %-м р-ном МКФ + амістар екстра) і на 37 % (тільки при обробці фунгіцидом), обробка ж рослин

озимої пшениці багатокомпонентною сумішшю знижувала каталазну активність - на 26 %. Пероксидазна активність при цьому збільшилася на 0,082 г⁻¹ · с⁻¹ як при обробці 3 %-м р-ном МКФ так і додаванні до нього фунгіциду. В останньому варіанті, як і у випадку з каталазою зміни активності були не настільки значні, тобто пероксидазна активність підвищилася з 0,115 до 0,124 г⁻¹ · с⁻¹.

Таблиця 2. Ферментативна активність у листках рослин озимої пшениці (вегетаційний дослід)

Контроль: N ₉₀ K ₉₀ P ₄₅	N ₉₀ K ₉₀ P ₄₅ + 3 %-й р-н МКФ + амістар екстра 280 SC	N ₉₀ K ₉₀ P ₄₅ + амістар екстра 280 SC	N ₉₀ K ₉₀ P ₄₅ + 3 %-й р-н МКФ + 2 %-й р-н MgSO ₄ + 0,05 % CuSO ₄ + амістар екст- ра 280 SC
Активність каталази (І.П.І.6) (мл O ₂ ·г ⁻¹ ·хв ⁻¹)			
1,15 ± 0,05	1,06 ± 0,05	0,43 ± 0,02	0,85 ± 0,05
Активність пероксидази (І.П.І.7), г ⁻¹ ·с ⁻¹			
0,115 ± 0,01	0,197 ± 0,01	0,198 ± 0,01	0,124 ± 0,01

Визначення АТФазної активності в коренях у фазу колосіння-цвітіння показало підвищення активності ферменту при обробці амістар екстра з 158,7 до 190,4 тобто на 31,7 мкг Р · г⁻¹ сир. ваги · г⁻¹, при обробці сумішшю фунгіциду і 3 % р-ну МКФ в 3,3 рази і при обробці сумішшю Р + Mg + Cu + амістар екстра в 3,8 разів (рис.).

Відомо, що активність ферменту АТФази повинна корелювати з вмістом АТФ, більша ча-

стина молекул якої синтезуються в результаті дихальних процесів. У такому випадку, збільшення АТФазної активності узгоджується з роботою В.С. Миколаївського [14], в якій він визначив ефект посилення аеробного дихання як одного з проявів захисних реакцій тканин і встановив зв'язок цього фактора з ростом активності термінальних оксидаз.

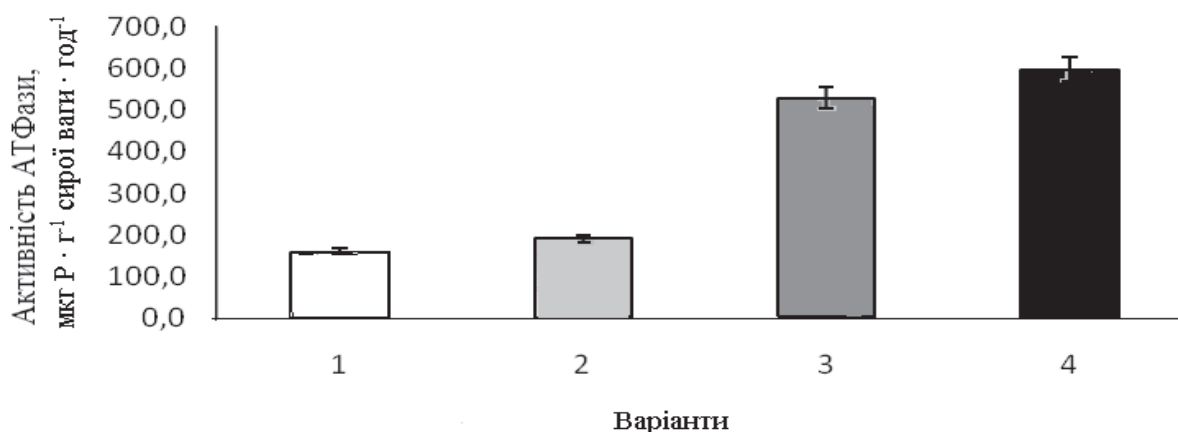


Рис. Вплив позакореневої обробки фунгіцидом і сумішшю елементів живлення на АТФазну активність коренів озимої пшениці сорту Фаворитка (вегетаційний дослід).

Варіанти: 1. Контроль N₉₀K₉₀P₄₅;

2. N₉₀K₉₀P₄₅ + позакоренева обробка 3 %-м р-ном МКФ;

3. N₉₀K₉₀P₄₅ + обробка амістар екстра 280 SC;

4. N₉₀K₉₀P₄₅ + позакоренева обробка 3 %-м р-ном МКФ + 2 %-й розчин MgSO₄ + 0,05 % CuSO₄.

Висновки.

Таким чином, позакоренева обробка рослин фунгіцидом амістар екстра окремо і в суміші з елементами живлення призводить до зміни активності ферментів антиоксидантних систем:

збільшення активності пероксидази (І.П.І.7) та зниження активності каталази (І.П.І.6), що є показником розвитку стійкості рослин озимої пшениці до несприятливих чинників довкілля.

Література

1. Аверьянов А.А., Лапикова В.П. Пероксидазная активность выделений здоровых и зараженных пирикулярриозом листьев риса // Докл. акад. наук. – 1995. – Т. 350, № 5. – С. 702–704.
2. Антонов В.Ф., Черныш А.М., В.И. Пасечники др. Биофизика: учебник для вузов. – М.: Владос, 2000. – 283 с.
3. Воскресенская О.Л., Алябышева Е.А., Половникова М.Г. Большой практикум по биоэкологии: учебное пособие. – Йошкар-Ола, Марийский государственный университет., Ч. 1. – 2006. – 107 с.

4. Граскова И.А., Живетьев М.А., Путилина Т.Е. и др. Активность и изоферментный спектр пероксидазы листьев некоторых видов травянистых растений, произрастающих на берегах озера Байкал, при абиотическом стрессе [Электронный ресурс] // Электронный научный журнал "Исследовано в России". – 2010. – 023. – С. 293–303. – Режим доступа к журн.: <http://zhurnal.ape.relarn.ru/articles/2010/023.pdf>.
5. Гулидова, В.А. Ресурсосберегающая технология озимой пшеницы. – Липецк: ООО "Центр полиграфии", 2006. – 400 с.
6. Давыдова Г.Ф., Ермаков О.А., Панасенко А.И., Тищенко А.М. Лекарственные препараты из растительного сырья. Пероксидаза // Химия растительного сырья. – 1998. – № 1. – С. 15–18.
7. Клуб 100 центнерів. Сорти та технології вирощування високих урожаїв озимої пшениці / В.В. Моргун, С.В. Санін, В.В. Швартау, О.А. Омеляненко. – К.: Ін-т фізіології рослин і генетики Нац. акад. наук України, Компанія "Сингента", Швейцарія. – 2010. – 105 с.
8. Кузнецов, В.В., Дмитриева Г.А. Физиология растений. – М.: Высшая школа, 2005. – 736 с.
9. Перелік пестицидів і агрохімікатів, дозволених до використання в Україні.– Дніпропетровськ: Арт-прес, 2006. – 318 с.
10. Трофимова М.С. Н⁺-АТФаза плазмалеммы как компонент рН-стата цитозоля изолированных протопластов // Физиология растений. – 1992. – 39, № 1. – С. 5–14.
11. Мерзляк М.Н. Активированный кислород и окислительные процессы в мембранах растительной клетки // Итоги науки и техники: ВИНТИ. – Сер. физиология растений, 1989. – Т. 6. – 167 с.
12. Методы оценки устойчивости растений к неблагоприятным условиям среды / под ред. Г.В. Удовенко. – Л.: Колос, 1976. – 318 с.
13. Моргун В.В., Швартау В.В., Киризий Д.А. Физиологические основы формирования высокой продуктивности зерновых злаков // Физиология и биохимия культ. растений. – 2010. – Т. 42, № 5. – С. 371–393.
14. Николаевский, В.С. Эколого-физиологические основы газоустойчивости растений. – М., 1998. – 64 с.
15. Bolwell, G.P Wojtaszek P. Mechanisms for the generation of reactive oxygen species in plant defense – a broad perspective // *Physiol. Mol. Plant Pathol.* – 1997. – Vol. 51. – P. 347 -366.

GULAEVA A.B., BOGDAN M.M.

Institute of Plant Physiology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine, Ukraine, 03022, Kyiv, Vasylkivska str. 31/17, e-mail: pracya_2010@ukr.net

EFFECT OF TREATMENT WITH BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES TO THE ENZYMATIC ACTIVITY OF ANTIOXIDANT SYSTEM OF PLANTS WINTER WHEAT

Aims. The protection of plants is an integral component of agricultural technologies and may increase crop yields. The article shows the results of a study influence of foliar treatment plant winter wheat biologically active substances – of fungicide amistar extra and a mixture of nutrients on content of antioxidant enzymes. An increase in the content of antioxidant enzymes can be an indicator of increasing wheat plant adaptation and plant resistance of winter wheat. **Methods.** The plants of winter wheat Favoritka were grown in laboratory and small plot experiment conditions. Experimental variation plants with treatment water solution of fungicide Amistar Extra 280 SC and with mix elements (P + Mg + Cu) and potassium monophosphate (3%). The enzyme activity of peroxidase was calculated by the method Boyarkina and catalase – by titrimetric method and expressed in units per mg wet weight of tissue. The ATPase activity by the growth of inorganic phosphate in the samples derived from the tissues of the roots was studied. **Results.** It is shown that activity enzyme of catalase in leaf decreased by 37% (by treatment with mixture fungicide and potassium monophosphate), by 26% (by treatment fungicide with mixture elements P + Mg + Cu) or 63% (by treatment of fungicide) in leaf tissues. It was shown, that the peroxidase activity by 0.082 g-1 s-1 increased after the treatment of 3% potassium monophosphate and fungicide in leaf tissues. It has been established, that treatment leaf winter wheat plants Favoritka in the middle vegetation treatment with the fungicide amistar extra 280 SC and mixture amistar extra 280 SC with mixture elements P + Mg + Cu contributed to increase enzyme activity ATPase in root tissues. **Conclusions.** It is shown, that treatment of plant winter wheat Favoritka fungicide of amistar extra 280 SC or mixture of amistar extra 280 SC with nutrients changes the of activity the individual enzymes of antioxidant systems: catalase and peroxidase, which may be an indication enhance the sustainability of winter wheat plants to adverse environmental factors.

Key words: winter wheat (*Triticum aestivum* L.), fungicide, fertilizer.