

## БІОТЕХНОЛОГІЯ

УДК 57.085.2:633.111:633.16

О. Л. ШЕСТОПАЛ, к. б. н., ст. наук. співроб.,  
С. О. ІГНАТОВА, д. б. н., проф., зав. лаб.,  
І. С. ЗАМБРІБОРЩ, к. б. н., ст. наук. співроб.,  
Г. А. ЗЕЛЕНІНА, к. б. н., зав. від.  
СГІ-НЦНС, Одеса  
e-mail: ignatova\_sa@mail.ru

### МЕТОДИ КУЛЬТУРИ *IN VITRO* ДЛЯ СУЧАСНОЇ СЕЛЕКЦІЇ ПШЕНИЦІ М'ЯКОЇ (*Triticum aestivum* L.) ТА ЯЧМЕНЮ (*Hordeum vulgare* L.)

*Подаються результати біотехнологічних розробок на основі культивування in vitro тканин і органів пшениці та ячменю. Висвітлено можливості застосування методів in vitro для отримання вихідного селекційного матеріалу. Визначено умови для прискороного створення стійкого до патогенів гомозиготного матеріалу пшениці та ячменю за поєднання гаплоїдної технології та селекції in vitro.*

Ключові слова: пшениця м'яка, ячмінь, андрогенез *in vitro*, віддалені гібриди, селекція *in vitro*.

**Вступ.** На початку XXI століття в світі триває інтенсивний розвиток різних напрямів біотехнології для прискороного вирішення питань селекції та генетики економічно цінних культур [1–3]. Насамперед, для одержання нового константного генетичного матеріалу рослин, що відрізняється високою продуктивністю й стійкістю до несприятливих біотичних та абіотичних факторів довкілля. Виходячи з наукової та практичної важливості розвитку біотехнологічних досліджень, на основі методів культивування клітин, тканин і органів рослин *in vitro* з метою використання їх у селекції та генетиці зернових культур, у різних країнах визначились наступні напрями дослідницької роботи:

1) одержання гаплоїдів з мікроспор, яйцеклітин і на основі гаплопродюсерів у господарськоцінних культур з метою прискороного створення гомозиготних ліній із різних гібридних популяцій;

2) зниження бар'єрів несумісності при гібридизації таксономічно віддалених батьківських форм у прогамній та постгамній фазі для збереження життєздатності гібридних зародків із застосуванням техніки ембріокультури або «*embryo-rescue*»;

3) виділення з клітинних популяцій за допомогою селекції *in vitro* ліній рослин з високою експресією необхідних для селекції ознак або властивостей;

4) розширення генетичної мінливості в клітинних популяціях рослин на основі соматональної мінливості та/або індукованого мутагенезу з метою одержання нових цінних ознак;

5) одержання генетично модифікованих форм рослин використанням прийомів генетичної трансформації для введення рекомбінантних молекул ДНК або їхніх фрагментів у матеріал реципієнтів з наступним одержанням фертильних рослин з вбудованими генами господарсько-цінних ознак.

Виходячи з нагальних інтересів селекції цінних злаків у позначених напрямках біотехнології рослин, у лабораторії культури тканин СГІ дослідження виконувались за різними науково-теоретичними програмами у наступних напрямках: **1** — збільшення ефективності гаплоїдних технологій, що застосовуються для одержання лінійного матеріалу з гібридних комбінацій селекційних форм економічно важливих для України с.-г. культур — пшениці і ячменю; **2** — розробка систем *in vitro* для одержання нових гібридних форм цих же культур від віддалених схрещувань із близькими й далекими родичами з наступним переведенням їх на гомозиготний рівень; **3** — створення ефективних систем *in vitro* для розширення генетичної мінливості в клітинних популяціях пшениці та ячменю на основі соматональної мінливості та/або індукованого мутагенезу, а також для одержання матеріалу даних культур зі стійкістю до грибних патогенів та посухи.

**Матеріал і методи.** Дослідження проводились у лабораторії культури тканин СГІ–НЦНС. Матеріал досліджень: 120 генотипів (сортів й гібридів) пшениці м'якої (*Triticum aestivum* L.) та 27 генотипів ячменю (*Hordeum vulgare* L.) вітчизняної та зарубіжної селекції, багатолітня дикоросла форма *Hordeum bulbosum* L. ( $2n=28$ ), яра форма *Hordeum spontaneum*, лінії ярого ячменю, що різнилися за стійкістю до борошнистої роси — *Erysiphe graminis* DC. f. sp. hordei Marschal.

Як експлант використовували ізольовані зрілі та незрілі зародки, калус із незрілих зародків, пиляки м'якої пшениці та ячменю. Як селективний фактор у біотехнологічних системах селекції *in vitro* застосовували фільтрат культуральної рідини (ФКР) гриба *F. graminearum* сильно- (56) та слабкопатогенного (*ab*) штамів, люб'язно наданих відділом фітопатології та ентомології СГІ–НЦНС.

Для отримання подвоєних гаплоїдів пшениці із гібридів застосовували, в основному, метод культури *in vitro* ізольованих пиляків пшениці [4]. Для цього пиляки пшениці в стадії сильновакуолізованої мікроспори після тридобової холодової обробки (2–4 °C) у розчині АБК (0,5 мг/л) висаджували на поживне середовище 190–2 у модифікації [5], після чого витримували три доби в темряві при 30 °C, а потім у термостаті при 24 °C до формування на пиляках новоутворень. Такі макроструктури культивували в темряві до появи на них центрів меристематизації на живильному середовищі MS у модифікації: 30 г/л сахарози, 0,5 мг/л кінетину,

по 200 мг/л проліну та глутаміну. Сформовані регенеранти культивували при 24 °С та фотоперіоді 16 год. при інтенсивності освітлення 3–3,5 тис. люкс на безгормональному середовищі MS. Регенеранти подвоєних гаплоїдів пшениці яровізували та дорощували в умовах штучного клімату. Для визначення життєздатності гаплоїдних мікроспор у пиляках на 10-ту та 15-ту добу культивування користувалися цитологічним аналізом давлених оцтокармінових препаратів пиляків. Відсоток морфогенних пиляків, новоутворень і регенерації рослин для кожного генотипу розраховували від кількості висаджених пиляків.

Для подолання постгамної несумісності при одержанні нових гібридних форм пшениці та ячменю шляхом віддалених схрещувань застосовували комплекс прийомів та систем *in vitro*, впроваджених науковцями лабораторії [6].

Для розробки технології оцінки *in vitro* стійкості зразків пшениці до фузаріозу колоса застосовували методи селекції *in vitro* з використанням соматичних експлантів у присутності ФКР — в культурі ізольованих зрілих зародків та культурі калусів з незрілих зародків на стандартних поживних середовищах S MS та MS із додаванням 2 мг/л 2,4-Д відповідно [7].

Оцінку отриманих даних проводили за методами статистичних досліджень і дисперсійного аналізу [8, 9].

**Результати та обговорення.** Серед біотехнологій, що спираються на клітинні культури, спрямовані на поліпшення злаків та прискорене створення перспективного генетичного матеріалу, найбільш затребуваними селекцією в останнє десятиліття, є гаплоїдні технології, які інтенсивно розвиваються в різних країнах. Виявлено, що для м'якої пшениці з двох методів гаплопродукції на основі *in vitro* технологій (віддаленої гібридизації з гаплопродюсером [10] і методу культивування пиляків [11]) останній є більш результативним [3], що було багаторазово продемонстровано у різних країнах створенням лінійних високопродуктивних сортів м'якої пшениці [3, 12–14].

Для м'якої пшениці найбільш результативним методом гаплопродукції є культивування пиляків, заснований на здатності мікроспор розвиватися за спорофітним шляхом. Інтерес дослідників привертає пошук шляхів збільшення ефективності даного методу. Результативність підвищується за рахунок оптимізації умов попередньої обробки колосся, умов культивування та використання в якості донорів пиляків генетично різноманітного матеріалу, що важливо для різнопланових селекційних програм. В лабораторії культури тканин СГІ з метою підвищення виходу дигаплоїдів м'якої пшениці був розроблений комплекс умов, який включає добір донорного матеріалу для роботи в умовах *in vitro*, попередню обробку пагонів з колоссям (температурну й гормональну), модифікацію живильних середовищ для культивування пиляків, новоутворень і регенерантів [15–19].

У результаті проведених досліджень у сортів, ліній та гібридів пшениці м'якої озимої в пиляках, що культивували, на різних етапах морфогенезу виявлено генотипоспецифічні морфогенетичні реакції мікроспор з відмінностями за частотою індукції процесів калусогенезу, ембріодогенезу й формуванням ембріонально-клітинних комплексів, які надалі проявляли різну здатність до регенерації рослин. Так, серед досліджених 109 генотипів пшениці м'якої озимої діапазон варіювання показників гаплопродукції був доволі широким і становив за показником «формування новоутворень» у сортів від 0 до 36,%, у гібридів — від 0 до 38,8 %; а за показником «регенерації зелених рослин» у сортів від 0 до 9,5 %, у гібридів — від 0 до 9,1 %.

Усі досліджувані генотипи були розподілені на 5 груп у залежності від ступеня їхньої чутливості до андрогенезу *in vitro*: I — нечутливі генотипи (0), II — низькочутливі, у яких відсоток формування новоутворень та регенерації зелених рослин був у межах від 0 до 1 ( $0 < x < 1$ ), III — середньочутливі, зі значеннями показників гаплопродукції від 1 до 3 % ( $1 < x < 3$ ), IV (від 3 до 5 %) та V (більше 5 %) — високочутливі (рис. 1, 2). Дані на рисунках представлені як частка (у відсотках) генотипів, що за показниками гаплопродукції відносяться до тої чи іншої групи, стосовно загальної кількості досліджених генотипів (для сортів —  $n=35$ , для гібридів —  $n=74$ ).

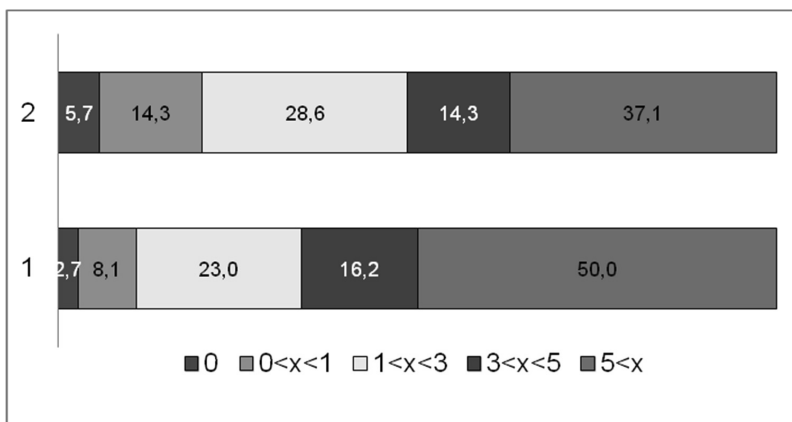


Рис. 1. Розподіл генотипів пшениці м'якої озимої за показником «формування новоутворень» у культурі пиляків *in vitro*: 1 — гібриди, 2 — сорти

Аналізом отриманих даних виявлено, що гібридні генотипи мають більший гаплопродукційний потенціал, ніж сорти. Максимальними показниками гаплопродукції в культурі ізольованих пиляків вирізнявся гібрид між сортом Кавказ (має в геномі пшенично-житню транслокацію 1BL/1RS) та лінією пшениці, що несе модифіковану (без ділянки ДНК, що кодує білки секаліни) пшенично-житню транслокацію 1BL/1RS — 38,8 % для новоутворень та 9,1 % для зелених регенерантів. Серед сортів високими показниками регенерації характеризувались Куяльник (9,4 %), Лютестенс 155 (2,89 %) та Щедрість одеська (3,23 %). Ці три сорти можуть слугувати генетичними джерелами для підвищення гаплопродукційної

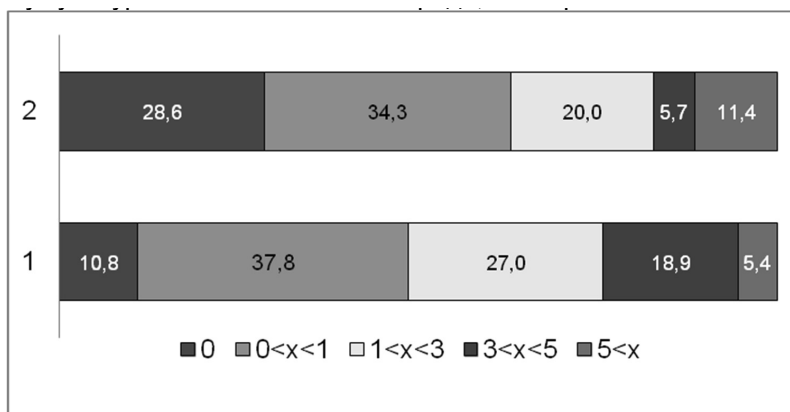


Рис. 2. Розподіл генотипів пшениці м'якої озимої за показником «регенерація зелених рослин» у культурі пиляків *in vitro*: 1 — гібриди, 2 — сорти

здатності у цінних селекційних форм із низьким рівнем даної ознаки або за її відсутності [15–20].

Аналіз та узагальнення результатів багаторічних досліджень щодо шляхів підвищення ефективності гаплопродукції генотипів у даній системі *in vitro* дозволив виявити наступні методичні нюанси, які рекомендовано нами для використання в практичній роботі з селекційним матеріалом:

- добирати для роботи зразки пшениці з найкоротшим періодом «сходи — вакуолізована мікроспора», починати добір зразка з 1-го пагона, що вийшов з вузла кущіння донорної рослини, коли мікроспори в пиляках, переважно перебувають у середньопізній фазі розвитку [21];

- використовувати для роботи *in vitro*, в основному, пиляки із середньої частини колоса донорної рослини;

- використовувати в культурі пиляків як донорний матеріал зразки пшениці з низькою фотоперіодичною чутливістю, з коротким періодом тривалості яровизації, оскільки вони характеризуються підвищеним рівнем формування новоутворень та регенерації з них зелених рослин [2, 5];

- оптимізувати параметри та умови проходження індукційного етапу гаплопродукції в ізольованих пиляках, що дозволяє підвищити ефективність цієї системи за рахунок зростання рівня регенерації новоутворень у 1,5–2 рази, залежно від генотипу-донора пшениці [19, 22].

За результатами багаторічних досліджень зроблено висновок щодо відтворюваності результатів роботи за даною системою *in vitro*, а можливості й продуктивність її дозволяють широко використовувати в селекції пшениці м'якої озимої. За період з 2011 по 2015 рр. селекційним відділам СГІ передано 565 ліній пшениці м'якої.

В аспекті підвищення ефективності біотехнологічної системи одержання подвоєних гаплоїдів ячменю зроблено наступні висновки. У пиляках дослідженого матеріалу ярого ячменю (сорти, гібридні комбінації та лінії), які культивують, виявлено високий рівень генотипоспецифічності за проявом морфогенетичних реакцій на етапі індукції новоутворень.

Більшість сортів ячменю перебувало в групі з низькою здатністю до гаплопродукції, але при цьому всі гібриди, використані в роботі, значно перевершували батьківські сорти за частотою формування новоутворень. Було визначено, що чим менший часовий інтервал між проростанням насіння і виходом (розгортанням) флагового листа вегетуючих рослин, тим вища частота індукції новоутворень у культурі пиляків [23], що співпадає з результатами, отриманими в культурі пиляків пшениці м'якої.

Тестування колекції посухостійких форм ярого ячменю (Адапт, Сталкер, Галатя, Південний, Одеський 100 — сорти селекції СГІ; Мішке — сорт чеської селекції; Candle, Mac Guire — сорти канадської селекції; гібридів Сталкер х Mac Guire, Сталкер х Candle) за здатністю до андрогенезу *in vitro* дозволило оцінити їх морфогенетичний потенціал у культурі пиляків (табл. 1).

Виявилось, що досліджені генотипи значно різнились як за здатністю до індукції новоутворень, так і за рівнем регенерації рослин у культурі *in vitro*. Виділили генотипи з високою частотою новоутворень — сорти Одеський 100 та Південний; з високою регенераційною здатністю — Мішке та Адапт, які рекомендується використовувати як генетичне джерело для підвищення виходу зелених рослин, так і в цілому — здатності до гаплопродукції [24].

Таблиця 1

Ефективність андрогенезу *in vitro* посухостійких генотипів ячменю

Генотип	Морфогенетичний потенціал*		
	частота новоутворень, %	регенераційний потенціал	
		рослини-регенеранти, шт. (%)	зелені рослини, шт. (%)
Адапт	14,2	29 (7,8 %)	3 (5,7 %)
Галатя	46,6	3 (2,6 %)	0
Південний	76,9	16 (7,2 %)	4 (1,8 %)
Одеський 100	83,4	32 (8,4 %)	8 (0,4 %)
Мішке	40,7	21 (30,9 %)	1 (1,5 %)
Од. 100 х Мішке	80,6	67 (10,2 %)	10 (1,0 %)
Мішке х Од. 100	62,5	20 (2,3 %)	2 (0,3 %)
Сталкер	6,0	0	0
Candle	59,3	17 (3,8 %)	6 (1,3 %)
Mac Guire	22,3	26 (6,7 %)	0
Сталкер х Mac Guire	36,7	56 (36,9 %)	0
Сталкер х Candle	42,2	38 (20,8 %)	6 (3,3 %)

Примітка: \* — морфогенетичний потенціал оцінювали за кількістю пиляків з новоутвореннями (у відсотках від числа пиляків, висаджених на середовище) і кількістю рослин-регенерантів (у відсотках від числа отриманих новоутворень)

Важливим розділом роботи з поліпшення окремих і комплексних ознак цінних культурних видів рослин, що привертають широку увагу генетиків і селекціонерів, є віддалена гібридизація культурних форм із

близькими й далекими родичами — це є основою одержання інтрогресивних форм і широко використовується в селекційно-генетичній роботі зі злаками. Сучасні сорти пшениці та ячменю мають високу екологічну пластичність і здатні значною мірою реалізовувати свій потенціал врожайності, однак проблема стійкості до біотичних та абіотичних факторів обмежує можливості одержання високих урожаїв. Одним з напрямів її вирішення — є залучення у схрещування стійких дикорослих співродичів. Серед останніх для пшениці привертають увагу різні форми *Aegilops*, які є джерелом комплексної стійкості для цілої низки біотичних та абіотичних чинників.

У нашій роботі [2, 25–27] при одержанні віддалених гібридів пшениці м'якої різних сортів із *Aegilops tauschii* Coos (форма Ts k 608 із колекції ВІР), яким властива стійкість до комплексу абіотичних факторів, застосовано ряд прийомів для подолання прогамної несумісності: обробка квіток розчином гіберелової кислоти та кінетину в концентрації 7 г/л через 45 хв після запилення, з повтором через добу; на 10–14 добу після запилення колосся із зернівками зрізали й поміщали у розчин фізіологічно-активних речовин та мінеральних солей за прописом MS на 2–3 доби; виділення зародків з гібридних зернівок й висадка їх на живильне середовище до одержання проростків. Отримані гібридні рослини на стадії 3–5 листків диплоїдизували 0,15 % колхіцином в 4 % ДМСО й дорощували рослини до одержання насіння. Рівень зав'язування зародків у комбінаціях з різними генотипами коливався від 0 до 21 %, а їхнє проростання в запропонованих умовах *in vitro* було різне. У цьому зв'язку проводили дослідження з оптимізації складу живильного середовища для зародків різного строку формування. Виявлені кращі варіанти для регенерації рослин незалежно від віку — це середовище ГБ 5, доповнене 1–1,5 мг/л 2,4-Д, і середовище Уайта із сахарозою й дріжджовим екстрактом. У цих експериментах отримані рослини-регенеранти, з яких п'ять стали константними лініями й передані для подальшого вивчення.

Для ячменю перспективними в цьому напрямі є яра форма *Hordeum spontaneum*, яка, за даними ВІРу, характеризується комплексною жаро-і посухостійкістю та стійкістю до гельмінтоспоріозу й борошнистої роси, та *Hordeum bulbosum*, що є джерелом морозостійкості і стійкості до грибних хвороб (Walther et al., 2000). Однак одержання віддалених гібридів на його основі пов'язане із проблемами несумісності й загибеллю гібридних зародків у зернівках на різних етапах розвитку *in vivo* і після виділення у процесі росту *in vitro*. У цьому зв'язку розроблено [28, 29] біотехнологічну систему для одержання гібридних рослин від схрещувань *Hordeum vulgare* ( $2n=14$ ) x *Hordeum bulbosum* ( $2n=28$ ). Підібрано оптимальні строки висіву обох видів для подальшої гібридизації. Результативнішим із зав'язування зернівок при схрещуваннях був клон *Hordeum bulbosum*, який характеризувався відсотком зав'язування з ярами сортами 29,2 %, а з гібридними формами — до 57,3 %. Виявлено, що для зняття про-

гамної несумісності в даних комбінаціях, необхідно застосовувати прийом запилення охолодженим пилюком, що підвищувало (щодо контролю) зав'язування гібридних зернівок залежно від комбінації 124,1–172,2 %, а кількість одержаних рослин становила 136,4–170,0 %. Гібридні зародки з розмірами 2,3–4,2 мм виявились кращими для культивування й подальшого виходу рослин. Живильне середовище MS з додаванням 2,4-Д і кінетин сприяло підвищенню регенерації рослин в умовах *in vitro* через калусогенез. У цій роботі від схрещувань із озимими формами ячменю отримано 52 рослини, а з ярими — 80 рослин. З окремих комбінацій схрещувань було отримано константні лінії, які передано селекціонерам для подальшого вивчення.

Проведено роботу з вивчення ефективності віддалених схрещувань 20 комбінацій схрещувань 10 різних гібридних генотипів культурного ячменю з 7 дикими формами *H. spontaneum* [30, 31]. Відсоток отриманих при цьому гібридних зернівок у різних комбінаціях коливався від 25 до 68,8. Кращими за результатами цих схрещувань виявились форми *H. spontaneum* — T13 (Nevaycar) та IS 26–2, у гібридах з їхньою участю сформувалось 83,3 % зернівок. При використанні гібридів ( $F_1$ ) від схрещування сортів Одеський 100 x Вакула зав'язування зернівок коливалось в межах 75,0–81,2 %. В основному спостерігали утворення життєздатних зернівок з диплоїдним набором хромосом  $2n=14$ , порушень у мітозі в клітинах меристеми корінців не виявлено, рослини добре кущилися на відміну від вихідних батьківських форм.

З метою стабілізації отриманого гібридного матеріалу вивчали чутливість віддалених гібридів ячменю до андрогенезу *in vitro*. Досліджували десять родин  $F_1$ – $F_4$  від трьох комбінацій схрещування *H. vulgare* x *H. spontaneum*, серед яких п'ять дібрані в другому поколінні за ознакою «неламке колосся». Аналіз результатів показав, що усі гібридні популяції виявились чутливими до умов культивування ізольованих пиляків *in vitro*, формуючи новоутворення, які регенерували зелені рослини, що дає змогу застосовувати метод культивування ізольованих пиляків *in vitro* для гомозиготації віддалених гібридів. Усього з популяцій віддалених гібридів отримано 82 лінії подвоєних гаплоїдів: 8 — з популяції  $F_2$  ДГ-2 x *H. spontaneum* IS 26–2; 5 — з популяції  $F_1$  (Од.100 x Вакула) x *H. spontaneum* IS 26–2; 1 — з популяції  $F_2$  ДГ-3 x *H. spontaneum* IS 26–2; 7 — з популяції  $F_4$  ДГ-3 x *H. spontaneum* IS 26–2; 33 — з популяції  $F_2$  (Одеський 100 x Вакула) x *H. spontaneum* IS 26–2; 20 — з популяції  $F_3$  (Одеський 100 x Вакула) x *H. spontaneum* IS 26–2; 8 — з популяції  $F_4$  (Одеський 100 x Вакула) x *H. spontaneum* IS 26–2 [32].

Одже, віддалені гібриди є чутливими до умов культивування ізольованих пиляків. Це відкриває реальну перспективу для гомозиготації гібридів, створених із залученням *H. spontaneum* як джерела посухостійкості на ранніх етапах селекції ячменю. Отримані позитивні результати з розробки й модифікації біотехнологічних прийомів створення віддалених



гібридів на основі пшениці м'якої та ячменю підтверджують перспективність, важливість і необхідність подальшого розвитку цього експериментального напрямку.

Третій аспект дослідницької роботи лабораторії культури тканин, яка перебуває в цей час в активному розвитку, — це розробка прийомів і побудова методичної бази для відпрацювання біотехнології селекції *in vitro* з метою прогнозування стійкості до грибних патогенів у пшениці й ячменю та добору перспективних форм. Сьогодні головним завданням цього напрямку є вивчення морфогенетичних характеристик різних експлантів досліджуваних видів в умовах *in vitro* за впливу селективних факторів. На першому етапі необхідним є добір їх сублетальних концентрацій і проведення на цій основі експериментів з культивування експлантів модельних генотипів з відомою фітопатологічною оцінкою стійкості до грибних патогенів і уточнення параметрів, за якими можна визначати толерантність експлантів, співмірну зі стійкістю генотипів до патогена. Так, зокрема, на пшениці м'якій для досліджень в обраному напрямі були дібрані два штами гриба *Fusarium graminearum* — 56 і *ab*, що культивуються на живильному середовищі Чапека для одержання фільтрату культуральної рідини (ФКР). Використання ФКР штаму *ab* в 30 і 50 % концентраціях, як селективного агента на рівні насіння та ізольованих зародків модельних сортів-тестерів (з різною фітопатологічною оцінкою стійкості до патогена), дозволило визначити параметри життєздатності досліджуваного матеріалу пшениці м'якої для тестування на толерантність до ФКР з метою прогнозування рівня стійкості зразків. Виявлено можливість використання для цього показників індукції калусогенезу в культурі *in vitro* незрілих зародків. Для вибракування нестійких до патогена генотипів на рівні регенерації рослин із соматичних експлантів може бути використана 50 % концентрація ФКР обох штамів гриба. У результаті проведених експериментів запропонована система *in vitro*, що дозволяє на фоні фільтратів ФКР гриба *Fusarium graminearum* двох штамів проводити поетапний добір толерантних експлантів пшениці м'якої до фузаріозу колосся, рівень толерантності яких, значною мірою відповідає рівню стійкості досліджуваної популяції пшениці до фузаріозу [33–35].

Останнім етапом процесу селекції *in vitro* форм пшениці, стійких до фузаріозу, є отримання гомозиготних ліній. Створюючи селективний тиск на гетерогенну популяцію мікроспор, теоретично можливо цілеспрямовано добирати найбільш толерантні, здатні до морфогенезу мікроспори та отримувати толерантні рослини-регенеранти. В експерименті на селективні живильні середовища з ФКР *F. Graminearum* штамів 56 і *ab* (15 і 30 %) висадили пиляки чотирьох сортів та рослин п'яти гібридних комбінацій, одержаних від схрещувань пшениці м'якої з *Aegilops cylindrica*. Під впливом ФКР обох штамів *F. graminearum* достовірно зменшувалась кількість новоутворень на первинному живильному середовищі, тоді як збільшувався відсоток морфогенного калусу, здатного до регенерації

рослин у культурі пиляків у всіх досліджуваних сортів. Регенерація зелених рослин у стійкого сорту спостерігалась майже на всіх селективних живильних середовищах, у середньостійких сортів зелені рослини отримали лише на середовищах з низькою концентрацією ФКР обох штамів, у сприйнятливого сорту в присутності ФКР не отримано жодної зеленої рослини. Ефективність біотехнології створення стійких до захворювання гомозиготних форм із гібридів пшениці в культурі пиляків залежить від селективної здатності використовуваних ФКР і генотипу-донора експлантів пшениці (високоандроногенної материнської форми та високостійкого до захворювання батьківського гібрида). Всього отримано шляхом андрогенезу *in vitro* 144 лінії подвоєних гаплоїдів пшениці м'якої озимої із гібридів, створених у відділах СГІ [36].

Дослідників ячменю в аспекті селекції *in vitro*, має зацікавити проведена в лабораторії розробка [37, 38] з підвищення ефективності гаплопродукційної системи на основі культури пиляків з метою застосування її в роботі зі створення гомозиготного лінійного матеріалу, стійкого до борошнистої роси (*Erysiphe graminis DC f.sp.hordei*). Було визначено, що стійкі до цього патогена сорти ячменю мають дуже низьку здатність до регенерації зелених рослин (0–1,1 %) у культурі пиляків. Використання в якості генетичного джерела сорту Одеський 100 для підвищення виходу зелених регенерантів з гібридних форм дозволило одержати три лінії нового генетичного матеріалу зі стійкістю, що перевищує її рівень у вихідних форм.

**Висновки.** Розроблено біотехнологію створення нових вихідних форм ячменю та пшениці з використанням культури пиляків *in vitro*, віддаленої гібридизації, ембріокультури та селекції *in vitro*.

На основі виявлених закономірностей процесів індукції новоутворень у культурі пиляків *in vitro* та їхньої регенерації запропоновано умови попередньої обробки донорних рослин пшениці та ячменю, модифіковано живильні середовища та умови культивування новоутворень, що дозволило удосконалити технологію одержання лінійного матеріалу.

Отримані позитивні результати з розробки й модифікації біотехнологічних прийомів при одержанні віддалених гібридів пшениці м'якої та ячменю.

Оцінку *in vitro* стійкості до фузаріозу колоса рекомендовано проводити з застосуванням культури ізольованих зрілих зародків пшениці за дії ФКР *F. graminearum* штаму *ab* в концентрації 15 %. Для створення в культурі пиляків шляхом андрогенезу *in vitro* гомозиготних форм пшениці із стійкістю до фузаріозу колоса ефективним є використання як донорного матеріалу гібридів пшениці за схрещування: ♀ (чутлива до андрогенезу *in vitro* форма) × ♂ (стійка до *F. graminearum* форма пшениці), як селективного фактора — модифікованих ФКР слабкопатогенного штаму *ab* у концентрації 5 %.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Thomas W. T., Forster B. P., Gertsson B. Doubled haploids in breeding / W. T. Thomas, B. P. Forster, B. Gertsson // *Doubled Haploid Production in Crop Plants*. Dordrecht: Kluwer Academic Publ. — 2003. — P. 337–350.
2. Игнатова С. А. Биотехнологические основы получения гаплоидов, отдаленных гибридов и соматических регенерантов зерновых и бобовых культур в различных системах *in vitro* : автореф. дис. ... д-ра биол. наук : 03.00.20/ УААН. Никитский ботанический сад / С. А. Игнатова. — Ялта, 2004. — 45 с.
3. Дьячук Т. И. Роль метода гаплоидии в создании исходного материала для селекции зерновых культур в НИИСХ Юго-Востока / Т. И. Дьячук, С. В. Столярова, О. В. Хомякова, А. В. Колдырева, Ю. В. Итальянская, Н. Ф. Сафронова, Л. П. Медведева // *Зб.: Геном рослин*. — Одеса, 2008. — С. 178–181.
4. Отримання подвоєних гаплоїдів м'якої пшениці в культурі пиляків: Методичні рекомендації / С. О. Ігнатова, М. В. Жосонар, К. І. Лобанова, О. Л. Шестопал ; Півден. біотехнолог. центр в рослин-ві УААН. — Одеса, 2008. — 12 с.
5. Жосонар М. В. Гаплопродукционная способность в культуре пыльников сортов и линий озимой мягкой пшеницы, различающихся по генам роста и развития / М. В. Жосонар // *Вісник Харківського національного аграрного університету*. — 2005. — Вип. 2(7). — С. 94–99.
6. Використання ембріокультури для одержання гаплоїдів ячменю та віддалених гібридів ячменю та пшениці : методичні рекомендації / С. О. Ігнатова, М. Л. Махновська, І. С. Замбрборщ [та ін.] ; Півден. біотехнолог. центр в рослинництві УААН. — Одеса, 2007. — 12 с.
7. Корня Т. М. Селекція *in vitro* озимої м'якої пшениці за впливу фузарієвої кислоти / Т. М. Корня, С. О. Ігнатова // *Мікробіологія і біотехнологія*. — 2011. — № 1(13). — С. 41–47.
8. Рокицкий П. Ф. Биологическая статистика. — Минск : Высшая школа, 1967. — 367 с.
9. Атраментова Л. О. Статистичні методи в біології : [підручник] / Атраментова Л. О., Утевська О. М. — Х. : ХНУ імені В. Н. Каразіна, 2007. — 288 с.
10. Inagaki M. N. Production of wheat haploids using wide crosses and its application to breeding programs / M. N. Inagaki // *Proc. of the 9 Int. Wheat Genet. Symp.* Saskatoon, Canada, 1998. — P. 225–226.
11. Sunderland N. Anther and Pollen Culture 1974–1979 / N. Sunderland // *The Plant Genome*, Norwich. — 1980. — P. 171–183.
12. Kartha K. Mc Kenzie Wheat / K. Kartha, R. Graf // *Bull. Plant Biotechnol. Inst.* — 1999. — № 1. — P. 9–12.
13. Mihaly R. Using of doubled haploids in wheat breeding / R. Mihaly, C. Lantos, Z. Kertesz, A. Mesterhazy, J. Pauk // *Haploid in Higher Plants. III. Intern. Conf.* Vienna, February 12–15, 2006. — P. 34.
14. Литвиненко М. А. Біотехнологічні методи у селекції сільськогосподарських культур / М. А. Литвиненко // *Вісник аграрної науки*. — 2010. — № 6. — С. 11–14.
15. Жосонар М. В. Регенерационная способность различных по продолжительности яровизации и фотопериодической чувствительности сортов озимой пшеницы в культуре пыльников *in vitro* / М. В. Жосонар, С. А. Игнатова,

- В. И. Файт, В. Р. Фёдорова // Вісник Харківського національного аграрного університету. — Серія : біологія. — Харків, 2004. — Вип. 2(5). — С. 79–83.
16. Лобанова Е. И. Регенерация в культуре пыльников озимой мягкой пшеницы у генотипов с разной продолжительностью периода «всходы-колошение» / Е. И. Лобанова, С. А. Игнатова, О. Л. Шестопап, Т. П. Нарган // Фактори експериментальної еволюції організмів. — 2008. — Т. 5. — С. 291–297.
  17. Ігнатова С. О., Жосонар М. В., Лобанова К. І. Особливості виявлення рівня чутливості до андрогенезу різних генотипів м'якої пшениці в культурі пиляків / С. О. Ігнатова, М. В. Жосонар, К. І. Лобанова // Фізіологія та біохімія культурних рослин. — 2010. — Том 42, № 2(244). — С. 107–117.
  18. Шестопап О. Л. Вивчення гаплопродукційної здатності м'якої пшениці з пшенично-житніми транслокаціями / О. Л. Шестопап, І. С. Замбріборщ, М. М. Топал, М. А. Литвиненко, С. О. Ігнатова // Фактори експериментальної еволюції організмів : зб. наук. пр. Укр. т-во генетиків і селекціонерів ім. М. І. Вавилова : присвяч. 95-річчю від часу заснування НАН України ; редкол.: В. А. Кунах (голов. ред.) [та ін.]. — К. : Логос, 2013. — Т. 12. — С. 326–330.
  19. Лобанова К. І. Регенерація рослин в культурі пиляків м'якої пшениці, шляхи її підвищення : автореф. дис. ... канд. біол. наук : спец. 03.00.20 «Біотехнологія» / К. І. Лобанова. — Одеса, 2009. — 19 с.
  20. Шестопап О. Л. Гаплопродукційна спроможність пшениці м'якої озимої за наявності в генотипі пшенично-житніх транслокацій / О. Л. Шестопап, І. С. Замбріборщ, М. М. Топал // Вісник Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна, № 1129. Серія: біологія. — 2014. — Вип. 23. — С. 51–56.
  21. Патент України 36253 МПК (2006) А01Н1/06 Спосіб прогнозування рівня регенерації рослин в культурі пиляків озимої м'якої пшениці / Ігнатова С. О., Лобанова К. І., Шестопап О. Л. ; заявник і патентовласник Південний біотехнологічний центр в рослинництві УААН. — № u 200803034; заявка 11.03.08; опубл. 27.10.2008, Бюл. № 20.
  22. Пат. 21988 України МПК (2006) А01Н1/06 Спосіб підвищення регенераційного потенціалу в культурі пиляків озимої м'якої пшениці / Ігнатова С. О., Лобанова К. І., Шестопап О. Л. ; заявник і патентовласник Південний біотехнологічний центр в рослинництві УААН. — № u 200611658; заявка 6.11.06 ; опубл. 10.04.07, Бюл. № 4.
  23. Літовкін К. В. Генотипові особливості морфогенетичних реакцій в культурі тканин ячменю : автореф. дис. ... канд. біол. наук : 03.00.20 / К. В. Літовкін. — Ялта, 2003. — 20 с.
  24. Зеленіна Г. А., Ігнатова С. О. Тестування сортів ярого ячменю та їх гібридів на гаплопродукційну здатність в культурі пиляків / Г. А. Зеленіна, С. О. Ігнатова // Фактори експериментальної еволюції організмів : зб. наук. праць / за ред. Роїка. — К. : Логос, 2006. — Т. 3. — С. 457–461.
  25. Ігнатова С. О. Подолання прогамних та постгамних бар'єрів несумісності при віддаленій гібридизації пшениць з *Aegilops tauschii* L. / С. О. Ігнатова, І. С. Замбріборщ, Д. В. Аксельруд // Вісник Харківського національного аграрного університету. — 2005. — Вип.2. — С. 75–81.
  26. Замбріборщ І. С. Технологія створення віддалених гібридів від схрещування пшениці з *Aegilops tauschii* Coos. з використанням методів *in vitro* /

- І. С. Замбріборщ // Фактори експериментальної еволюції організмів : зб. наук. праць ; Укр. т-во генетиків і селекціонерів ім. М. І. Вавилова ; за ред. М. В. Роїка. — К. : Логос, 2006. — Т. 3. — С. 451–456.
27. Патент на винахід, — № (11) 13641, (51) МПК (2006) А01Н 1/02 Спосіб подо- лання прогамних та постгамних бар'єрів несумісності при віддаленій гібриди- зації м'якої пшениці з *Aegilops tauschii* Coos. / Замбріборщ І. С., Ігнатова С. О., Шестопа О. Л. ; заявник і патентовласник Південний біотехнологічний центр в рослинництві УААН. — № u 200509228; від 17.04.06, Бюл. № 4.
28. Махновська М. Л. Удосконалення технології одержання гібридних рослин від схрещувань *Hordeum vulgare* (2n=14) x *Hordeum bulbosum* (2n=28) з ви- користанням культури *in vitro* / М. Л. Махновська, Л. С. Шепель, С. О. Ігнато- ва // Фактори експериментальної еволюції організмів : зб. наук. праць / Укр. т-во генетиків і селекціонерів ім. М. І. Вавилова ; за ред. М. В. Роїка. — К. : Логос, 2006. — Т. 3. — С. 494–499.
29. Використання ембріокультури для одержання гаплоїдів ячменю та віддале- них гібридів ячменю та пшениці : методичні рекомендації / Ігнатова С. О., Махновська М. Л., Замбріборщ І. С. [та ін.]; Півден. біотехнолог. центр в рослинництві УААН. — Одеса, 2007. — 12 с.
30. Shestopal O. Use of *Hordeum spontaneum* in distant hybridization of cultural barley / O. Shestopal, M. Mahnovskaya // Materials of III International Young Scientists conference «Biodiversity. Ecology. Adaptation. Evolution» (15–18 May 2007). — Odesa, 2007. — P. 221.
31. Шестопа О. Л. Особливості успадкування ознак дикого ячменю у гібридів *Hordeum vulgare* x *Hordeum spontaneum* / О. Л. Шестопа, М. Л. Махнов- ська, С. О. Ігнатова // Фактори експериментальної еволюції організмів : IV міжнар. наук. конф., 22–26 вересня 2008 р. : зб. наук. праць. — Алушта, 2008. — С. 216–221.
32. Махновська М. Л., Шестопа О. Л., Ігнатова С. О. Експериментальний ан- дрогенез *in vitro* у віддалених гібридів ярого ячменю *Hordeum vulgare* L. x *H. spontaneum* C. Koch / М. Л. Махновська, О. Л. Шестопа, С. О. Ігнатова // Геном рослин : V Міжнар. наук. конф., 13–16 жовтня 2008 р. : зб. наук. ста- тей. — Одеса, 2008. — С. 203–207.
33. Ігнатова С. А., Бабаянц О. В. Методические основы отбора форм пшеницы мягкой, устойчивых к *Fusarium graminearum* Shwabe в условиях *in vitro* / С. А. Ігнатова, О. В. Бабаянц // Наукові праці Південного філіалу Національ- ного аграрного університету, Кримський агротехнологічний університет, с.-г. науки. — Симферополь, 2008. — Вип. 107– С.136–141.
34. Ігнатова С. А. Прогнозирование устойчивости мягкой пшеницы к фуза- риозу колоса (*Fusarium graminearum* Shwabe) и отбор толерантных форм в условиях *in vitro* / С. А. Ігнатова // Геном рослин : V Міжнар. наук. конф., 13–16 жовтня 2008 р. : зб. наук. статей. — Одеса, 2008. — С.187–191.
35. Корня Т. М. Морфогенез эксплантов мягкой пшеницы в условиях отбора *in vitro*, толерантных к фильтрату культуральной жидкости гриба *Fusarium graminearum* Schwabe образцов / Т. М. Корня, С. А. Ігнатова // Фактори експериментальної еволюції : збірник наукових праць. — Київ, 2009. — Т. 7. — С. 151–156.
36. Корня Т. М. Вивчення селективних властивостей фільтрату культураль- ної рідини *Fusarium graminearum* Sch. в культурі пиляків м'якої пшениці /

- Т. М. Корня, С. О. Ігнатова // Вісник Харківського національного аграрного університету : серія Біологія. — 2008. — Вип. 3 (15). — С. 99–106.
37. Шепель Л. С. Біотехнологічні методи одержання стійких до борошнистої роси форм ярого ячменю / Л. С. Шепель, М. Л. Махновська, С. О. Ігнатова // Вісник Одеського національного університету. — 2005. — Т. 10, № 5. — С. 12–18.
38. Махновская М. Л. Эффективность биотехнологических приемов получения устойчивых форм ячменя к мучнистой росе (*Erysiphe graminis* (DC.) F. SP. *Hordei marschal*) / М. Л. Махновская, О. Л. Шестопал, Л. С. Шепель, С. А. Игнатова // Зб. наук. праць Селекційно-генетичного інституту — Національного центру насіннізнавства та сортовивчення. — Одеса : СГІ–НЦНС, 2009. — Вип. 13 (53). — С. 66–73.

Надійшла 27.07.2015.

UDC 57.085.2:633.111:633.16

**Shestopal O. L., Ignatova S. O., Zambriborshch I. S., Zelenina G. A.**  
Plant Breeding and Genetics Institute — National Center of Seed and Cultivar Investigations

**THE METHODS OF *IN VITRO* CULTURE FOR MODERN SELECTION  
OF SOFT WHEAT (*Triticum aestivum* L.) AND BARLEY  
(*Hordeum vulgare* L.)**

The results of biotechnology developments on the basis of in vitro culture of tissues and organs of wheat and barley, and the possibility of in vitro methods for the creation of initial breeding material were demonstrated. The conditions for the biotechnology of the accelerated creation of resistant to pathogens homozygous material of wheat and barley with simultaneous use of haploid technology and in vitro selection were identified.

УДК 57.085.2:633.111:633.16

**Шестопад О. Л., Игнатова С. А., Замбриборщ И. С., Зеленина Г. А.**

**МЕТОДЫ КУЛЬТУРЫ *IN VITRO* ДЛЯ СОВРЕМЕННОЙ СЕЛЕКЦИИ ПШЕНИЦЫ МЯГКОЙ (*Triticum aestivum* L.) И ЯЧМЕНЯ (*Hordeum vulgare* L.)**

Представлены результаты биотехнологических разработок на основе культивирования *in vitro* тканей и органов пшеницы и ячменя. Продемонстрированы возможности методов *in vitro* для получения исходного селекционного материала. *Определены условия для ускоренного создания устойчивого к патогенам гомозиготного материала пшеницы и ячменя с одновременным использованием гаплоидной технологии и селекции in vitro*