

УДК 633.112:57.085.2

Г. О. ДОБРОВА, мол. наук. співроб.,
І. С. ЗАМБРІБОРЦЬ, к. б. н., ст. наук. співроб.,
О. Л. ШЕСТОПАЛ, к. б. н., ст. наук. співроб.
СГІ–НЦСС, Одеса
e-mail: dobrovaann@gmail.com

ВПЛИВ ГЕНОТИПУ І УМОВ КУЛЬТИВУВАННЯ НА РЕГЕНЕРАЦІЮ РОСЛИН У КУЛЬТУРІ ПИЛЯКІВ ПШЕНИЦІ ТВЕРДОЇ (*Triticum durum* Desf.) *IN VITRO*

Визначили вплив генотипу, індукційного живильного середовища і попередньої обробки колосся низькими позитивними температурами і розчинами АБК на регенерацію рослин у культурі пиляків in vitro ярих і озимих форм пшениці твердої. Виявили значну залежність регенерації зелених і «альбіно» рослин від генотипу. В культурі пиляків отримали фертильні рослини яро-озимих гібридів пшениці твердої. Оптимальними виявились модифікації живильного середовища С17 за вмістом органічних речовин. Попередня обробка колосся водними розчинами АБК істотно не впливала на рівень регенерації, за виключенням рослин сорту Гардемарин.

Ключові слова: пшениця тверда, культура пиляків *in vitro*, регенерація рослин, живильне середовище, попередня обробка колосся, абсцизова кислота.

Вступ. Андрогагенез *in vitro* — важливий біотехнологічний метод, що широко застосовується в селекції злакових культур [1]. Однак пшениця тверда малочутлива в культурі пиляків *in vitro*. Головною проблемою є низький рівень регенерації зелених рослин. В основному з новоутворень формуються рослини-альбіноси, непридатні до вирощування в ґрунті [2, 3]. Тому важливою задачею біотехнолога є дослідження факторів, що впливають на регенерацію, і розробка оптимальних умов культивування.

З літературних даних відомо, що рівень регенерації рослин пшениці твердої певною мірою визначають усі етапи культури пиляків *in vitro*, а саме — попередня обробка колосся [4, 5], індукційне і регенераційне живильні середовища [6], генотип рослин [7, 8].

Виходячи з цього, мета даної роботи полягала в оцінці впливу генотипу, індукційного живильного середовища та умов попередньої обробки колосся на рівень регенерації в культурі пиляків твердої пшениці *in vitro*.

Матеріали і методи дослідження. Досліди проводили в 2014 р. Матеріал наданий лабораторією селекції та насінництва пшениці твердої озимої. У дослідження залучали сім яро-озимих гібридів F₂ пшениці

твердої, три сорти пшениці твердої ярої, чотири гібриди F_1 пшениці твердої озимої (табл. 1) і п'ять сортів пшениці твердої озимої (Айсберг одеський, Алий парус, Босфор, Гардемарин, Корал одеський).

Таблиця 1

Вихідний матеріал для дослідження

№ в культурі	Генотип
Яро-озимі форми	
T1	F_2 (Сарат. золотий x Gidara 2) x Гардемарин
T2	F_2 HUI/ґав79/Don87 x DF900–83/WBR881
T3	F_2 (Торой 18/ФОНА1/Altar84) x (ґав79/Ал. парус) / {Корал / [(LR-1 x 504/67) x Хар. 1] x [(Tigris x Айсб.од.) x (Айсб.од x Нов.4)]}/
T4	F_2 Haurani x Айсберг одеський
T5	F_2 Haurani x Континент
T6	F_2 Haurani x (ґав79 x Ал. парус) x {Корал x [(LR-1 x 504/67) x Хар. 1] x [(Tigris x Айсб.од.) x (Айсб.од x Нов.4)]}/
T7	F_2 Торой 18/ФОНА1/Altar84 x Лінкор
Ярі форми	
T8	Altar84
T9	F_1 Торой-18/ФОНА-1/Altar84
T10	ФОНА-1
Озимі форми	
T11	F_1 DF-900–83/WPB-881 x Новинка4 2614
T12	F_1 DF-900–83/WBK-881 x Лінкор
T13	F_1 DF-900–83/WBK-881 x Золоте руно
T14	F_1 DF- 900–83/WBK-881 x Янтар одеський
	Айсберг одеський
	Алий парус
	Босфор
	Гардемарин
	Корал одеський

Рослини вирощували на дослідних польових ділянках СГІ–НЦНС. Пагони з пиляками зрізали з донорних рослин, коли вакуолізовані мікроспори знаходились у середньо-пізній одноядерній фазі розвитку. Попередньо витримували зрізані пагони у воді та водному розчині АБК (0,25 і 0,5 мг/л) протягом 3–7 діб при +2 — +4°C у темряві [9]. Колосся поверхнево стерилізували насиченим розчином гіпохлориту кальцію за відомою методикою [10]. Пиляки експлантували на шість варіантів агаризованих живильних середовищ для індукції новоутворень 190–2 [6], С17 [11] та їх модифікації. Модифікували середовища за вмістом і складом амінокислот, органічних кислот та вітамінів [12]. Після 15–25 діб культивування новоутворення переносили на середовища для новоутворень MS [11]. Після 7–10 діб калюси із зонами регенерації та ембріоїди поміщали на

середовище для регенерації S MS [13]. Для визначення рівня регенерації підраховували процент одержаних рослин-регенерантів («альбіно» та зелених) та довірчий інтервал згідно Рокицького [14].

Результати і обговорення. На першому етапі дослідження вивчали вплив генотипу та складу індукційного живильного середовища на процес регенерації рослин у культурі *in vitro* пиляків пшениці твердої. Оскільки, за даними літератури, ярі форми різних культурних злаків є більш чутливими до андрогенезу *in vitro* [1], ми залучили в дослідження сорти і F₂ міжсортові гібриди пшениці твердої ярої. Результати досліджень наведено у таблиці 2.

Таблиця 2

Регенерація рослин у культурі пиляків сортів і гібридів пшениці твердої ярої

Генотип	Індукційне середовище	«Альбіно»		Зелені	
		шт.	%	шт.	%
T1	C17 B	2	0,81±0,57	0	0
	C17 M	3	3,09±1,76	0	0
	CM	4	1,23±0,61	0	0
T2	C17B	1	0,11±0,11	1*	0,20±0,20
T3	C17 B	4	0,86±0,43	0	0
	C17 M	1	0,23±0,23	0	0
	CM	3	1,40±0,80	0	0
	190–2 B	1	1,54±1,53	0	0
T4	C17 B	0	0	3*^	0,55±0,32
T5	C17н	2	0,74±0,52	1	0,37±0,37
T6	C17 M	1	0,51±0,51	1*^	0,51±0,51
T7	C17н	1	0,82±0,82	0	0
	CM	2	0,96±0,66	0	0
T8	CM	1	0,66±0,66	0	0
T9	C17 M	2	0,90±0,63	0	0
	C17	1	0,38±0,38	2	0,77±0,54
	C 17 B	3	1,02±0,59	2	0,68±0,48
	CM	2	0,69±0,49	0	0
T10	C 17 B	1	0,47±0,47	0	0
	C17	1	0,27±0,27	0	0

Примітка. * – рослини були успішно адаптовані і вирощуються в умовах штучного клімату; ^ — рослини фертильні, отримано насіння.

– в таблиці наведено результати лише тих варіантів досліду, де отримано регенерацію (при застосуванні інших живильних середовищ прояву даної ознаки не спостерігали).

На нашу думку, цікавим для подальшого вивчення є виявлений позитивний вплив залученого у схрещування сорту Haurani на регенерацію зелених рослин у культурі пиляків гібридів пшениці твердої. Так, у результаті андрогенезу *in vitro* від генотипу F₂ Haurani x Айсберг одеський (T4) отримали зелені рослини-регенеранти за майже нульового рівня регенерації «альбіно» рослин. При цьому одна з батьківських форм,

а саме озимий сорт Айсберг одеський виявився взагалі нечутливим до умов культивування пиляків *in vitro*. Гібриди F₂ Haurani x Континент (Т5) і Haurani x (Yav79 x Ал. парус) x {Корал x [(LR-1 x 504/67) x Хар. 1] x [(Tigris x Айсб. од.) x (Айсб. од x Нов.4)]} / (Т6), аналогічно генотипу Т4, характеризуються здатністю утворювати зелені рослини-регенеранти і низьким виходом «альбіно» рослин. Отже, можна зробити висновок, що генотип Haurani може бути потенційним донором ознаки «регенерація зелених рослин».

Ярий генотип Тороу-18/ФОНА-1/Алтар 84 (Т9) виявився спроможним утворювати як зелені, так і «альбіно» рослини-регенеранти. Рослини ярих сортів Алтар84 (Т8) і ФОНА1 (Т10) регенерували лише «альбіно» форми. Гібрид Тороу 18/ФОНА1/Алтар 84 x Лінкор (Т7), на відміну від батьківської форми, виявився малочутливим до умов культури пиляків *in vitro*. Аналогічні результати отримали за культивування пиляків яро-озимого гібрида Т3, до складу якого входив генотип Тороу-18/ФОНА-1/Алтар 84.

В умовах посушливого клімату Півдня України вищу рентабельність забезпечують озимі форми пшениці твердої. Тому у подальше дослідження, окрім ярих, були залучені й озимі сорти та гібриди. На першому етапі дослідили вплив генотипу та індукційного живильного середовища на регенерацію рослин в культурі пиляків гібридів F₁ пшениці твердої озимої (табл. 3).

Гібрид першого покоління DF-900–83/ВВК-881 x Янтар одеський (Т14) виявився малочутливим до умов культури пиляків *in vitro* і характеризувався нижчим, у порівнянні з іншими гібридами, рівнем регенерації. Загалом регенерація у гібридів Т11–Т13 достовірно не відрізнялась. З-поміж досліджених генотипів F₁ гібридів пшениці твердої озимої зелені рослини-регенеранти отримано лише у гібрида F₁ DF-900–83/ВВК-881 x Лінкор (Т12). Генотип DF-900–83/ВВК-881 був батьківським компонентом яро-озимого гібрида F₂ HUI/Yav79/Don87 x DF900–83/ВВК881 (Т2), новоутворення якого виявили здатність формувати в культурі *in vitro* зелені рослини-регенеранти.

Одним з найважливіших факторів, що впливають на ефективність процесу андрогенезу, є живильне середовище. Більшу кількість рослин отримали з новоутворень, сформованих на модифікаціях індукційного живильного середовища С17 — С17В, С17н, СМ, С17М (табл. 2, 3).

У попередніх дослідженнях [12, 15] нами було показано, що саме ці середовища є оптимальними для індукції новоутворень в культурі пиляків *in vitro* пшениці твердої.

Озимі гібриди по-різному відповідають на умови культивування, а саме на склад індукційного живильного середовища (табл. 3). Так, новоутворення, отримані з мікроспор генотипів Т12, Т13, Т14, надалі краще регенерували при культивуванні пиляків на індукційному середовищі С17М — модифікації середовища С17, що містила у своєму складі мальтозу, як джерело вуглецю. Однак генотип Т11 максимальний рівень

Таблиця 3

Регенерація зелених і «альбіно» рослин у культурі пиляків гібридів пшениці твердої озимої

Гено-тип	Індукційне середовище	«Альбіно»		Зелені	
		кількість регенерантів, шт.	регенеранти, %	кількість регенерантів, шт.	регенеранти, %
Т11	190–2 В	1	0,24±0,24	0	0
	С17	0	0	0	0
	С17 В	4	0,99±0,49	0	0
	С17 М	2	0,30±0,21	0	0
	СМ	2	0,70±0,49	0	0
Т12	190–2 В	6	1,02±0,41	0	0
	С17	5	0,75±0,33	0	0
	С17 В	2	0,28±0,20	0	0
	С17 М	10	1,32±0,41	2	0,26±0,19
	СМ	0	0	1	0,14±0,14
Т13	190–2 В	1	0,19±0,19	0	0
	С17	2	0,43±0,30	0	0
	С17 В	3	0,45±0,26	0	0
	С17 М	5	1,02±0,45	0	0
	СМ	1	0,22±0,22	0	0
Т14	190–2 В	2	0,24±0,17	0	0
	С17	1	0,11±0,11	0	0
	С17 В	1	0,12±0,12	0	0
	С17 М	3	0,48±0,28	0	0
	СМ	0	0	0	0

регенерації показав при культивуванні пиляків на індукційному середовищі С17В — модифікації С17 за вмістом аміно- і органічних кислот. У гібрида Т12 регенерація при культивуванні пиляків на середовищах С17 і 190–2В була вища, ніж у інших гібридів, а на середовищі С17В — нижча у порівнянні з гібридом Т11. Дві зелені рослини генотипу Т12 були сформовані при культивуванні пиляків на середовищі С17М, одна — на середовищі СМ.

Отже, можна зробити висновок, що модифіковані за вмістом органічних речовин середовища на основі С17 є найбільш придатними для отримання рослин-регенерантів. Додавання до них мальтози як джерела вуглецю (С17М) і амінокислот (С17В) сприяло виходу зелених рослин-регенерантів у культурі пиляків *in vitro* пшениці твердої.

З літературних даних відомо, що попередня обробка колосся низькими позитивними температурами і розчином АБК стимулює перехід мікроспор з гаметофітного на спорофітний шлях розвитку і підвищує регенераційну здатність новоутворень у культурі пиляків пшениці твердої [4, 5]. Вплив попередньої обробки колосся на вихід рослин-регенерантів вивчали на сортах пшениці твердої озимої (табл. 4).

Таблиця 4

Регенерація «альбіно» рослин пшениці твердої озимої в культурі пиляків *in vitro*

Генотип	Концентрація АБК, мг/л	Кількість регенерантів	%
Айсберг одеський	0	0	0
	0,25	0	0
	0,5	0	0
Алий парус	0	0	0
	0,25	2	0,29±0,20
	0,5	0	0
Босфор	0	0	0
	0,25	0	0
	0,5	0	0
Гардемарин	0	0	0
	0,25	4	0,89±0,45
	0,5*	1	0,23±0,22
Корал одеський	0	2	0,65±0,45
	0,25	0	0
	0,5	1	0,19±0,19

Примітка:* — були сформовані дві зелені рослини.

Усі досліджені сорти пшениці твердої виявились малочутливими до умов культури пиляків *in vitro*. З п'яти генотипів рослини-регенеранти дали лише три сорти — Алий парус, Корал одеський та Гардемарин. Сорти Айсберг одеський і Босфор регенерантів не сформували (табл. 4).

З досліджених сортів Гардемарин був найбільш чутливим до культури пиляків *in vitro*. Для сортів Алий парус і Гардемарин характерне формування регенерантів лише після попередньої обробки колосся водними розчинами АБК. Впливу даного гормону на регенерацію рослин у сорту Корал не спостерігали.

Слід зазначити, що попередня обробка колосся АБК не сприяла регенерації зелених рослин. Однак, у культурі пиляків сорту Гардемарин одержано дві зелені рослини-регенеранти за умови попередньої обробки колосся АБК в концентрації 0,5 мг/л.

Висновки

1. Досліджені генотипи пшениці твердої характеризуються різним рівнем регенерації. Більший вихід зелених рослин-регенерантів спостерігали у гібридів, де за батьківську форму використовували ярі генотипи — Naurani та Тороу-18/ФОНА-1/Altar84. Теоретично можна очікувати регенерацію зелених рослин при залученні даних генотипів у схрещування. Серед досліджених озимих сортів найбільшим регенераційним потенціалом характеризувався сорт Гардемарин.

2. Найвищий рівень регенерації з новоутворень одержано за умови культивування пиляків на індукційних живильних середовищах С17н, С17В, СМ та С17М — модифікаціях стандартного середовища С17.

3. Рівень регенерації рослин сорту Гардемарин вищий за умови попередньої обробки колосся водними розчинами АБК у концентраціях 0,25 та 0,5 мг/л. В інших досліджених сортів чіткої залежності рівня регенерації від попередньої обробки АБК не виявлено.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Ігнатова С. О. Фактори, що впливають на реалізацію регенераційного потенціалу мікроспор у культурі пиляків м'якої пшениці / С. О. Ігнатова, К. І. Лобанова // Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології. — 2007. — Т. 2. — С. 492.
2. Kisana N. S., Nkongolo K. K., Quick J. S. [et al.] Production of doubled haploids by anther culture and wheat x maize method in a wheat breeding programme / N. S. Kisana, K. K. Nkongolo, J. S. Quick [et al.] // Plant Breeding. — 1993. — V.110 — P. 96–102.
3. O'Donoghue L. S. and Bennett M. D. Comparative responses of tetraploid wheat pollinated with *Zea mays* L. and *Hordeum bulbosum* L. / L. S. O'Donoghue and M. D. Bennett // Theoretical and Applied Genetics. — 1994. — V. 87. — P. 673–680
4. Slama Ayed O. Effect of pre-treatment on isolated microspores culture ability in durum wheat (*Triticum turgidum* subsp. durum Desf.) / O. Slama Ayed, J. De Buyser, E. Picard [et al.] // Journal of Plant Breeding and Crop Science. — 2010. — V. 2, № 2. — P. 30–38.
5. Genovesi A. D. Improved rate of callus and green plant production from rice anther culture following cold shock / A. D. Genovesi and C. W. Maggill // Crop Science. — 1979. — V. 19. — P. 662–664.
6. Trottier M. C. Comparison of media further aptitude in wheat anther culture / M. C. Trottier., J. Collin, A. Comeau // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. — 1993. — V. 35. — P. 59–67.
7. Caredda S. Androgenesis and albinism in Poaceae: influence of genotype and carbohydrates / S. Caredda, C. Clément, E. Pacini, J. C. Audran (eds.) // Anther and pollen: from biology to biotechnology. — Berlin : Springer, 1999. — P. 211–228.
8. 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.
9. Патент України МПК № 21988 від 10.04.07. Ігнатова С. О., Лобанова К. І., Шестопап О. Л. Спосіб підвищення регенераційного потенціалу в культурі пиляків озимої м'якої пшениці. — Бюл. № 4.
10. Ігнатова С. О. Отримання подвоєних гаплоїдів м'якої пшениці в культурі пиляків / С. О. Ігнатова, М. В. Жосонар, К. І. Лобанова, О. Л. Шестопап // Методичні рекомендації. Півден. біотехнолог. центр в рослин-ві УААН. — Одеса, 2008. — 12 с.
11. Foroughi-Wehr B., Zeller F. J. In vitro microspore reaction of different German wheat cultivars // Theoretical and Applied Genetics. — 1990. — V. 79. — P. 77–80.
12. Замбріборщ І. С. Індукція новоутворень в культурі пиляків тетраплоїдної пшениці *Triticum dicoccum* (Schrank) Schuebl. *in vitro* / І. С. Замбріборщ,

- Г. О. Добрава, О. Л. Шестопал, О. М. Ружицька // Сборник научных трудов SWorld. — 2013. — С. 28–32.
13. Лобанова К. І. Шляхи реалізації регенераційного потенціалу в культурі пиляків у різних генотипів озимої м'якої пшениці / К. І. Лобанова, М. В. Жосонар, С. О. Ігнатова // Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів. — 2006. — Т. 4, № 1. — С. 52–57.
 14. Рокицкий П. Ф. Биологическая статистика : учебник [для студ. высших учебн. завед.] / П. Ф. Рокицкий — Минск : Изд-во Минского ун-та, 1973. — 316 с.
 15. Замбрїборщ І. С. Вплив живильних середовищ на індукційну спроможність сортів та гібридів твердої пшениці / І. С. Замбрїборщ, Г. О. Добрава, А. І. Паламарчук // Тези міжнародної наукової конференції «Селекція та генетика сільськогосподарських рослин: традиції та перспективи» (до 100-річчя Селекційно-генетичного інституту — Національного центру насіннезнавства та сортовивчення). — 2012. — С. 370–371.

Надійшла 02.07.2015.

UDC 633.112:57.085.2

Dobrova G. O., Zambrıborshch I. S., Shestopal O. L. Plant Breeding and Genetics Institute — National Center of Seed and Cultivar Investigations

THE AFFECT OF GENOTYPE AND CULTURAL CONDITIONS ON *IN VITRO* PLANT REGENERATION IN DURUM WHEAT (*Triticum durum* Desf.) ANTHR CULTURE

Durum wheat double haploid production was the main goal of our research. The effect of plant genotype, induction cultural media and spikes pretreatment with low positive temperature and water ABA solutions (0,25 and 0,5 mg/l) during seven days on the process of *in vitro* plant regeneration in durum wheat anther culture was studied in this research. Important effect of plant genotype on spring durum wheat varieties and hybrids green and «albino» plant regeneration was discovered. Responsible to *in vitro* anther culture conditions genotypes were determined. Fertile haploid plants of two winter-spring durum wheat hybrids were obtained. It was detected that the most appropriate induction cultural media was C17 media modifications with adding of organic components. Low temperature and water ABA solutions didn't significantly affect the regeneration level, except plants of Gardemarin variety.

УДК 633.112:57.085.2

Доброва А. А., Замбриборщ И. С., Шестопап О. Л.**ВЛИЯНИЕ ГЕНОТИПА И УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ
НА РЕГЕНЕРАЦИЮ РАСТЕНИЙ В КУЛЬТУРЕ ПЫЛЬНИКОВ
ПШЕНИЦЫ ТВЕРДОЙ (*Triticum durum Desf.*) *IN VITRO***

Изучали влияние генотипа, индукционной питательной среды и предобработки колосьев низкими положительными температурами и водными растворами АБК на регенерацию растений в культуре пыльников *in vitro* яровых и озимых форм пшеницы твердой. Выявили значительную зависимость регенерации зеленых и «альбино» растений от генотипа. В культуре пыльников *in vitro* яро-озимых гибридов пшеницы твердой получены фертильные зеленые растения-регенеранты. Оптимальными оказались модификации среды С17 по содержанию органических соединений. Предобработка колосьев водными растворами АБК не оказывала существенного влияния на уровень регенерации, за исключением сорта пшеницы твердой озимой Гардемарин.