

УДК 633.14:57.085.2

DOI: 10.15587/2313-8416.2015.38752

ДОСЛІДЖЕННЯ МОРФОГЕНЕТИЧНОЇ АКТИВНОСТІ МІКРОСПОР *IN VITRO* В КУЛЬТУРІ ПИЛЯКІВ ЖИТА

© О. Л. Шестопал, І. С. Замбріборщ, С. О. Ігнатова, З. О. Мазур

Досліджували морфогенетичну здатність мікроспор жита в культурі пиляків. Проводили тестування впливу двох індукційних живильних середовищ (190-2 та W14) на проходження першого етапу андрогенезу in vitro в культурі пиляків 4 зразків жита. Показано, що обидва живильні середовища придатні для отримання новоутворень в культурі пиляків жита української селекції. Отримано п'ять альбіносних рослин-регенерантів

Ключові слова: жито, андрогенез *in vitro*, новоутворення, регенерація

The morphogenetic capacity of rye microspores in anther culture was investigated. Testing the influence of 2 inductive nutrient medium (190-2 and W14) for passing the first stage of androgenesis in vitro at anther culture of 4 samples of rye were conducted. It is shown that both nutrient media suitable for formation of new growth in anther culture of rye of Ukrainian selection. The five albino regenerates were obtained

Keywords: rye, androgenesis *in vitro*, new growth, regeneration

1. Вступ

У землеробстві низки країн північної і центральної Європи озиме жито має велике значення. Інтенсифікація сільського господарства приводить до необхідності розвитку нових напрямків в селекції жита для створення відповідних інтенсивних сортів: селекція гетерозисних гібридних сортів жита; селекція короткостеблових не здатних до вилягання сортів жита; селекція жита на стійкість до хвороб та інше. Все це представляє чималі труднощі для селекції, у зв'язку з необхідністю створювати різноманітний вихідний матеріал і вести добір у різних напрямках. Залучення новітніх біотехнологічних розробок, а насамперед гаплоїдії, допоможе значно скоротити час створення вихідного матеріалу для селекційних програм.

2. Постановка проблеми

На сьогодні все частіше одним з обов'язкових етапів селекційного процесу різних культурних злаків є застосування біотехнології отримання дигаплоїдних рослин, із використанням культури ізольованих пиляків. Щодо таких досліджень на житі, то вони майже не проводилися в Україні, хоча необхідність у цих роботах є. Мета роботи полягала у тестуванні морфогенетичного потенціалу мікроспор в культурі пиляків жита озимого, з метою добору умов попередньої обробки колосся, апробації живильних середовищ для індукції калусів із мікроспор ізольованих пиляків.

3. Літературний огляд

Серед інших злаків жито (*Secale cereale* L.) вважається не достатньо відгучним до культури ізольованих пиляків *in vitro* видом. З літературних джерел відомо, що для культури ізольованих пиляків та мікроспор *in vitro* жита розроблено та описано особливості проходження перших етапів індукції мікроспор в культурі ізольованих пиляків, формування калусів, ембріодогенез, регенерація зелених рослин та рослин по типу «альбіно». Всі ці процеси детерміновано «генотипом» і немає універсального живильного середовища для будь якого житнього генотипу [1–3].

Здатність генотипів жита до культури ізольованих пиляків є кількісно спадковою рисою і кодується ядерними генами та цитоплазматичними факторами [4]. Співвідношення та взаємозв'язок таких показників, як індукція новоутворень, регенерація альбіно та зелених рослин успадковуються незалежно [5, 6]. 3RL та 5R хромосоми жита пов'язані з індукцією новоутворень, в той час як 1R 4R 6 RS пов'язані зі здатністю до генерації [7]. Утворення рослин по типу «альбіно» пов'язано з великими делеціями в пластидах ДНК і невеликою кількістю рибосомальної РНК, яка впливає на синтез їх білків [8].

В Україні розробок у біотехнологічному напрямку з отримання дигаплоїдних рослин жита, із використанням культури ізольованих пиляків не проводили, хоча необхідність у цих роботах є.

4. Матеріали та методи дослідження

У роботу з тестування гаплопродукційної здатності залучено чотири генотипи озимого жита: № 24, № 25, № 36, № 37. Рослини вирощували в польових умовах Верхняцької дослідно-селекційної станції. Пагони з колоссям зрізали з донорних рослин та у сумці-холодильнику передавали для подальших досліджень в лабораторію культури тканин СГІ – НЦНС. Попередню обробку зрізаних пагонів проводили у воді протягом 3–5 діб за температури 2–4 °С у темряві.

Колосся поверхнево стерилізували розчином комерційного препарату «Білизна» з додаванням поверхнево-активної речовини TWIN 80 протягом 40–60 хв. Після зливали стерилізуючий агент та заливали колосся на 10 хв. 0,01 н розчином HCl. Наприкінці, п'ятиразово промивали матеріал стерильною дистильованою водою. Ізольовані пиляки висаджували на два варіанти живильного індукційного середовища – W14 та 190-2 [9, 10]. В обидва варіанти середовищ додавали наступні речовини: вітаміни за прописом MS, 2,4-D – 5 мг/л, кінетин – 0,5 мг/л, глютамін – 500 мг/л, мезоінозитол – 100 мг/л, 60 г/л мальтози, фітогель 3,2 г/л. [3]. Висаджені пиляки культивували перші 3 доби у темряві за температури 32 °С, надалі – при 28 °С до появи новоутворень.

Сформовані макроструктури пересаджували на середовище MS у половинній концентрації солей з додаванням ІОК – 0,5 мг/л та кінетин – 1,0 мг/л, 30 г/л сахарози [3] і культивували у темряві 3–4 тижня до появи центрів регенерації, далі – за температури 24 °С та умов 16-годинного фотоперіоду, інтенсивності освітлення 10 тис. люкс до формування рослин.

Цитологічний контроль стадії розвитку мікроспор у пиляках проводили шляхом приготування тимчасових мікропрепаратів пиляків, забарвлених оцетокарміном [11].

5. Результати досліджень

Слід зазначити, що на теренах України дослідження в галузі біотехнології з отримання *in vitro*

гаплоїдів жита є поодинокими. За результатами опрацювання літературних джерел щодо даної проблеми, нами обрано для використання в роботі оригінальну методику дослідників з Фінляндії [12]. Кліматичні відмінності нашого регіону зумовлюють специфічні умови вирощування жита в Україні, і як, наслідок – створення унікальних генотипів, пристосованих до нашого регіону, які по-іншому реагуватимуть на умови культивування пиляків *in vitro*, надані у протоколах дослідників з інших країн. Отже, наші дослідження були спрямовані на тестування ефективності відомих методик у наших умовах експерименту.

Відомо, що для успішного андрогенезу *in vitro* оптимальною є середньо-пізня стадія розвитку вакуолізованої одноядерної мікроспори (рис. 1). Цитологічний контроль стадії розвитку мікроспор у показав, що лише третина переданого рослинного матеріалу була в оптимальній фазі розвитку (рис. 1, а), тоді як більшість мікроспор досліджених генотипів були вже дво- та триядерними, тобто розвивалась далі за гаметофітним шляхом (рис. 1, б).

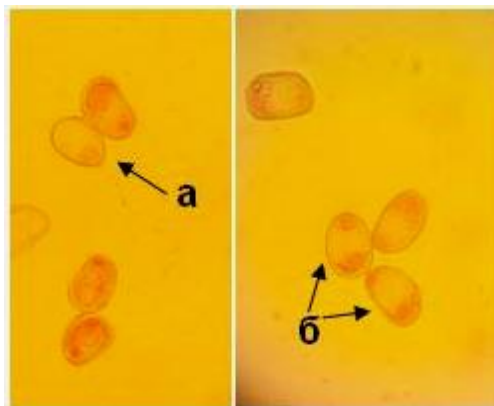


Рис. 1. Мікроспори у пиляках жита до попередньої обробки колосся (збільшення 200х): а – одноядерна мікроспора; б – двох ядерні мікроспори

Слід зазначити, що весь наданий рослинний матеріал жита був вкрай інфікованим за умов дощової погоди під час добору у полі, тому з метою визначення оптимального терміну стерилізації, ми випробували три варіанти часу стерилізації колосся – протягом 40, 50 та 60 хвилин (табл. 1).

Таблиця 1

Добір умов стерилізації колосся жита озимого

| Генотип \ Стерилізація | № 24 | № 25 | № 36 | № 37 |
|------------------------|-----------------------|--------------|--------------|--------------|
| 40 хв. | 680 100 % | 721 100 % | 730 100 % | 646 100 % |
| 50 хв. | 848 92 % | 789 97 % | 754 95 % | 670 98 % |
| 60 хв. | 690 72 % | 725 79 % | 671 67 % | 758 87 % |
| Примітка – | Висаджено пиляків, шт | | Інфекція % | |

Ступінь бактеріального інфікування колосся жита був над-значним. Так, стерилізація за стандартною методикою [13] виявилась непридатною (табл. 1, 40 хв.) – весь матеріал інфікувався. Збільшення часу впливу стерилізуючого агенту до 50 хв. та години дозволило отримати «чисту» культуру пиляків жита (рис. 2). Однак, пропорційно зі збільшенням часу стерилізації зростає вірогідність негативного впливу хлору на мікроспори у пиляках, що позначається на їхній морфогенній активності за андрогенезу.



Рис. 2. Пиляки жита № 37 на живильному середовищі

З метою виявлення найбільш придатного для культивування пиляків жита озимого живильного середовища проводили цитологічне дослідження стану мікроспор на 15 добу культивування. Відмічено, що для мікроспор більшості генотипів характерним був слабкий тургор та частковий плазмоліз. На п'ятнадцяту добу культивування відмічали повний лізис вмісту більшої частини мікроспор усіх генотипів на обох живильних середовищах (рис. 3).

Однак у зразків жита № 24, № 25 та № 36 серед порожніх клітин-мікроспор, мікроспор із ознаками плазмолізу (пл) спостерігали добре забарвлені оцтокарміном багатоядерні (БЯ) та багатоклітинні (Бкл) утворення, тоді як у жита за № 37 подібних явищ не спостерігали. Частота зустрічальності багатоядерних та багатоклітинних мікроспор за культивування на обох досліджених живильних середовищах була однаковою, тому виділити жодне не можливо. Надалі, отримані результати щодо формування новоутворень, підтвердили дані цитологічного дослідження.

За результатами оцінки морфогенетичної активності мікроспор чотирьох генотипів жита показа-

на досить висока чутливість трьох форм (крім жита за № 37) до наданих умов культивування пиляків *in vitro*. Слід відмітити, що значний рівень формування новоутворень отримали як на одному, так і на другому живильному середовищі (табл. 2).

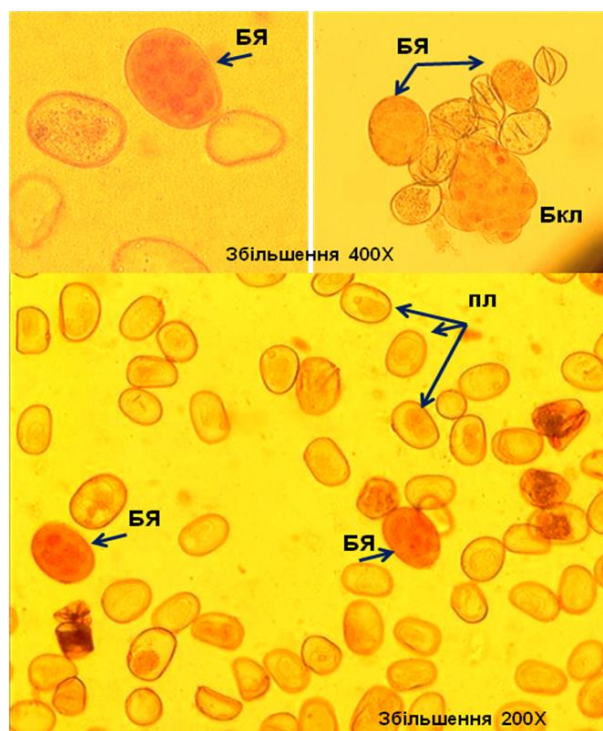


Рис. 3. Мікроспори жита після 15 доби культивування *in vitro* на живильному середовищі 190-2: БЯ – багатоядерна мікроспора; Бкл – багатоклітинне утворення; пл – плазмоліз

Найвищий рівень формування новоутворень середовище 190-2 спостерігали у жита № 24 – $21,52 \pm 3,27$ шт./на 100 пиляків, а на середовищі W14 у зразка жита № 36 – $8,22 \pm 3,21$ шт./на 100 пиляків. Загалом, середовище 190-2 було більш ефективним щодо проходження перших етапів андрогенезу: новоутворення отримали від 3 з 4 досліджених генотипів, тоді як на живильному середовищі W14 – лише від двох.

Регенерація була дуже незначною. Всього отримано 5 альбіносних рослин-регенерантів від двох генотипів (табл. 2, рис. 4).

Таким чином, можна зробити висновок, що отримані результати є позитивними. За цитологічним дослідженням першого етапу андрогенезу в культурі пиляків наданих генотипів жита показано, що запропоновані методичні підходи дозволяють отримувати новоутворення, здатні до подальшої регенерації. Проблема одержання нормальних рослин, а не лише альбіносів, планується вирішувати наступним чином: по-перше, взяттям в культуру пиляків із мікроспорами в оптимальній стадії розвитку; по-друге, добором поживних середовищ для регенерації різного гормонального складу.

Таблиця 2

Ефективність морфогенезу в культурі пиляків *in vitro* жита озимого

| Генотип | Живильне середовище | Кількість пиляків | Кількість новоутворень | | Кількість рослин-регенерантів (альбіно) | |
|---------|---------------------|-------------------|------------------------|---------------------|---|---------------------|
| | | | шт. | шт./ на 100 пиляків | шт. | шт./ на 100 пиляків |
| № 24 | 190-2 | 158 | 34 | 21,52±3,27* | 2 | 1,27±0,89 |
| № 25 | | 108 | 12 | 11,11±3,02 | 3 | 2,78±1,58 |
| № 36 | | 186 | 13 | 6,99±1,87 | – | – |
| № 37 | | 23 | 0 | 0 | – | – |
| № 24 | W 14 | 103 | 0 | 0 | – | – |
| № 25 | | 68 | 3 | 4,41±2,49 | – | – |
| № 36 | | 73 | 6 | 8,22±3,21 | – | – |
| № 37 | | 89 | 0 | 0 | – | – |

Примітка: * – достовірно при $p \leq 0,01$

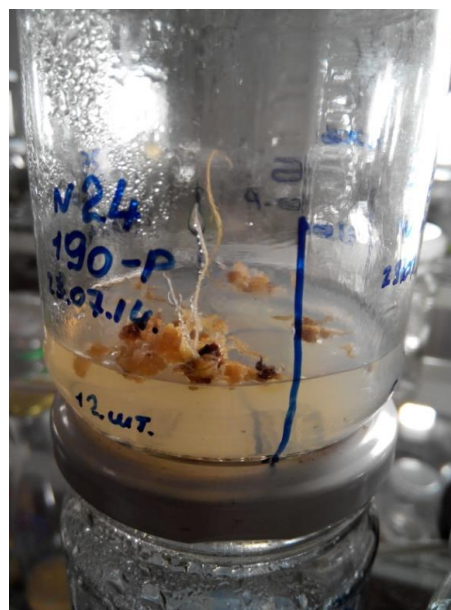
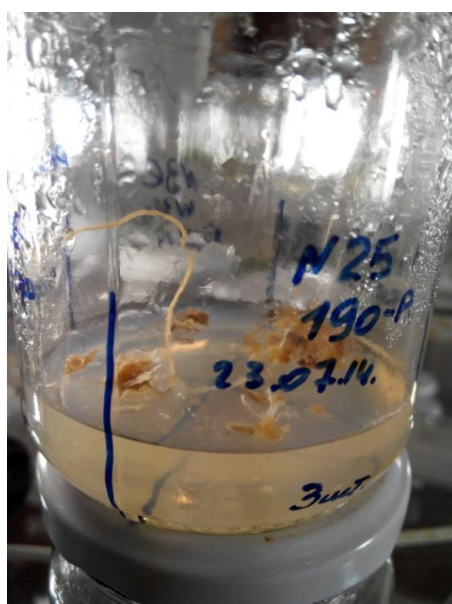


Рис. 4. Новоутворення та хлорофілдефектні рослини-регенеранти, отримані на живильному середовищі 190-2 в культурі пиляків жита озимого

6. Висновки

В культурі *in vitro* пиляків жита озимого в даних умовах експерименту три генотипи з чотирьох виявились чутливими до андрогенезу *in vitro* – № 24, 25, 36. Найвищими показниками морфогенетичної здатності (кількість новоутворень) характеризувались генотип № 24 – 21,52±3,27 шт./на 100 пиляків. Показано, що обидва живильні середовища 190-2 та W14 придатні для отримання новоутворень в культурі пиляків жита озимого української селекції. Отримано п'ять альбіносних рослин-регенерантів.

Література

1. Deimling, S. Haploidy in rye [Text] / S. Deimling, T. Flehighaus-Roux; In: M. S. Jain, S. K. Sopory, R. E. Veilleux (Eds.). – Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture, 1997. – P. 181–204. doi: 10.1007/978-94-017-1862-2_10

2. Rakoczy-Trojanowska, M. The influence of genotype and medium of rye (*Secale cereale* L.) anther culture [Text] / M. Rakoczy-Trojanowska, M. Smiech, S. Malepszy // Plant Cell Tissue Organ Culture. – 1997. – Vol. 48. – P. 15–21.

3. Immonen, S. Media composition and anther plating for production of androgenic green plants from cultivated rye (*Secale cereale* L.) [Text] / S. Immonen, H. Anttila // Plant

Physiology. – 2000. – Vol. 156, Issue 2. – P. 204–210. doi: 10.1016/s0176-1617(00)80307-7

4. Bolibok, H. Genetic mapping of QTLs for tissue culture response in plants [Text] / H. Bolibok, M. Rakoczy-Trojanowska // Euphatica. – 2006. – Vol. 149, Issue 1-2. – P. 73–83. doi: 10.1007/s10681-005-9055-6

5. Zheng, M. Y. Microspore culture in wheat (*Triticum aestivum*) – doubled haploid production via induced embryogenesis [Text] / M. Y. Zheng // Plant Cell Tissui Org. Cult. – 2003. – Vol. 73. – P. 213–230.

6. Agache, S. Studies of the genetic relationship between anther culture response and somatic tissue culture abilities in wheat [Text] / S. Agache, J. De Buyser, Y. Henry, J. Snape // Plant Breeding. – 1988. – Vol. 100, Issue 1. – P. 26–33. doi: 10.1111/j.1439-0523.1988.tb00213.x

7. Grobe, D. Mapping of genes for anther culture ability in rye by molecular markers [Text] / D. Grobe, S. Deimling, H. Geiger // Vortr. Pflanzenzuchtg. – 1996. – Vol. 35. – P. 282–283.

8. Logue, S. Genetic stability in microspore-derived doubled haploids [Text] / S. Logue; In: M. S. Jain, S. K. Sopory, R. E. Veilleux (Eds.). – Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture, 1996. – P. 1–51. doi: 10.1007/978-94-017-0477-9_1

9. Ouyang, J. A new synthetic medium (W14 medium) for wheat anther culture [Text] / J. Ouyang, S. Jia, C. Zhang, X. Chen, G. Feng. – Annual Report, Institute of Genetics, Academia Sinica, 1989. – P. 91–92.

10. Wang, X. The effect of potato II medium for tritica le anther culture [Text] / X. Wang, H. Hu // Plant Science Letters. – 1984. – Vol. 36, Issue 3. – P. 237–239. doi: 10.1016/0304-4211(84)90175-5

11. Паушева, З. П. Практикум по цитологии растений [Текст]: учебник / З. П. Паушева. – М.: Агропромиздат, 1988. – 270 с.

12. Tenhola-Roininen, T. Rye doubled haploids [Text] / T. Tenhola-Roininen. – Finland, 2009. – 93 p.

13. Лукьянюк, С. Ф. Методы культуры тканей и органов в селекции растений [Текст] : метод. реком. / С. Ф. Лукьянюк, С. А. Игнатова. – Одесса, 1980. – 21 с.

References

1. Deimling, S., Jain, M. S., Sopory, S. K., Veilleux, R. E. Flehighaus-Roux, T. (1997). Haploidy in rye. Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture, 181–204. doi: 10.1007/978-94-017-1862-2_10

2. Rakoczy-Trojanowska, M., Smiech, M., Malepszy, S. (1997). The influence of genotype and medium of rye (*Secale cereale* L.) anther culture. Plant Cell Tissue Organ Culture, 48, 15–21.

3. Immonen, S., Anttila, H. (2000). Media composition and anther plating for production of androgenic green plants from cultivated rye (*Secale cereale* L.). Plant Physiology, 156 (2), 204–210. doi: 10.1016/s0176-1617(00)80307-7

4. Bolibok, H., Rakoczy-Trojanowska, M., Bolibok, H. (2006). Genetic mapping of QTLs for tissue culture response in plants. Euphatica, 149 (1-2), 73–83. doi: 10.1007/s10681-005-9055-6

5. Zheng, M. Y. (2003). Microspore culture in wheat (*Triticum aestivum*) – doubled haploid production via induced embryogenesis. Plant Cell Tissue Organ Culture, 73, 213–230.

6. Agache, S., De Buyser, J., Henry, Y., Snape, J. (1988). Studies of the genetic relationship between anther culture response and somatic tissue culture abilities in wheat. Plant Breeding, 100 (1), 26–33. doi: 10.1111/j.1439-0523.1988.tb00213.x

7. Grobe, D., Deimling, S., Geiger, H. (1996). Mapping of genes for anther culture ability in rye by molecular markers. Vortr. Pflanzenzucht, 35, 282–283.

8. Logue, S.; Jain, M. S., Sopory, S. K., Veilleux, R. E. (Eds.) (1996). Genetic stability in microspore-derived doubled haploids. Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture, 1–51. doi: 10.1007/978-94-017-0477-9_1

9. Ouyang, J., Jia, S., Zhang, C., Chen, X., Feng, G. (1989). A new synthetic medium (W14 medium) for wheat anther culture. Annual Report, Institute of Genetics, Academia Sinica, 91–92.

10. Wang, X., Hu, H. (1984). The effect of potato II medium for tritica le anther culture. Plant Science Letters, 36 (3), 237–239. doi: 10.1016/0304-4211(84)90175-5

11. Pausheva, Z. P. (1988). Workshop on cytology plants: Textbook [for students of High school]. Moscow: Агропромиздат, 270.

12. Tenhola-Roininen, T. (2009). Rye doubled haploids. Finland, 93.

13. Lukyanyuk, S. F., Ignatova, S. A. (1980). Methods for tissue and organ culture in plant breeding. Methodical recommendations. Odessa, 21.

Дата надходження рукопису 18.02.2015

Замбріборщ Ірина Сергіївна, кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник, Лабораторія культури тканин, Селекційно-генетичний інститут Національного центру насіннезнавства та сортовивчення, Овідіопольська дор., 3, м. Одеса, Україна, 65036
E-mail: izambriborsh@gmail.com

Шестопал Оксана Леонідівна, кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник, Лабораторія культури тканин, Селекційно-генетичний інститут Національного центру насіннезнавства та сортовивчення, Овідіопольська дор., 3, м. Одеса, Україна, 65036
e-mail: oksana_shestopal@mail.ru

Ігнатова Світлана Олександрівна, доктор біологічних наук, професор, зав. лабораторії культури тканин, Селекційно-генетичний інститут Національного центру насіннезнавства та сортовивчення, Овідіопольська дор., 3, м. Одеса, Україна, 65036
E-mail: ignatova_sa@mail.ru

Мазур Зоя Олександрівна, кандидат сільськогосподарських наук, старший науковий співробітник, Відділ селекції та насінництва, смт. Верхнячка, Христинівського р-ну, Черкаської обл., Україна, 20022
E-mail: zoya.mazur777@gmail.com

УДК 612.821:159.921

DOI: 10.15587/2313-8416.2015.39179

ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ ПРАВО- ТА ЛІВОРУКОСТІ СТУДЕНТІВ НА ЇХНЮ НАВЧАЛЬНУ УСПІШНІСТЬ

© О. В. Тимчик, Є. О. Неведомська

В статті розглядається вплив право- та ліворукості студентів на їхню навчальну успішність. Отримані результати свідчать, що для адекватного, тривалого та повноцінного засвоєння матеріалу навчальної дисципліни необхідно враховувати психофізіологічні особливості студентів, зокрема, право- і ліворукість, та більше працювати над засвоєнням навчальної програми з останніми. В майбутньому, подальше вивчення психофізіологічних особливостей студентів та врахування їх при засвоєнні навчального предмета допоможе більш повноцінно опанувати матеріал дисципліни

Ключові слова: ліворукість, праворукість, успішність, психофізіологічні особливості, асиметрія мозку, емоційний стан