

Генетика, селекція, біотехнологія

УДК 633.16.631.527:576.535
© 2010

В.В. Кириченко,
академік УААН

О.В. Білинська,
кандидат
біологічних наук

Інститут рослинництва
ім. В.Я. Юр'єва УААН

ЗАСТОСУВАННЯ КУЛЬТУРИ ПИЛЯКІВ IN VITRO У СЕЛЕКЦІЇ ЯЧМЕНЮ ЯРОГО

Розглянуто можливості використання методів експериментальної гаплоїдії для прискорення селекційного процесу. Наведено основні результати досліджень з розробки технології отримання гаплоїдів ярого ячменю у культурі пиляків in vitro та оцінки ліній подвоєних гаплоїдів у системі селекційних розсадників.

Відомо, що збереження сортами самозапильних рослин одноманітності і константності під час розмноження є обов'язковою вимогою UPOV (Міжнародного союзу з охорони нових сортів рослин), яка реалізується у вигляді DUS-тесту [9]. З огляду на це у традиційній селекції, яка ґрунтується на міжсортівній гібридизації і доборі у гібридних популяціях родоначальних рослин з подальшою оцінкою їхнього насінневого потомства, перевагу надають добору в 5—6-му поколінні гібридів замість 3—4-го, що забезпечує більший ступінь гомозиготності ліній і нових сортів, хоча й збільшує термін створення сорту до 12—15 років [18]. Для досягнення однорідності, а отже гомозиготності ліній, у селекції на гетерозисі у перехреснозапильних культур проводять багаторічний інбридинг [10]. Істотно зростають вимоги до гомозиготності сортів і ліній сільськогосподарських культур у зв'язку з розробкою їхніх молекулярно-генетичних паспортів для захисту авторських прав оригінаторів [1].

Найефективнішим шляхом прискореного створення гомозиготного матеріалу є застосування методів експериментальної гаплоїдії, які дають змогу одержувати константні гомозиготні лінії на основі F_1 — F_2 гібридних поколінь, завдяки чому на 3—5 років скорочується тривалість селекційного процесу, а також зменшується його трудомісткість і підвищується надійність оцінки матеріалу [14].

Слід зазначити, що за використання методів експериментальної гаплоїдії у світі створено близько 200 сортів 11 сільськогосподарських культур, у тому числі 99 сортів ячменю [11, 13, 19]. У Канаді, Німеччині, Фінляндії, Австралії, Польщі, Іспанії, Росії, Україні досягнуто вагомих результатів з теоретичних питань експериментальної гаплоїдії і

розробки технологій гаплоїдної селекції ячменю (DH-технології), яка у цих країнах стала складовою частиною багатьох селекційних програм.

Крім прискорення селекційного процесу, механізм індукції гаплоїдів, гомозиготний статус отриманого матеріалу і особливості розщеплення у популяціях подвоєних гаплоїдів дають змогу істотно підвищити ефективність експериментального мутагенезу, генетичного аналізу, маркерної селекції, генетичної трансформації (рис. 1).

Серед методів експериментальної гаплоїдії найбільшого поширення набули культура пиляків і культура ізольованих мікроспор *in vitro*. У цих експериментальних системах утворення гаплоїдів відбувається завдяки стимулюванню аномального багаторазового поділу мікроспор (клітин, з яких *in vivo* в результаті 2-х мітозів формується 3-клітинний пилок) з подальшим розвитком ембріоїдів або калюсу і регенерацією з цих структур рослин.

Андрогенні гаплоїди отримано у 250 видів вищих рослин, включаючи практично усі економічно важливі види [17]. Досліджено основні чинники експериментального андрогенезу *in vitro*, до яких належать: генотип рослин-донорів пиляків, умови їхнього вирощування, фаза розвитку мікроспор, попередня обробка за різних температурних режимів із застосуванням фізіологічно та осмотично активних речовин, склад штучних живильних середовищ, умови культивування експлантів, отриманих новоутворень і рослин-регенерантів. Однак, незважаючи на більш ніж 40-річний період досліджень цих чинників і наявність численних методичних розробок, основними проблемами залишаються генотипна залежність ефективності експериментального андрогенезу *in vitro*, низький вихід андрогенних

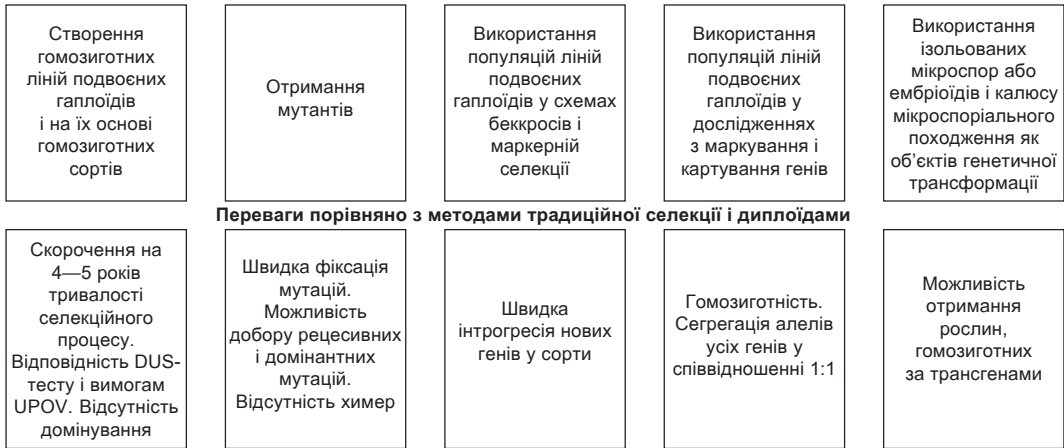


Рис. 1. Застосування методів експериментальної гаплоїдії у селекції і генетичних дослідженнях

структур і рослин-регенерантів, а для злаків (ячмінь, пшениця та ін.) — високий відсоток серед регенерантів хлорофілдефектних рослин, переважно альбіносів.

Оскільки застосування культури пиляків *in vitro* у селекції вважається доцільним лише за умов високої ефективності і можливості одержання достатньої кількості гомозиготних ліній від довільної комбінації схрещування, очевидними є потреба поглибленого вивчення регуляторних механізмів морфогенезу та розробка технологій гаплоїдної індукції, які б забезпечували високий і стабільний вихід рослин-регенерантів.

В Інституті рослинництва ім. В.Я. Юр'єва УААН дослідження в галузі експериментального андрогенезу *in vitro* започатковано у 1988 р. з ініціативи завідувача відділу селекції, генетики і біотехнології ячменю, доктора с.-г. наук, професора В.Т. Манзюка. Упродовж 20 років проведено комплексні дослідження, в результаті яких розроблено надійну і легко відтворювану методику одержання асептичної культури пиляків *in vitro*, оптимізовано температурно-світлові режими вирощування донорських рослин і рослин-регенерантів в умовах штучного клімату та попередньої низькотемпературної обробки колосся, удосконалено склад штучних живильних середовищ для культивування пиляків, новоутворень і регенерації рослин [3, 6, 12].

Як оптимальний для вирощування рослин-донорів пиляків ярого ячменю в умовах штучного клімату було запропоновано режим, який характеризується поєднанням дещо зниженої температури (12°C) і високої освітленості (35 клк) протягом усього вегетаційного періоду при фотоперіоді 16 год. Доведено, що вирощування вихідного матеріалу в польових умовах (весняний, підосінній посів) доцільно проводити на ділянках зі штучним поливом, а при плануванні експериментів враховувати, що найсприятливішими є

роки з помірною температурою повітря і достатнім зволоженням у період фаз куціння, виходу у трубку та колосіння [3].

На основі вивчення впливу на ефективність калюсо-, ембріодогенезу і регенерації рослин у культурі пиляків *in vitro* мінеральних компонентів штучного живильного середовища, якісного і кількісного складу вуглеводів, комплексу фізіологічно активних речовин розроблено штучне живильне середовище NMSmod.2 [3, 4, 7], яке не поступається кращим середовищам, рекомендованим для культивування *in vitro* пиляків та ізованих мікроспор ячменю [15, 16].

Результати багаторічних досліджень узагальнено у вигляді технологічної схеми, яка дає змогу залежно від генотипу вихідного матеріалу одержувати одним працівником за сезон 150—300 зелених рослин-регенерантів (за середньої частоти їх регенерації на рівні 2—6%) і 100—250 ліній подвоєних гаплоїдів.

Подальші дослідження було спрямовано на оптимізацію попередньої обробки рослинного матеріалу за низької позитивної температури як засобу, який допомагає не лише сповільнити процес розвитку мікроспор, а й стимулює андрогенез *in vitro* та вивчення можливості використання хімічно модифікованих і природних крохмалів як гелеутворюючих компонентів штучних живильних середовищ.

Найрезультативнішою виявилася попередня обробка колосся у 0,3 М розчині при 4°C протягом 10—12 діб, яка сприяла багаторазовому підвищенню частоти регенерації зелених рослин у модельних генотипів. При застосуванні зазначеного методичного прийому на гібридному матеріалі вихід зелених рослин збільшився у середньому з 6,2 до 11,2% від числа культивованих пиляків [6].

Зростанню частоти регенерації зелених рослин та їхньої життєздатності сприяла заміна агар-

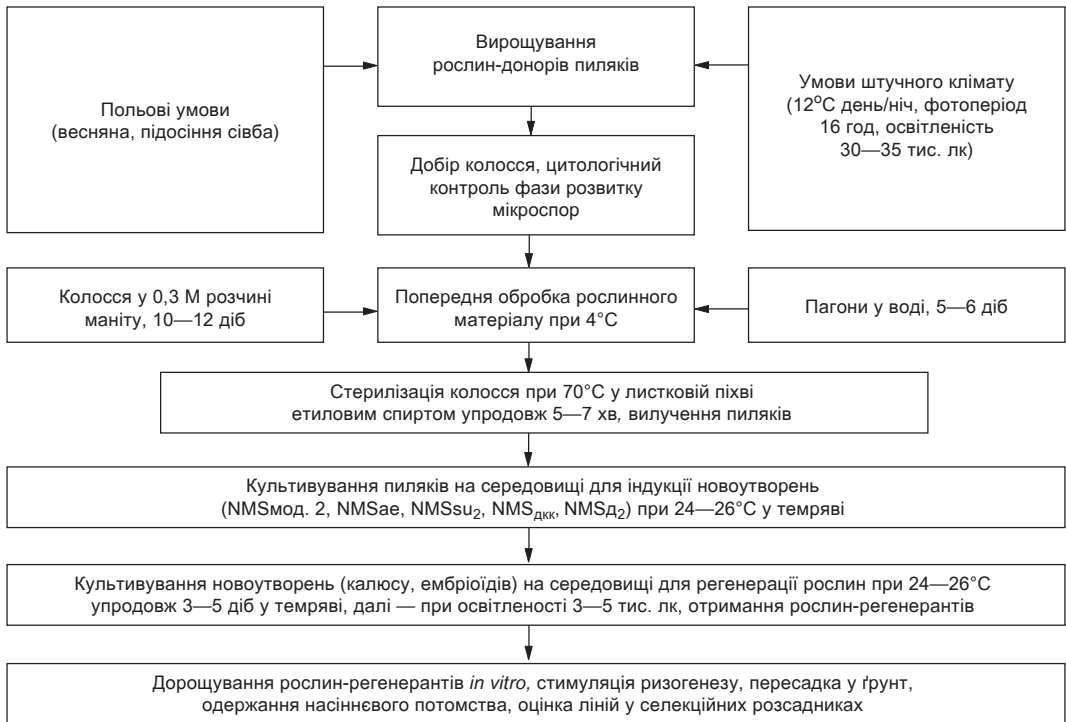


Рис. 2. Технологічна схема отримання ліній подвоєних гаплоїдів ячменю у культурі пиляків *in vitro*

агару хімічно модифікованими крохмаллями [2]. Та найвагоміші результати одержано при використанні у складі індукційного живильного середовища природних кукурудзяних крохмалів з підвищеним вмістом амілози, виділених із зерна ліній-носіїв мутантних генів *ae* і *su₂* [12]. Зокрема, встановлено, що на крохмалевмісному середовищі у генотипу з генетично детермінованою високою здатністю до андрогенезу *in vitro* ДГ00-126 частота регенерації зелених рослин сягала 53,4%, водночас на контролі (середовище з агар-агаром) цей показник був на рівні 25,6% (НІР₀₅=5,4). У сорту Фенікс, якому притаманна низька здатність до андрогенезу *in vitro*, завдяки заміні агар-агару на *su₂*-крохмаль досягнуто збільшення частоти регенерації зелених рослин з 0,6 до 15,8%. У середньому для 3-х генотипів з контрастною здатністю до андрогенезу *in vitro* вихід зелених рослин становив 29 при 10,9% на контролі.

Наведені результати досліджень дають змогу очікувати істотного зростання виходу зелених рослин (принаймні до 20% числа культивованих пиляків, або 20 шт. з 2—3-х суцвіть) і при роботі з генетично різноманітним гібридним матеріалом, що сприятиме не лише збільшенню кількості ліній, отриманих у межах кожної комбінації, а й залученню значної кількості комбінацій. Удосконалено схему одержання гаплоїдів ячменю, яка реко-

мендується для прискореного створення вихідного матеріалу в селекції ярого ячменю (рис. 2).

З огляду на спадковий характер генотипної залежності експериментального андрогенезу *in vitro* важливим резервом збільшення ефективності методу є залучення до гаплоїдної селекції гібридів, батьківські форми яких мають високу здатність до утворення калюсу, ембріодів і рослин-регенерантів у культурі пиляків *in vitro* [18]. Оцінка понад 100 сортів і ліній ярого ячменю вітчизняної та зарубіжної селекції виявила генотипи, які поєднують певні біологічні та господарсько цінні ознаки (безостість, голозерність, *wx*, стійкість до хвороб, урожайність, адаптивність) з високими гаплопродукційними показниками, що відкриває широкі можливості для використання гаплоїдів у спеціальних селекційних програмах.

Результати впровадження розробленої технології у селекційний процес свідчать про зростання гаплопродукційних показників залежно від удосконалення її елементів і наявність серед ліній подвоєних гаплоїдів зразків, які є конкурентоспроможними з матеріалом, створеним методами традиційної селекції [8].

Зокрема, у 1996—2006 рр. у системі селекційних розсадників вивчали понад 1000 ліній ячменю ярого андрогенного походження. Кращі за комплексом господарсько цінних ознак лінії про-

ходили оцінку у контрольному розсаднику (505 ліній) і попередньому сортовипробуванні (110 ліній). У контрольному розсаднику 96 ліній перевищили національні стандарти за урожаєм зерна на 3—43%. У попередньому сортовипробуванні 27 ліній перевищили стандарт на 4—62%. За даними відділу селекції і генетики ячменю,

лінії ДГ01-140 і ДГ02-279(646), створені на основі гібридів F₁ від схрещування плівчастих і голозерних сортів, у попередньому і конкурсному сортовипробуваннях перевищили стандарти на 15—19%. Для ліній, створених у межах цієї програми добром у F₃—F₄ гібридних поколіннях, перевищення над стандартом становило 5—10%.

Висновки

На основі комплексного вивчення чинників експериментального андрогенезу *in vitro* розроблено технологію одержання гаплоїдів і ліній подвоєних гаплоїдів ярого ячменю. Обґрунтовано доцільність використання гаплої-

дної технології у спеціальних селекційних програмах. Створено константні ДГ-лінії, які за урожаєм зерна у попередньому і конкурсному сортовипробуваннях перевищують стандарт на 15—19%.

Бібліографія

1. Бальвинская М.С., Roder M., Сиволап Ю.М. SSRP-анализ молекулярно-генетического полиморфизма сортов ярового ячменя южноукраинской селекции//Докл. Рос. академии с.-х. наук. — 2001. — № 5. — С. 3—7.
2. Беллинская Е.В., Дульнев П.Г. Модифицированный крахмал как компонент питательной среды для получения гаплоидов ячменя в культуре пыльников *in vitro*//Физиология и биохимия культурных растений. — 2007. — 39, № 2. — С. 136—143.
3. Білінська О.В. Генотипові особливості індукції гаплоїдів ячменю (*H. vulgare* L.) методом культури пиляків *in vitro*: Автореф. дис. ... канд. біол. наук. — Харків, 1997. — 19 с.
4. Білінська О.В. Культура пиляків *in vitro* як метод одержання вихідного матеріалу в селекції ячменю//Теоретичні основи селекції польових культур: Зб. наук. праць. — Харків: Ін-т рослинництва ім. В.Я. Юр'єва, 2007. — С. 174—186.
5. Білінська О.В. Особливості застосування культури пиляків *in vitro* для створення вихідного матеріалу в селекції ячменю//Наук. вісн. НАУ. — 2006. — № 100. — С. 13—19.
6. Білінська О.В. Підвищення ефективності експериментального андрогенезу *in vitro* у ячменю шляхом оптимізації попередньої обробки колосся в умовах низької позитивної температури//Фактори експериментальної еволюції організмів. — Т. 3. — К.: Логос, 2006. — С. 437—441.
7. Білінська О.В., Весна С.В., Манзюк В.Т. Застосування культури пиляків *in vitro* для створення вихідного матеріалу в селекції голозерного ячменю//Селекція і насінництво. — 2002. — Вип. 86. — С. 164—172.
8. Білінська О.В., Манзюк В.Т., Козаченко М.Р., Василько Н.І. Біотехнологія одержання гаплоїдів ячменю і її використання для прискорення селекційного процесу//Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології: Зб. наук. праць. — К.: Логос, 2007. — Т. 2. — С. 448—452.
9. Бочкарев А.Н. Методологические основы реформирования сортоиспытания с учетом международных стандартов//Тез. докл. междунар. симп. «Ме-

- тодологические основы формирования, ведения и использования коллекций генетических ресурсов растений» (2—4 октября 1996 г.). — Харьков, 1996. — С. 7.
10. Деревянко В.П., Егоров Д.К. Актуальные вопросы гетерозисной селекции ржи. — Харьков, 2008. — 152 с.
11. Наволоцкий В.Д. Результаты селекции ячменя с использованием гаплоидии//Селекция ячменя на повышение адаптивности с целью увеличения и стабилизации урожая/Отв. ред. Ю.М. Сиволап. — Одесса: ВСГИ, 1990. — С. 19—27.
12. Пат. 34859 Україна, МПК А 01 G7/00, С 12 N5/00. Спосіб одержання гаплоїдів ячменю у культурі пиляків *in vitro*/О.В. Білінська, С.М. Тимчук, П.Г. Дульнев, О.Ю. Дербізова (Україна); Ін-т рослинництва ім. В.Я. Юр'єва. — № 200803639; Заявл. 21.03.08; Опубл. 26.08.08; Бюл. № 16. — 4 с.
13. Эмбриологические основы андроклинии пшеницы: атлас/Круглова Н.Н., Батыгина Т.Б., Горбунова В.Ю. и др.; отв. ред. И.И. Шамров. — М.: Наука, 2005. — 99 с.
14. Choo T.M., Reinbergs E., Kasha K.J. Use of haploids in breeding barley//Plant breeding review. — 1985. — V. 3. — P. 219—252.
15. Jähme-Gärtner A., Lörtz H. Protocols for anther and microspore culture of barley//Methods in Molecular Biology. — V. 111: Plant Cell Culture Protocols/Adit. R.D. Hall. — Totowa: Yumana Press Inc., 1995. — P. 269—271.
16. Kasha K.J., Simion E., Oro R., Yao Q.A., Hu T.C., Carlson A.R. An improved *in vitro* technique for isolated microspore culture of barley//Euphytica. — 2000. — 120, № 3. — P. 379—385.
17. Prakash J., Giles K.L. Induction and growth of Androgenic haploids//Intern. Rev Cytol. — 1987. — V. 107. — P. 273—292.
18. Simmonds N.W. How frequent are superior genotypes in plant breeding populations?//Biol. Rev. — 1989. — 64. — P. 341—365.
19. Thomas W.T.B., Forster B.P., Gertsson B. Doubled haploids in breeding//Doubled haploid production in crop plants. — Dordrecht: Kluwer academic publishers, 2003. — P. 337—349.