

УДК 57:606:631.1

Замбріборщ І.С.¹, Добрава Г.О.¹, Шестопап О.Л.¹, Ружицька О.М.²

ИНДУКЦИЯ НОВОУТВОРЕНЬ В КУЛЬТУРЕ ПИЛЯКІВ ТЕТРАПЛОЇДНОЇ ПШЕНИЦІ *TRITICUM DICOCCUM* (SCHRANK) SCHUEBL *IN VITRO*

¹ – Селекційно-генетичний інститут – Національний центр насіннєзнавства та сортовивчення, Овідіопольська дорога, 3, 65036, Одеса, Україна

² – Одеський національний університет ім. І.І. Мечникова, Дворянська, 2, 65000, Одеса, Україна

UDC 57:606:631.1

Zambriborsh I.S.¹, Dobrova H.O.¹, Shestopal O.L.¹, Rujitska O.M.²

INDUCTION OF NEW FORMATION IN *IN VITRO* ANTHER CULTURE *TRITICUM DICOCCUM* (SCHRANK) SCHUEBL

¹ – The Plant Breeding and Genetics Institute – National Center of Seed & Cultivar Investigation Odessa, Ovidiopolska road, 365036,

² – Odessa I.I. Mechnikov national university, Odessa, Dvoryanska street 2, 65000

Анотація. В роботі досліджено індукцію новоутворень ярих та озимих форм *Triticum dicoccum* на різних поживних середовищах в культурі пиляків *in vitro*.

Ключові слова: культура пиляків, *Triticum dicoccum*, індукція новоутворень, поживні середовища

Abstract. Induction of new formation on different cultural media for *Triticum dicoccum* was investigated.

Key words: anther culture, *Triticum dicoccum*, new formation induction, cultural media

Вступ. Гаплоїдні рослини широко застосовуються в таких галузях біотехнологічної науки як цитогенетика, молекулярна генетика, селекція

злакових культур [10]. За допомогою гаплоїдів досліджують мутагенез та генетичну трансформацію [5]. Особливу роль подвоєні гаплоїди відіграють в селекції пшениці, дозволяючи вести прямий добір не тільки домінантних, але і рецесивних ознак і істотно скоротити селекційний процес [9]. Для отримання подвоєних гаплоїдів твердої пшениці доцільно використовувати методи культури пиляків, ізольованих мікроспор, гіногенезу та гаплопродюсера [4].

На ефективність процесу формування подвоєних гаплоїдів впливають декілька факторів, зокрема генотип [6] та поживні середовища [11].

Першим етапом формування гаплоїдних рослин є індукція новоутворень. Мета роботи – оцінка впливу генотипу та поживного середовища на індукцію новотворень пшениці тетраплоїдної. Дослідження індукції новоутворень озимих та ярих форм *T. dicoccum* на території України проводиться вперше.

Матеріали і методи. Вивчали озимі та ярі форми тетраплоїдних двозернянок *Triticum dicoccum* (Schrank) Schuebl: *T. dicoccum* var *ruf* ярий та озимий, *T. dicoccum* var *atrat* озимий, *T. dicoccum* var *triccoccum* озимий, *T. dicoccum* var *dicoccum* ярий. Рослини вирощували на дослідних польових ділянках СГІ–НЦНС. Пиляки експлантували на поживні середовища, коли вакуолізовані мікроспори знаходились у середньо-пізній фазі розвитку (рис.1). Попередню обробку зрізаних пагонів проводили у водному розчині АБК (0,5 мг/л) протягом 3-5 діб при +2 – +4 °С у темряві [2, 3].

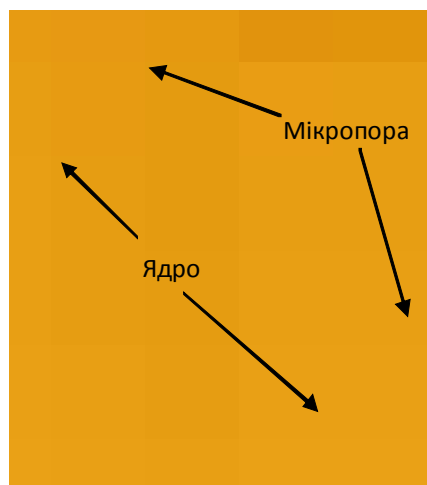


Рис. 1. Контроль стадії мікроспори перед висадкою колосся

Колосся поверхнево стерилізували насиченим розчином гіпохлориту кальцію за прийнятою методикою [1]. Пиляки експлантували на дев'ять варіантів агаризованих поживних середовищ для індукції новоутворень: 190-2 [11], BAD-1[10], C17 [6] та M42 [7], і модифікації цих поживних середовищ: C17н, C17В, СМ, М42н (Табл.1). За складом гормонів та джерел вуглецю середовища були ідентичними: 2,4-Д в концентрації 2 мг/л та кінетин в концентрації 0,5 мг/л. Джерело вуглеводів: сахароза (60 г/л) + глюкоза (17,5 г/л). Висаджені пиляки культивували перші 3 доби у темряві за температури +30 °С, далі при + 24 °С до появи новоутворень.

Результати та обговорення. *Модифікація поживних середовищ.* З метою добору оптимального живильного середовища на формування новоутворень були проведені модифікації базових поживних середовищ (табл.1).

Таблиця 1

Модифікація поживних середовищ для індукції новоутворень

Середовище	Макро- та мікроелементи	Вітаміни	Органічні кислоти	Амінокислоти
СМ	C17	M42	M42	+Глутамінова кислота – 400 мг/л +Пролін – 400 мг/л
СМн	C17	M42	½ M42 - піруват	+Глутамінова кислота – 400 мг/л +Пролін – 400 мг/л
M42н	M42	M42	½ M42 - піруват	_____
C17н	C17	C17	½ C17 - піруват	_____
C17В	C17	C17	½ C17 - піруват	BAD-1 +Глутамінова кислота – 400 мг/л +Пролін – 400 мг/л

Нами розроблено середовище СМ, яке за мінеральним складом аналогічне середовищу C17, а за складом вітамінів та органічних кислот – середовищу M42. В модифікованих середовищах СМн, C17н, C17В та M42н було вдвічі

знижено концентрацію органічних кислот. Середовище С17В додатково містило повний набір амінокислот за прописом ВAD-1. Також в модифіковані поживні середовища СМ, СМн, С17В додавали пролін та глютамін.

Індукція новоутворень Triticum dicoccum (Schrank) Schuebl.

Оцінювали рівень індукції новоутворень п'яти генотипів (озимі та ярі форми) тетраплоїдних двозернянок (рис.2-3) на різних поживних середовищах.

Виявлено, що озима форма *T. dicoccum var ruf* не чутлива до наданих умов культивування. Дві інші озимі форми дали новоутворення на середовищі ВAD-1 – $1,21 \pm 0,32$ шт. на 100 пиляків та $1,23 \pm 0,5$ шт. на 100 пиляків (рис.2).

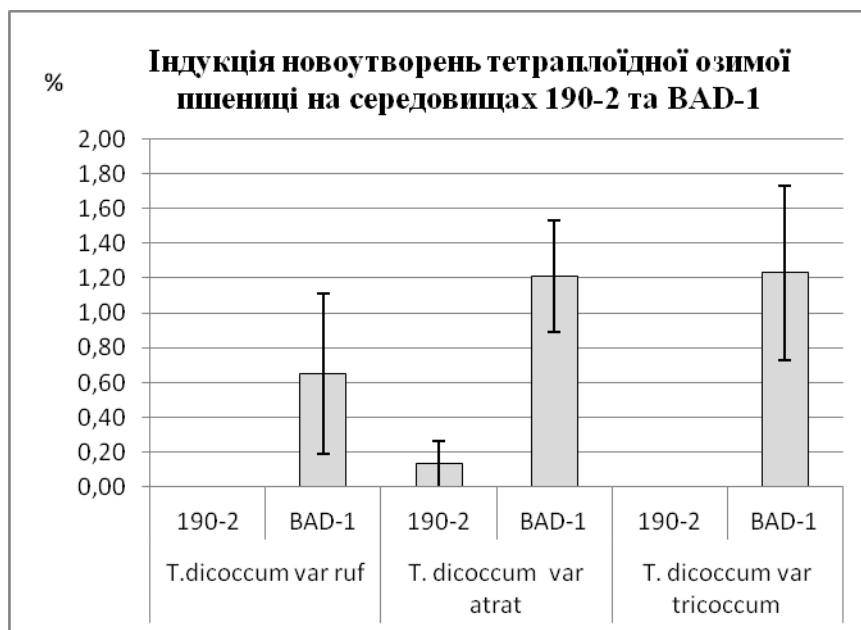


Рис 2. Індукція новоутворень пшениці тетраплоїдної озимої на середовищах 190-2 та ВAD-1

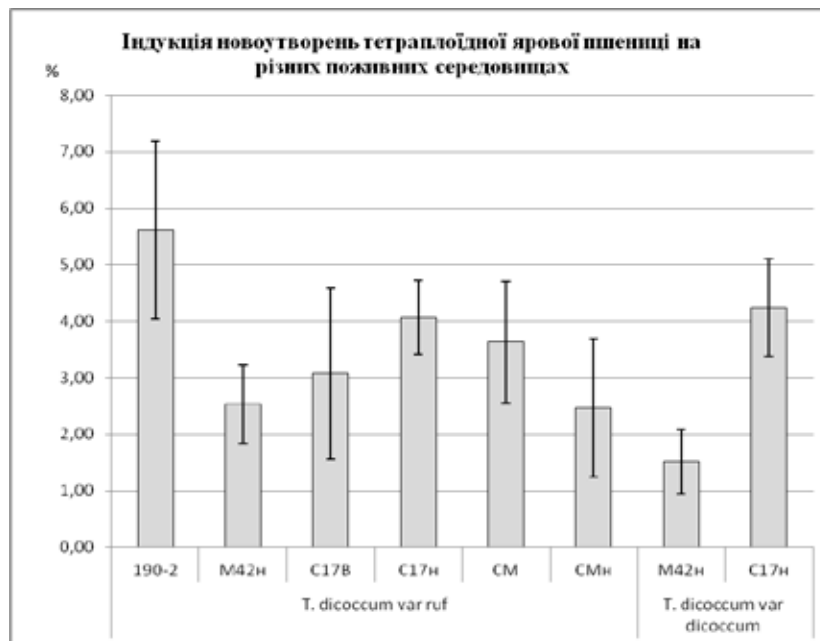


Рис 3. Індукція новоутворень пшениці тетраплоїдної ярої на різних поживних середовищах

Слід зазначити, що, на відміну від озимої, яра форма *T. dicoccum var ruf* виявилась чутливою до умов культивування і формувала новоутворення на різних поживних середовищах з частотою від $2,53 \pm 0.69$ до $5,61 \pm 1.57$ шт. на 100 пиляків. Причому максимальний рівень індукції спостерігали на середовищі 190-2. Яра форма *T. dicoccum var dicoccum* формувала новоутворення на обох протестованих середовищах (M42n та C17n) з частотою $1,52 \pm 0.57$ шт. на 100 пиляків та $4,24 \pm 0.86$ шт. на 100 пиляків відповідно (рис 3).

Заклучення. Виявили, що ярі форми *Triticum dicoccum* більш чутливі до умов культивування і формують новоутворення з частотою від $2,53 \pm 0.69$ до $5,61 \pm 1.57$ шт. на 100 пиляків. Визначені оптимальні поживні середовища: для озимих форм – ВAD-1, для ярих форм – 190-2 та модифіковане середовище C17n.

Література:

1. Ігнатова С.О., Жосонар М.В., Лобанова К.І., Шестопап О.Л. Отримання подвоєних гаплоїдів м'якої пшениці в культурі пиляків. Методичні рекомендації / Півден. біотехнолог. центр в рослин-ві УААН. – Одеса, 2008. – 12 с.

2. Лобанова К.І., Шестопал О.Л., Ігнатова С.О. Абсцизова кислота як екзогенний фактор підвищення регенераційного потенціалу в культурі пиляків м'якої пшениці // Вісник Харків. Націон. Аграрного Університету. – 2007. – Вип. 1 (10). – С.102-110.
3. Пат. 21988 України МПК (2006) А01Н1/06 Спосіб підвищення регенераційного потенціалу в культурі пиляків озимої м'якої пшениці / Ігнатова С. О., Лобанова К. І., Шестопал О. Л.; заявник і патентовласник Південний біотехнологічний центр в рослинництві УААН. – № у 200611658; заявка 6.11.06 ; опубл. 10.04.07, Бюл. № 4.
4. Ballesteros J., Castillo A.M., Cistue L., Llamas G., Martin A., Valles M.P. Double haploid technique in durum wheat. // Conxita Royo, Elias M. Elias / Durum wheat breeding. – 2009. – Vol. 3, № 1. – P. 199-226.
5. Folling L., Olesen A. Transformation of wheat (*Triticum aestivum* L.) microspore-derived callus and microspores by particle bombardment. // Plant Cell Rep. – 2002. – Vol. 20. – P. 629-636.
6. Foroughi-Wehr B., Zeller F.J. *In vitro* microspore reaction of different German wheat cultivars // Theor. Appl. Genet. – 1990 - Vol. 79.– P. 77–80.
7. Kao, K. N.; Saleem, M.; Abrams, S.; Pedras, S.; Horn, D.; Mallard, C. Culture conditions for induction of green plants from barley microspores by anther culture methods. // Plant Cell Reports. – 1991. – Vol. 9. – P. 595-607.
8. Nazan Daustu. Diallel analysis of anther culture response in wheat (*Triticum aestivum* L.) // African Journal of Biotechnology – 2008. – Vol. 7 (19). – P. 3419-3423.
9. Snape J. Doubled haploid breeding: theoretical basis and practical applications.//In: Mujeeb-Kazi A., L.A. Sitch. / Review of advances in plant biotechnology 1985-88: 2nd Int. Symp. Genet. Manipulation Crops. - Philippines. - 1989. – P. 19-30.
10. Touraev A., Forster B.P., Jain S.M. Advances in haploid production in higher plants. // Springer Science + Business Media B.V.: The Netherlands. – P. 1-208.

11. Trottier MC, Collin J, and Comeau A. Comparison of media further aptitude in wheat anther culture // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. – 1993. – №35. – P. 59-67

12. Wang X. The effect of potato II medium for triticales anther culture // *Plant Sci. Lett.* – 1984. – Vol. 36. – P. 237-239.