

маси (100 кДа). Низькомолекулярний хітозан (10 кДа) має здатність стимулювати ріст калюсних культур та регенерацію пагонів у концентрації 25 мкг/мл.

Исследовано влияние хитозана на рост и развитие каллусной ткани пшеницы. Показано, что процессы морфогенеза зависят от концентрации полисахарида в питательной среде и его молекулярной массы. Хитозан с молекулярной массой 10 кДа оказался более эффективным в сравнении с препаратом с большей молекулярной массой (100 кДа). Низкомолекулярный хитозан (10 кДа) имеет способность стимулировать рост каллусных культур и регенерацию побегов в концентрации 25 мкг/мл.

The effect of chitosan on the growth and development of callus tissue of wheat was investigated. It is shown, that processes of morphogenesis depend on concentration of polysaccharide in a nutrient medium and its molecular weight. Chitosan with molecular weight 10 kDa it has appeared more effective in comparison with a preparation high molecular weight (100 kDa). Low-molecular chitosan (10 kDa) has ability to stimulate growth callus cultures and regeneration of shoots in concentration 25 mkg/ml.

БІЛИНСЬКА О.В.

*Інститут рослинництва ім. В. Я. Юр'єва Української академії аграрних наук
Україна, 61060, Харків, проспект Московський, 142, e-mail: bilinska@ukr.net*

ПРОЯВ ГЕНОТИПНИХ ОСОБЛИВОСТЕЙ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО АНДРОГЕНЕЗУ IN VITRO У ЯЧМЕНЮ В ЗАЛЕЖНОСТІ ВІД ЕЛЕМЕНТІВ ТЕХНОЛОГІЇ ГАПЛОЇДНОЇ ІНДУКЦІЇ І УМОВ ВИРОЩУВАННЯ ДОНОРНИХ РОСЛИН

Численні літературні джерела, присвячені теоретичним і практичним аспектам культивування *in vitro* пиляків та ізольованих мікроспор ячменю і інших видів сільськогосподарських рослин, переконливо свідчать про те, що генотипна залежність гаплопродукційного процесу є найбільш серйозною перешкодою для широкого впровадження гаплоїдної технології у селекцію [1, 2]. З огляду на це, велика увага приділяється дослідженню генетичного контролю андрогенезу *in vitro* – явища, яке полягає у індукції багаторазового поділу мікроспор з подальшим формуванням калюсу, ембріоїдів і регенерації гаплоїдних рослин [3, 4].

Разом з тим встановлено, що ступінь завершеності морфогенетичної програми, яка „запускається” при андрогенезі *in vitro*, залежить від багатьох чинників негенетичної природи, зокрема, умов вирощування рослин-донорів пиляків, режиму і способу попередньої обробки колосся, складу штучного живильного середовища, температурно-світлового режиму культивування *in vitro* [5].

Вплив цих чинників є настільки очевидним, що деякі дослідники роблять припущення, згідно з яким причина генотипних відмінностей за здатністю продукувати андрогенні гаплоїди полягає лише у відсутності адекватних умов проведення дослідів [6]. При цьому постулюється як можливість розробки універсальної технології гаплоїдної індукції [6], так і необхідність пошуку спеціальних методичних прийомів для певних генотипів [7].

Таким чином, питання щодо стабільності прояву генотипних особливостей за морфогенетичною реакцією у культурі пиляків *in vitro* дотепер не можна вважати остаточно з'ясованим. На нашу думку, особливої гостроти це питання набуває у зв'язку з застосуванням молекулярно-генетичних маркерів для вивчення генетичних основ експериментального андрогенезу *in vitro*, адже необхідною умовою молекулярно-

генетичного маркування ознаки є наявність об'єктивних даних щодо її фенотипної і генотипної мінливості.

Метою досліджень було вивчення мінливості за здатністю до утворення андрогенних структур і рослин-регенерантів у культурі пиляків *in vitro* ярого ячменю в залежності від варіювання умов вирощування вихідного матеріалу, його попередньої обробки низькою позитивною температурою та складу штучного живильного середовища для культивування пиляків, а також порівняльна оцінка ефективності окремих елементів технології гаплоїдної індукції.

Матеріали та методи

Як модельні генотипи в експериментах з удосконалення технології отримання гаплоїдів у культурі пиляків *in vitro* використано сорти ярого ячменю Екзотик, Фенікс і лінію ДГ00-126, які характеризуються контрастною здатністю до андрогенезу *in vitro*. Зокрема, сорт Фенікс має низьку здатність до утворення андрогенних структур і рослин-регенерантів. Сорту Екзотик притаманні високий вихід новоутворень і низька частота регенерації зелених рослин, а лінії ДГ00-126 – високий рівень усіх показників гаплопродукції з переважанням серед регенерантів нормально пігментованих рослин.

Рослини-донори пиляків вирощували на дослідній ділянці. Узагальнено результати експериментальних досліджень, одержані у 2001-2007 рр., які різнилися за комплексом агрометеорологічних факторів.

Добір колосся, попередню обробку і одержання асептичної культури пиляків проводили, як описано раніше [8]. У дослідях з оптимізації попередньої обробки пиляки висаджували на розроблене нами індукційне середовище NMSмод.2 [9], яке також слугувало контролем у експериментах з удосконалення складу живильних середовищ.

Порівнювали багаторічні дані (ліміти і середнє значення): з культивування пиляків трьох згаданих вище генотипів на середовищі NMSмод.2 за обробки погонів у воді, з дослідження кількох режимів і способів попередньої обробки [10] за культивування пиляків на середовищі NMSмод.2 та оцінки кількох штучних живильних середовищ, які різнилися за мінеральною основою, стимуляторами росту [11] та гелеутворюючими речовинами [12].

Ефективність експериментального андрогенезу *in vitro* визначали за кількістю морфогенних пиляків і зелених рослин-регенерантів у відсотках від кількості культивованих пиляків. Експериментальні дані оброблено за допомогою загальноприйнятих методів варіаційної статистики.

Результати і обговорення

Як видно з наведених у таблиці багаторічних даних, характер варіювання кількісних показників андрогенезу *in vitro* під дією агрометеорологічних умов року, режиму та способу попередньої обробки колосся і складу живильного середовища повною мірою відображав генотипні особливості, залучених до експерименту сортів і ліній.

Таблиця

Мінливість показників ефективності гаплопродукційного процесу у ярого ячменю в залежності від умов року, попередньої обробки та зміни складу штучного живильного середовища для культивування пиляків *in vitro* (2001-2007 рр.)

Генотип	Джерело варіювання						Серед- не
	умови вирощування (рік)		режим і спосіб попередньої обробки		живильне середовище		
	Ліміти						
	min	max	min	max	min	max	
Кількість морфогенних пиляків, %							

Фенікс	3,08± 0,67	10,61± 1,15	0,28±0,28	16,07±1,64	2,22±0,83	16,84±1,90	6,56± 0,19
Екзотик	33,80± 1,88	48,78± 1,78	4,15±1,17	45,81±2,63	13,98±1,82	53,96±3,51	34,42± 0,38
ДГ00- 126	30,03± 2,63	60,26± 2,51	38,92±2,40	56,88±2,37	22,77±1,87	50,99±3,29	31,34± 0,43**
Частота регенерації зелених рослин, %							
Фенікс	0,00± 0,00	1,95± 0,58	0,00±0,00	10,92±1,40	0,00±0,00	5,60±1,22	1,60± 0,09
Екзотик	1,02± 0,35	7,47± 1,29	0,00±0,00	22,06±2,25	0,00±0,00	32,93±2,98	4,82± 0,17**
ДГ00- 126	22,10± 2,12	33,63± 1,88	33,26±2,26	63,68±2,37	5,52±1,26	52,49±2,88	22,60± 0,39

Примітка. ** Різниця між середніми генотипів по трьох факторах істотна при $P \leq 0,01$. Напівжирним шрифтом відмічено максимальні показники для кожного генотипу.

При цьому розмах варіювання залежав від абсолютного значення показника. Зокрема, за кількістю ембріогенних пиляків найменше варіювання при найнижчому рівні прояву ознаки було відмічено у сорту Фенікс. У цього генотипу було отримано і найменшесереднє значення по трьох досліджених факторах.

У сорту Екзотик і лінії ДГ00-126 за найбільш сприятливих умов вирощування донорних рослин та у кращих варіантах дослідів з удосконалення попередньої обробки і складу живильного середовища одержано досить високі показники кількості ембріогенних пиляків (на рівні 45–60 %). Слід зазначити, що у сорту Екзотик порівняно з лінією ДГ00-126 спостерігалось більше зниження показника у варіантах дослідів, в яких виявлено негативний вплив певних чинників на процес індукції новоутворень.

Аналогічні закономірності варіювання відмічені і для ознаки „частота регенерації зелених рослин”.

Заслуговує на увагу питання щодо найбільш результативного методичного прийому, завдяки якому вдалося отримати максимальні показники гаплопродукції у кожного генотипу і в середньому для усіх генотипів.

Аналіз даних таблиці свідчить про те, що у сорту Фенікс максимальний вихід ембріогенних пиляків (близько 16 %) був досягнутий за рахунок оптимізації складу штучного живильного середовища і попередньої обробки колосся. Що стосується частоти регенерації зелених рослин, то найбільш результативним чинником для цього генотипу виявилася попередня обробка.

У сорту Екзотик і лінії ДГ00-126 за оптимальних параметрів усіх трьох досліджених факторів було отримано значення частоти ембріогенних пиляків, які не мали істотних відмінностей. Для лінії ДГ00-126 найбільш ефективним фактором підвищення частоти регенерації зелених рослин була попередня обробка колосся у 0,3 М розчині манітолу (2007 р.), за якої вихід зелених рослин збільшився з 31,29 до 63,68 %, а для сорту Екзотик – штучне живильне середовище з заміном агар-агару Д2 (2006 р.), на якому було отримано частоту регенерації рослин на рівні 32 %, що майже у 4 рази перевищувало цей показник у контролі.

Порівняння середніх значень кількості ембріогенних пиляків і частоти регенерації зелених рослин для трьох генотипів по кожному фактору (дані не наведено) показало відсутність значної переваги жодного з них, що, безумовно, пов'язано з залученням даних, отриманих в усіх варіантах дослідів, в тому числі тих, де результат був негативним. Очевидно, що для оцінки результативності досліджень з удосконалення певного елементу технології слід враховувати в першу чергу дані дослідних і контрольних варіантів експерименту одного року, беручи до уваги якість

вихідного матеріалу, а потім випробовувати кращі варіанти у роки з різними погодними умовами.

Слід зазначити, що аналіз даних по кожному експерименту окремо показав збереження співвідношення між показниками гаплопродукції генотипів, незважаючи на значне зростання кількісних характеристик андрогенезу *in vitro* під дією певних методичних прийомів. Співставлення середніх значень і лімітів по генотипам (табл.) також свідчить в основному про сталість рангів генотипів за кількістю ембріогенних пиляків і рослин-регенерантів, що підтверджує генотипну обумовленість андрогенезу *in vitro*.

Використані у дослідженнях генотипи різнилися за комплексом біологічних і господарсько цінних ознак. Незважаючи на те, що лімітуючим фактором для вирощування рослин-донорів пиляків була посуха, прямого зв'язку між посухостійкістю і здатністю до андрогенезу *in vitro* не виявлено. Навпаки, помітно менший розмах мінливості за ознаками культурабельності відмічено у більш гомеостатичного і посухостійкого сорту Фенікс, що, можливо, є відображенням неспецифічної стійкості цього генотипу до несприятливих умов довкілля.

Висновки.

Проведено аналіз багаторічних даних з удосконалення елементів технології гаплоїдної індукції. Характер мінливості показників гаплопродукції в залежності від умов вирощування рослин-донорів пиляків, режиму і способу попередньої обробки колосся та складу штучного живильного середовища свідчить про збереження рангів залучених до експерименту генотипів, що вказує на суттєвість генетичної складової у загальній мінливості і актуальність поглибленого вивчення механізму генетичного контролю ознак культурабельності.

Література

1. Choo T.M., Reinbergs E., Kasha K.J. Use of haploids in breeding barley // Plant Breeding Review. – 1985. – 3. – P. 219–252.
2. Білинська О.В. Особливості застосування культури пиляків *in vitro* для створення вихідного матеріалу в селекції ячменю // Науковий вісник НАУ. – аграрного університету. 2006. – № 100. – С. 13–19.
3. Manninen O.M. Association between anther-culture response and molecular markers on chromosomes 2H, 3H and 4H of barley (*Hordeum vulgare* L.) // Theor. Appl. Genet. – 2000. – 100. – P. 57–62.
4. Sarrafi A. Genetic control for embryo and haploid production and potential use of doubled haploid lines for QTLs in Cereals // Haploids in Higher Plants III: Abstracts of International Conference. – Vienna, 2006. – P. 28.
5. Manninen O. Optimizing anther culture for barley breeding // Agricultural and food Science in Finland. – 1998. – 6. – P. 389–398.
6. Kasha K.J., Simion E., Oro R., Yao Q.A., Hu T.C., Carlson A.R. An improved *in vitro* technique for microspore culture of barley // Euphytica. – 2000. – v.120, N 3. – P. 319–385.
7. 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.
8. Білинська О.В. Генотипові особливості індукції гаплоїдів ячменю (*H. vulgare* L.) методом культури пиляків *in vitro*: Автореф. дис. ... канд. біол. наук. – Харків: 1997. – 19 с.
9. Білинська 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.
10. Білинська О.В. Культура пиляків *in vitro* як метод одержання вихідного матеріалу в селекції ячменю // Теоретичні основи селекції польових культур: Збірник наукових праць. – Х., IP ім. В.Я. Юр'єва УААН, 2007. – С. 174–186.

11. 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.

Белинская 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.– т. 39, № 2. – С. 136–143.

Резюме

Проведено оцінку мінливості показників гаплопродукції в залежності від умов вирощування рослин-донорів пиляків, режиму і способу попередньої обробки колосся та складу штучного живильного середовища. Збереження рангів залучених до експерименту генотипів за здатністю до андрогенезу *in vitro* свідчить про суттєвість генетичної складової у загальній мінливості і актуальність поглибленого вивчення механізму генетичного контролю ознак культурабельності.

Проведена оценка изменчивости показателей гаплопродукции в зависимости от условий выращивания растений-доноров пыльников, режима и способа предобработки колосьев и состава искусственной питательной среды. Сохранение рангов включенных в эксперимент генотипов по способности к андрогенезу *in vitro* свидетельствует о существенности генетической составляющей в общей изменчивости и актуальности изучения механизма генетического контроля культурабельности.

Evaluation of haploid production indicator variability caused by donor plant growth conditions, the regime and the mode of spike pretreatment and the nutrient medium composition has been carried out. Maintained ranks of genotypes including into the experiment show the importance of the genetic component in the whole variability and actuality of a profound investigation on the mechanism of a culturability genetic control

БЛАГОДАРОВА Т.А.¹, СИВОЛАПОВ А.И.², СИВОЛАПОВ В. А.²

¹ФГУП НИИ лесной генетики и селекции, Воронеж, Россия,
Россия, 394087, Воронеж, ул. Ломоносова, 105, e-mail: mail@lesgen.vrn.ru

²Воронежская государственная лесотехническая академия,
Россия, 394613, Воронеж, ул. Тимирязева, 8, e-mail: leskul@vglta.vrn.ru

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БИОТЕХНОЛОГИИ *IN VITRO* В ЛЕСОКУЛЬТУРНОЙ ПРАКТИКЕ БЫСТРОРАСТУЩИХ ДРЕВЕСНЫХ ПОРОД

В настоящее время наряду с традиционными приемами для воспроизводства ценных форм и сортов лесных древесных растений используют метод культуры изолированных органов и тканей (клональное микроразмножение растений). К преимуществам этого метода относятся: быстрота, исключение вирусных заболеваний, потребность в малом количестве инициальных эксплантов и ограниченных площадей, возможность круглогодичного продуцирования посадочного материала, продолжительная его сохранность при минимальных объемах холодильных камер, продуцирование многих тысяч посадочного материала в год [1].

Массовое воспроизводство генетически улучшенных форм древесных растений с помощью культуры тканей способствует повышению качественного состава лесонасаждений за счет получения клоновых растений, устойчивых к болезням и вредителям, стрессовым и техногенным факторам [2], ускоряет воспроизводство лесных ресурсов (позволяет получать генетически улучшенный материал на 10 – 16 лет раньше, чем при обычных условиях) [3].