

зависимость индукции развития микропобегов от различных концентраций БАП и ГК<sub>3</sub> в питательной среде.

Викладено результати регенерації експлантів чотирьох сортів черешні (Рубінова Ранняя, Казка, Талісман, Анонс) в умовах *in vitro*. Встановлено залежність індукції розвитку мікропагонів від різних концентрацій БАП та ГК<sub>3</sub> у живильному середовищі.

Results of explants regeneration of four sweet cherry cultivars (Rubinovaya Rannaya, Skazka, Talisman, Anons) in conditions *in vitro* have been submitted. Dependence of an induction of microshoots development from various BAP and GA concentrations in culture medium has been revealed.

**ЛОБАНОВА Е.И.<sup>1</sup>, ИГНАТОВА С.А.<sup>1</sup>, ШЕСТОПАЛ О.Л.<sup>1</sup>, НАРГАН Т.П.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Южный биотехнологический центр в растениеводстве УААН,  
Украина, 65036, г. Одесса, Овидиопольская дор., 3, e-mail: [lobanovakatyia@mail.ru](mailto:lobanovakatyia@mail.ru)

<sup>2</sup>Селекционно-генетический институт – Национальный центр семеноведения и сортоизучения УААН, Украина, 65036, г. Одесса, Овидиопольская дор., 3.

### **РЕГЕНЕРАЦИЯ В КУЛЬТУРЕ ПЫЛЬНИКОВ ОЗИМОЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ У ГЕНОТИПОВ С РАЗНОЙ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬЮ ПЕРИОДА «ВСХОДЫ-КОЛОШЕНИЕ»**

Одним из методов получения удвоенных гаплоидов пшеницы и других злаков в современной биотехнологии является культура пыльников. Полученный на этой основе линейный материал использовался для ускорения различных этапов в селекции мягкой пшеницы [1-4]. Важным показателем его эффективности является уровень регенерации растений, чем фактически определяется результативность метода при использовании его для целей селекции. Поэтому в плане совершенствования данной биотехнологии поиск путей повышения регенерации растений в культуре пыльников на селекционном материале озимой мягкой пшеницы является актуальным.

В настоящее время в селекции озимой мягкой пшеницы на юге Украины большое внимание уделяется созданию высокопродуктивных скороспелых сортов с непродолжительным периодом «всходы колошение». По мнению исследователей, создание такого материала может быть определяющим фактором в поддержании генотипом оптимального физиологического состояния для эффективной реализации адаптивного потенциала [5-8]. В работах ряда авторов [9-10] было показано, что именно физиологическое состояние донорного материала являются факторами, определяющими результативность метода. Связь между продолжительностью вегетационного периода и показателями андрогенеза *in vitro* была показана на рисе [11], тритикале [12], ячмене [13]. Это обуславливает необходимость проведения исследований, направленных на изучение связи между продолжительностью отдельных фаз онтогенеза и показателями андрогенеза *in vitro* на озимой мягкой пшенице. Целью нашей работы было изучение уровня связи между физиологическим признаком «продолжительность периода всходы – колошение» и показателями андрогенеза *in vitro* и, в частности регенерации растений, у различных гибридов и сортов озимой мягкой пшеницы.

#### **Материалы и методы**

В качестве донорного материала для культуры пыльников использовали генотипы озимой мягкой пшеницы, характеризующиеся разной продолжительностью периода «всходы – колошение», сутки: линия Лютеценс 155 (182), сорта – Фантазия одесская (186), Одесская красноколосая (187), Чайка (192), Мерсиа (193), гибриды F<sub>2</sub> –

[Зирка х Зразкова] х Леля (211), [Зирка х Зразкова] х Никония (213), [Зирка х Зразкова] х Куяльник (215), [Зирка х Зразкова] х Кирия (216), Багира х Леля (207), Багира х Бунчук (216).

Донорные растения выращивали в полевых условиях. Для введения в культуру пыльников, побеги с колосьями донорных растений срезали, когда микроспоры в них находились на фазе вакуолизированной микроспоры (ВМК) – от слабо- до сильно-вакуолизированной. Фазу развития микроспор определяли цитологическим методом. У исследуемых сортов и гибридов озимой мягкой пшеницы определяли продолжительность периода «всходы – вакуолизированная микроспора» и «всходы – колошение».

Проводили холодовую предобработку побегов с колосьями в воде, в темноте, при +2+4°C, 3 суток. Стерильно выделенные пыльники культивировали по методике, описанной ранее [14]. Статистическую обработку данных проводили по методике Рокицкого [15] с использованием стандартных компьютерных программ.

#### Результаты и обсуждение

В процессе работы было проведено исследование показателей эффективности гаплопродукционного процесса у сортов и гибридов озимой мягкой пшеницы: процента новообразований и регенерации растений (табл. 1, 2). В ходе эксперимента отмечена высокая генотипическая специфичность выявленных показателей андрогенеза *in vitro* в культуре пыльников выше указанных генотипов. Это подтверждает мнение исследователей [16-18 и др.], о том, что среди факторов, влияющих на эффективность гаплопродукции в культуре пыльников пшеницы в целом, и на регенерацию растений, в частности, решающая роль принадлежит генотипу донорных растений.

Было выявлено, что наиболее высокие показатели гаплопродукции, как на этапе формирования новообразований, так и на этапе регенерации растений, имели генотипы, отличавшиеся непродолжительным периодом «всходы – колошение» (В-К). Так максимальный уровень сформированных новообразований - 10,12 %, 6,56 % и регенерации растений - 3,47 %, 2,25 % был отмечен у линии Лютесценс 155 и сорта Фантазия одесская, соответственно. Данные сорта характеризовались наименьшим периодом «всходы – колошение» - 182 и 186 суток, соответственно (табл. 1).

Таблица 1

#### Регенерация растений в культуре пыльников озимой мягкой пшеницы у генотипов с разной продолжительностью периода «всходы – колошение» (В - К) и «всходы – вакуолизированная микроспора» (В – ВМК)

Генотип	Продолжительность периода, сут.		Количество		Регенерация, % от высаженных пыльников		
	В-К	В-ВМК	пыльни-ков, шт.	новообразова-ний, %	зеленых	альбинос-ных	общая
Лютес-ценс 155/89	177	182	346	10,12 ± 1,62	2,89 ± 0,9	0,58 ± 0,41	3,47 ± 0,98
Фантазия одесская	180	186	488	6,56 ± 1,12	2,05 ± 0,64	0,20 ± 0,2	2,25 ± 0,67
Од. красно-колосая	181	187	397	5,04 ± 1,21*	0,50 ± 0,35*	0,50 ± 0,35	1,01 ± 0,5
Чайка	186	192	350	4,86 ± 1,15*	0,29 ± 0,29*	0,29 ± 0,29	0,57 ± 0,4*
Mercia	188	193	505	0,79 ± 0,39*	-	-	-

Примечания: \* - разница достоверна при  $P \leq 0,05$

Среди сортовых популяций, необходимо отметить сорт Mercia, с продолжительным периодом «всходы – колошение» (193 суток), проявивший наименьшую отзывчивость в культуре *in vitro* (новообразований – 0,79 %, растений не получено). Гибриды [Зирка х Зразкова] х Леля и [Зирка х Зразкова] х Никония отличались высокой регенерацией – 7,8 и 4,8 %, и характеризовались непродолжительным периодом «всходы – колошение» (211, 213 суток, соответственно). В то время как, у генотипов, с более продолжительным периодом «всходы – колошение» (215, 216 дней), показатели андрогенеза были значительно ниже. Так, у гибридов [Зирка х Зразкова] х Кирия (216 суток) не было сформировано новообразований, а у гибрида [Зирка х Зразкова] х Куяльник (215 суток) наблюдали формирование незначительного количества новообразований, которые в дальнейшем не проявили способности к регенерации (табл. 2).

Такая же тенденция сохранилась и среди гибридных потомков других родительских форм. Так, гибриды Багира х Леля, с ранним колошением и продолжительностью периода «всходы – колошение» 207 суток, характеризовался высокими показателями андрогенеза: процент новообразований составили 7,7, регенерации - 4,4. У гибрида Багира х Бунчук, с поздним колошением, не было отмечено формирования новообразований и регенерации (табл. 2).

Таблица 2

**Регенерация растений в культуре пыльников озимой мягкой пшеницы у гибридных форм с разной продолжительностью периода «всходы – колошение» (В - К) и «всходы – вакуолизованная микроспора» (В - ВМК)**

Примечания: \* - разница достоверна при  $P \leq 0,05$

Генотип	Продолжительность периода, сут		Количество		Регенерация, % от высаженных пыльников		
	В - К	В - ВМК	пыльни-ков, шт.	новообра-зований, %	зеленых	альбинос-ных	общая
[Зирка х Зразкова] х Леля	209	211	578	10,6 ± 1,3	7,1 ± 1,1	0,7 ± 0,3	7,8 ± 1,1
[Зирка х Зразкова] х Никония	210	213	607	8,7 ± 1,2	4,6 ± 0,9	0,2 ± 0,2	4,8 ± 0,8
[Зирка х Зразкова] х Куяльник	213	215	526	1,9 ± 1,0 *	-	-	-
[Зирка х Зразкова] х Кирия	213	216	436	-	-	-	-
Багира х Леля	204	207	181	7,7 ± 2,0	3,3 ± 1,3	1,1 ± 0,8	4,4 ± 1,5
Багира х Бунчук	214	216	435	-	-	-	-

Определена отрицательная корреляционная связь между «продолжительностью периода всходы – колошение» и регенерацией зеленых растений в культуре пыльников озимой мягкой пшеницы. Так, для сортов она составляла -0,96, а для гибридов -0,54. Таким образом, уровень регенерации растений в культуре пыльников пшеницы был

достоверно выше у генотипов, с менее продолжительным периодом «всходы – колошение».

Период развития «всходы – колошение» включает в себя срок развития пыльника - фазу ВМК, с которой начинается введение пыльника в культуру. На этом этапе прекращается начатое *in vivo* развитие микроспор по гаметофитной программе. Дальнейшее развитие микроспор в пыльниках, проходит в условиях *in vitro* по спорофитной программе. По мнению многих исследователей [19, 20] именно фаза ВМК, является оптимальной для развития микроспор по спорофитному пути в условиях *in vitro*. В ходе исследования отмечали календарную дату, соответствующую фазе развития растений, когда в пыльниках первых побегов микроспоры находились на вакуолизированной фазе развития, была определена продолжительность периода «всходы – вакуолизированная микроспора».

Связь периодов развития «всходы – колошение» и «всходы – вакуолизированная микроспора», на использованном в данной работе материале табл.1, 2, бесспорна. Генотипы, характеризующиеся более ранним периодом колошения, раньше проходят фазу вакуолизированной микроспоры. Было установлено, что наибольшей регенерацией зеленых растений (2,89 % и 2,05 %) в культуре пыльников озимой мягкой пшеницы обладали генотипы Лютесценс 155 и Фантазия одесская с непродолжительным периодом «всходы – вакуолизированная микроспора» (177 и 180 суток). Учитывая тот факт, что на фазе ВМК происходит введение пыльников в культуру *in vitro* и переключение развития микроспор, использование данного показателя для оценки гаплопродукционной способности разных генотипов пшеницы, по нашему мнению, является более корректным. Таким образом, его можно использовать в качестве маркера для отбора из разных популяций наиболее отзывчивых к андрогенезу генотипов мягкой пшеницы.

Таким образом, в исследованиях по определению уровня регенерации *in vitro* у генотипов мягкой пшеницы, в качестве дополнительного критерия, был использован показатель продолжительности периода «всходы – вакуолизированная микроспора». Была установлена отрицательная корреляционная связь между регенерацией зеленых растений и продолжительностью периода «всходы – вакуолизированная микроспора», которая составляет для сортов -0,84, для гибридов -6,2. Исходя из этого, продолжительность периода «всходы – вакуолизированная микроспора» является важным показателем эффективности регенерации в культуре пыльников пшеницы. Предложено использовать данный показатель при подборе наиболее «отзывчивых» к андрогенезу в культуре пыльников образцов мягкой пшеницы.

#### **Выводы**

1. Уровень регенерации зеленых растений в культуре пыльников пшеницы был достоверно выше у генотипов, характеризующихся низкой продолжительностью периода «всходы – вакуолизированная микроспора» и «всходы – колошение».
2. Установлена корреляционная связь между регенерацией зеленых растений в культуре пыльников *in vitro* и продолжительностью периода «всходы - вакуолизированная микроспора» для сортов ( $r = -0,83$ ) и для гибридов ( $r = -0,70$ ), а также - продолжительностью периода «всходы – колошение» - для сортов ( $r = -0,96$ ) и для гибридов ( $r = -0,54$ ) озимой мягкой пшеницы
3. Предложено использовать показатель «продолжительности периода всходы – вакуолизированная микроспора» и периода «всходы – колошение» для прогнозирования уровня регенерации генотипов озимой мягкой пшеницы в культуре пыльников.

#### **Литература**

1. *Hu Han*. Wheat: Improvement Through Anther Culture // Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 2: Crops I (ed. by Y.P.S. Bajaj), 1986.

2. *Han Hu.* In vitro induced haploids in wheat // In vitro Haploid Production in Higher Plants, Vol. 4, 73-97.
3. *Pauk J., Kertesz L., Beke B., Bona L., Csoz M., Matus J.* New Winter Wheat Variety: «GK Delibab» Developed via Combining Conventional Breeding and In Vitro Androgenesis // Cer. Res. Commun. – 1995. – Vol. 23, № 3. – P/ 251-256.
4. *G.S. Knush, S.S. Virmani.* Haploids in plant breeding // In vitro Haploid Production in Higher Plants, Vol. 1, 11-33.
5. *Лыфенко С.Ф., Ериняк Н.И., Нарган Т.П.* Селекция сортов озимой мягкой пшеницы интенсивного типа // Збірник наукових праць СГІ-НАЦ НАІС. – Одеса. – В.3.(43). – 2002. – С. 22-42.
6. *Нарган Т.П., Лыфенко С.Ф.* Эффективность отбора по признаку продолжительность периода всходы – колошение при селекции озимой пшеницы // Фактори експериментальної еволюції організмів. – Київ: Аграрна наука. – 2003. – С. 174-179.
7. *Нарган Т.П.* Залежність господарсько корисних ознак озимої м'якої пшениці від тривалості вегетаційного періоду // Збірник наукових праць СГІ-НАЦ НАІС. – Одеса. – 2004. – В.4(44). – С. 56-62.
8. *Нарган Т.П.* Вплив тривалості вегетаційного періоду на господарсько корисні ознаки сортів і ліній озимої м'якої пшениці на півдні України: Автореф. Дис... канд. с/х. наук.: 06.01.05/ СГІ - Одеса, 2005. – 18 с.
9. *Дьячук Т.И.* Технические и селекционные аспекты гаплоидии (на примере пшеницы и ячменя): Автореф. Дис... д-ра. биол. наук.: 06.01.05 - Саратов, 2003. – 49 с.
10. *Приходько Н.И.* Влияние условий выращивания донорных растений на андрогенез в культуре пыльников пшеницы (*Triticum aestivum* L.) // Генетические исследования злаковых культур. сб. науч. тр. по прикладной ботанике, генетике, селекции, Т.128). – Л., изд. ВИР, 1989. – С. 86-89.
11. *Харченко П.Н.* Получение гаплоидов и гомозиготных линий у риса методом *in vitro*: Автореф. дис... канд.. биол. наук: 03.00.15 - Ленинград, 1986. – 18 с.
12. *Игнатова С.А.* Биотехнологические основы получения гаплоидов, отдаленных гибридов и соматических регенерантов зерновых и бобовых культур в различных системах *in vitro*: Автореф. дис... доктора биол. наук: 03.00.20 - Ялта, 2004. – 48 с.
13. *Литовкін К.В.* Генотипові особливості морфогенетичних реакцій в культурі тканин ячменю: Автореф. дис... канд.. биол. наук: 03.00.20 - Ялта, 2003. – 20 с.
14. *Лобанова К.І., Шестопал О.Л., Ігнатова С.О.* Абсцизова кислота як екзогенний фактор підвищення регенераційного потенціалу в культурі пиляків м'якої пшениці // Вісник Харківського Національного Аграрного Університету. – 2007. – Вип. 1 (10). – С. 102-110.
15. *Рокицкий П.Ф.* Биологическая статистика. – Минск: Изд-во Минского унта, 1973. – 316 с.
16. *Жосонар М.В., Игнатова С.А., Файт В.И., Федорова В.Р.* Гаплопродукционная способность в культуре пыльников сортов и линий озимой мягкой пшеницы, различающихся по генам роста и развития // Вісник Харківського Національного Аграрного Університету. – 2005. – Вип. 2 (7). – С. 94-99.
17. *Золотова Т.М., Никонов В.И.* Оценка коллекции сортов мягкой пшеницы (*Tr. aestivum* L.) по морфогенетической способности в культуре пыльников *in vitro* // Материалы Межд. конф. «Молекулярная генетика и биотехнология». – 1998, С. 178-179
18. *Сатыбалдиев Д.Д., Казкеев Д.Т., Евдакова Н.А., Анапияев Б.Б.* Факторы, влияющие на частоту процессов эмбриогенеза в культуре микроспор пшеницы *in vitro* // VIII International Conference. The Biology of Plant Cell in vitro and Biotechnology. Abstracts, Saratov, 2003, P. 277.
19. *Горбунова В.Ю., Круглова Н.Н.* // Известия РАН. Серия биологии. – 1997, № 6. – С. 668-676.

20. Круглова Н.Н. Микроспора злаков как модельная система для изучения путей морфогенеза: Автореф. ...д-ра биол. наук / 03.00.05. – Институт биологии Уфимского центра РАН. – Уфа. – 2002. – 48 с.

#### **Резюме**

Исследована способность к регенерации новообразований в культуре пыльников пшеницы у генотипов, отличающихся продолжительностью периода «всходы-колошение». Показано, что уровень регенерации зеленых растений в культуре пыльников пшеницы выше у генотипов, с более непродолжительным периодом «всходы – колошение». Предложено использовать продолжительность периода «всходы – вакуолизирующая микроспора» при прогнозировании уровня регенерации генотипов в культуре пыльников озимой мягкой пшеницы.

Досліджена регенераційна здатність новоутворень в культурі пиляків у генотипів, які відрізнялися за тривалістю періоду розвитку «сходи-колосіння». Показано, що рівень регенерації зелених рослин в культурі пиляків пшениці вищий у генотипів, із нетривалим періодом «сходи-колосіння». Запропоновано використовувати показник тривалості періоду «сходи-вакуолізована мікроспора» при прогнозуванні рівня регенерації генотипів в культурі пиляків м'якої пшениці.

Research of regeneration ability of new formations in the anther culture of wheat at genotypes different by duration of «ear emergence - heading» period was conducted. It was shown, that the level of regeneration of green plants in the anther culture of wheat is higher at genotypes, with shorter «ear emergence - microspore» period. It was suggested to use duration of period «ear emergence - microspore» at prognostication of genotypes with high level of regeneration in the anther culture of common wheat.

**МИТРОФАНОВА И.В., ЕЖОВ В.Н., ИВАНОВА Н.Н., ЧЕЛОМБИТ С.В.**

*Никитский ботанический сад – Национальный научный центр,  
Украина, 98648, АР Крым, Ялта, e-mail: in\_vitro@ukr.net*

#### **РАЗЛИЧНЫЕ ПУТИ МОРФОГЕНЕЗА *IN VITRO* КАЛАДИУМА (*CALADIUM HORTULANUM* BIRDSEY.) КАК СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ И СОХРАНЕНИЯ РАСТЕНИЙ**

Каладиум (*Caladium hortulanum* Birdsey.) относится к семейству ароидных и очень популярен среди декоративных растений. Эту культуру в последние годы широко используют для озеленения зимних садов. Однако, известно, что каладиум очень трудно размножается традиционными методами [4].

Первые работы по культуре тканей *C. hortulanum* появились в начале 70-х годов прошлого столетия. Они касались изучения вирусных болезней этой культуры и разработки метода культуры меристем для оздоровления [8]. Значительно позже появились отдельные публикации об исследованиях прямой и непрямой регенерации растений каладиума в условиях *in vitro* [2, 5, 7, 10]. В настоящее время американские ученые работают в области селекции *in vitro* каладиума. Проращивая пыльцу этого растения, они научились в течение короткого времени сохранять ее в условиях *in vitro* [6]. Впервые изучением вопросов соматического эмбриогенеза *in vitro* каладиума начали заниматься в отделе биотехнологии и биохимии растений НБС-ННЦ [3].

Однако результаты всех работ, проводимых с культурой каладиума, показали, что до сих пор не выявлены морфогенетические потенции органов и тканей различных сортов каладиума в условиях *in vitro* и соответственно не разработаны эффективные