

ВПЛИВ СКЛАДУ РЕГЕНЕРАЦІЙНИХ ПОЖИВНИХ СЕРЕДОВИЩ НА РЕГЕНЕРАЦІЮ ПШЕНИЦІ ТВЕРДОЇ В КУЛЬТУРІ ПИЛЯКІВ *IN VITRO*

Регенерація рослин – це останній етап культури пиляків *in vitro*. Метою всього дослідження є отримання зелених рослин-регенерантів с диференційованими органами, здатних бути адаптованими у ґрунті і у подальшому сформувати насіння. Залучена до дослідження тверда пшениця характеризується низькою чутливістю до умов культури пиляків *in vitro* і високою частотою формування «альбіно» рослин. Тому надзвичайно важливо підібрати оптимальні умови для збільшення кількості рослин-регенерантів [2, 3].

На кількісний вихід зелених регенерантів впливає генотип рослин і умови культивування [4, 5, 7, 8]. Від складу регенераційного поживного середовища залежить подальший розвиток сформованого на індукційному середовищі новоутворення. На кількісний вихід регенерантів впливає вміст і співвідношення регуляторів росту різної природи, наявність амінокислот і вітамінів і сольовий склад середовища (9).

Виходячи з цього, були сформовані наступні завдання дослідження:

Дослідити вплив складу регенераційного поживного середовища на регенерацію рослин яро-озимих гібридів пшениці твердої.

Встановити вплив регенераційного поживного середовища на ефективність регенерації озимих гібридів пшениці твердої.

Матеріали і методи

Дослідження проводили в 2013–2014 рр. Дослідницький матеріал наданий завідуючим лабораторією селекції і насіннезнавства озимої твердої пшениці Паламарчуком А.І. До роботи було залучено п'ять яро-озимих гібридів F₂ пшениці твердої і сім гібридів F₁ пшениці твердої озимої (табл. 1).

Рослини вирощували на дослідних польових ділянках СГІ–НЦНС. Пагони з пиляками зрізали з донорних рослин, коли вакуолізовані мікроспори знаходились у середньо-пізній одноядерній фазі розвитку. Попередню обробку зрізаних пагонів проводили у водному розчині АБК (0,5 мг/л) протягом 3–7 діб при +2 – +4 °С у темряві [2]. Колосся поверхнево стерилізували насиченим розчином гіпохлориту кальцію за прийнятою методикою [3]. Пиляки експлантували на дев'ять варіантів агаризованих поживних середовищ для індукції новоутворень: 190-2 [4], С17 [6] та М42 [7] та їх модифікації. Модифікацію середовищ проводили за вмістом і складом амінокислот, органічних кислот та вітамінів [8]. Після 15–25 діб культиву-

Таблиця 1

Генотипи пшениці твердої

№ в культурі	Генотип
Яро-озимі гібриди	
T1	(Сарат. золотий x Gidara 2) x Гардемарин
T3	{[Endura x Ал. Парус]x[Хар.1 x Од. Ювілейна]x[М-к x Ал.Парус]}
T7	HUI/Yav79/Don87 x DF900-83/WBR881
T9	(DF15-84 x Дельф.) x [(Vernum x Айсб. Од) x Айсб. Од]
T10	Haurani x Айсберг одеський
Озимі гібриди	
T42	DF-900-83/WPB-881 x Новинка4 2614 3411
T43	DF-900-83/WBK-881 x Лінкор 4016
T44	DF-900-83/WBK-881 x Золоте руно 4017
T45	DF-900-83/WBK-881 x Янтар одеський 4018

Середовища для регенерації

Середовище	Регулятори росту	Інші органічні речовини
MS 1	ІОК – 1 мг/л Кінетин – 1 мг/л	Пролін – 200 мг/л Глутамін – 200 мг/л
MS 2	ІОК – 1 мг/л БАП – 1 мг/л	Пролін – 200 мг/л Глутамін – 200 мг/л
MS 3	ІОК – 0,5 мг/л Кінетин – 0,5 мг/л	Пролін – 200 мг/л Глутамін – 200 мг/л
MS 4	ІОКи – 1 мг/л БАП – 1 мг/л	—
C17	2,4-D – 0,2мг/л Кінетин – 0,5 мг/л	—
C17-2	2,4-D – 0,2мг/л Кінетин – 0,5 мг/л	Яблучна кислота – 25 мг/л
N6	2,4-D – 0,2мг/л Кінетин – 0,5 мг/л	—
N6-2	2,4-D – 0,2мг/л Кінетин – 0,5 мг/л	Яблучна кислота – 25 мг/л

вання новоутворення переносили на середовища для регенерації рослин: чотири варіанти середовища MS (11), середовища C17 [6], N6 та їх модифікації (табл. 2).

Після 7–10 діб сформовані на регенераційних середовищах калуси із зонами регенерації та ембріоїди переносили на безгормональне середовище S MS (14) з половинною концентрацією солей. Для визначення рівня регенерації підраховували процент рослин-регенерантів («альбіно» та зелені) та довірчий інтервал.

Результати та обговорення

На вихід зелених рослин-регенерантів істотно впливає регенераційне поживне середовище. Для оцінки впливу цього фактора на регенерацію зелених рослин визначали процент регенерації від кількості висаджених новоутворень. До експерименту були залучені варіанти поживних середовищ MS, C17 і N6 (табл. 2). Результати досліджень представлені на рисунку 1.

Зелені рослини-регенеранти отримано на регенераційних середовищах MS2, MS3, MS4, C17-2 і N6-2. Рослини більшої кількості генотипів (три з п'яти досліджених) регенерували на середовищі MS2. Середовища MS2 і MS4 були однаковими за гормональним складом і відрізнялись вмістом проліну і глютаміну. Для генотипів T3, T9 та T10 додавання цих амінокислот виявилось важливим, оскільки вони формують зелені рослини на середовищі MS2, але не на MS4. Таким чином, можна зробити висновок, що додавання проліну і глютаміну може підвищувати

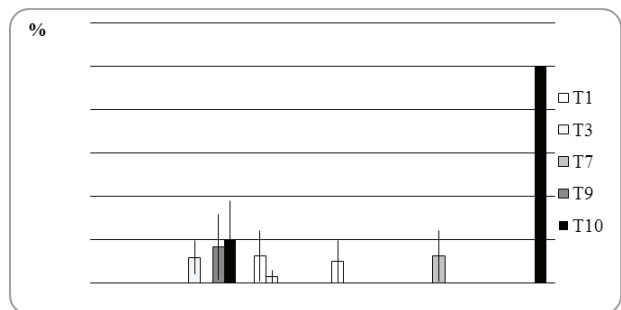


Рис. 1. Регенерація яро-озимих гібридів пшениці твердої на різних середовищах (відсоток від новоутворень)

вихід зелених рослин-регенерантів. Середовище MS2 відрізняється від середовища MS1 гормональним складом. Обидва середовища в якості регуляторів росту містять цитокінін і ауксин у співвідношенні 1:1, але в середовищі MS2 в якості цитокініну використовується БАП, а в MS1 – кінетин. Регенераційні поживні середовища MS1 і MS3 відрізнялись концентрацією регуляторів росту. MS3 містить половинну концентрацію ауксину і цитокініну. Середовище MS3 виявилось більш ефективним для регенерації зелених рослин у порівнянні з середовищем MS1. З результатів дослідження можна зробити висновок, що регенерація зелених рослин ефективніша при використанні БАП або половинної концентрації кінетину в якості регуляторів росту цитокінінової природи. Поживні середовища N62 і C172 відрізняються від досліджених варіантів середовища

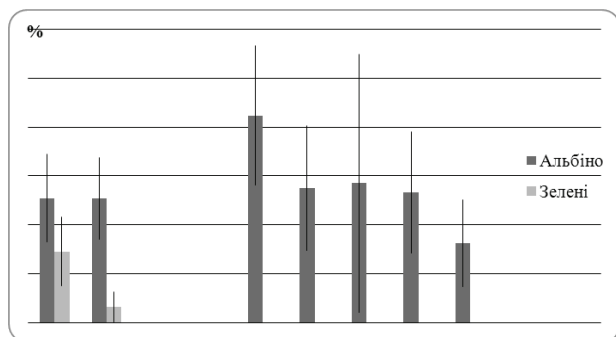


Рис. 2. Регенерація рослин озимих сортів пшениці твердої на різних регенераційних поживних середовищах

MS і сольовим, і гормональним складом. Середовище N62 виявилось ефективним для регенерації зелених рослин генотипу T10. На ньому отримано повноцінні рослини, які були успішно адаптовані до умов ґрунту.

Для оцінки регенераційного потенціалу гібридів пшениці твердої озимої використовували по два варіанти регенераційних поживних середовищ C17 N6, що відрізнялись вмістом яблучної кислоти (табл. 2). Рівень регенерації зелених рослин в культурі пиляків *in vitro* озимих гібридів пшениці твердої виявився нижчим, порівняно з яро-озимими гібридами. Генотип T42 виявився взагалі нечутливим до досліджених умов культивування. При приблизно рівному іншим дослідженим генотипам відсотковій індукції новоутворень (2,72–4,30 %) не отримано ні «альбіно», ні зелених рослин-регенерантів цього генотипу. Регенерація інших ярих гібридів представлена на рисунку 2.

Для генотипу T43 була характерна регенерація зелених рослин на середовищах C17 і N6.

ЛІТЕРАТУРА

- Kisana N.S., Nkongolo K.K., Quick J.S., Johnson D.L. Production of doubled haploids by anther culture and wheat x maize method in a wheat breeding programme // *Plant Breeding*. – 1993. – 110 – P. 96–102.
- O'Donoghue L.S., Bennett M.D. Comparative responses of tetraploid wheat pollinated with *Zea mays* L. and *Hordeum bulbosum* L. // *Theoretical and Applied Genetics*. – 1994. – 87. – P. 673–680.
- Slama Ayed O., De Buyser J., Picard E., Trifa Y., Slim Amara H. Effect of pre-treatment on isolated microspores culture ability in durum wheat (*Triticum turgidum* subsp. *durum* Desf.) // *Journal of Plant Breeding and Crop Science*. – 2010. – 2, N 2. – P. 30–38.
- Genovesi A.D., Maggill C.W. Improved rate of callus and green plant production from rice anther culture following cold shock // *Crop Science*. – 1979. – 19. – P. 662–664.
- Trottier M.C., Collin J., Comeau A. Comparison of media further aptitude in wheat anther culture // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. – 1993. – 35. – P. 59–67.
- Caredda S., Clement C. Androgenesis and albinism in Poaceae: influence of genotype and carbohydrates // Clement C., Pacini E., Audran J.C. (eds.). *Anther and pollen: from biology to biotechnology*. – Berlin: Springer, 1999. – P. 211–228.
- Лобанова Е.И., Игнатова С.А., Шестопал О.Л., Нарган Т.П. Регенерація в культурі пильників озимої м'якої пшениці у генотипів с різною продовжителістю – періоди «всходи-колошени» // *Фактори експериментальної еволюції організмів*: зб. наук. пр. / Під ред. В.А. Кунаха [та ін.]. – 2008. – 5. – С. 291–297.
- Игнатова С.О., Лобанова К.И., Шестопал О.Л. Спосіб підвищення регенераційного потенціалу в культурі пиляків озимої м'якої пшениці. Патент України № 219888 від 10.04.07. Бюл. № 4.

Рівень регенерації зелених рослин на C17 трохи вищий, ніж на середовищі N6. Решта генотипів виявилися неспроможними формувати зелені рослини на досліджених регенераційних середовищах.

Найбільший рівень регенерації «альбіно» рослин озимих гібридів отримали на немодифікованих середовищах. Додавання до поживних середовищ яблучної кислоти виявилось не ефективним для озимих гібридів пшениці твердої, хоча яро-озимі гібриди формували на даних середовищах «альбіно» і зелені (рис. 1) рослини-регенеранти. Таким чином, можна зробити висновок, що додавання яблучної кислоти пригнічує регенераційний потенціал отриманих новоутворень для гібридів пшениці твердої озимої.

Висновки

Встановили, що на регенерацію зелених рослин яро-озимих гібридів пшениці твердої впливає компонентний склад регенераційного поживного середовища. Оптимальним середовищем, на якому було отримано більшу кількість зелених рослин різних генотипів є середовище MS2, яке містило 1 мг/л БАП, 1 мг/л ІОК, 200 мг/л проліну і 200 мг/л кінетину.

Визначили, що озимі гібриди пшениці твердої характеризуються нижчою, у порівнянні з яро-озимими формами, спроможністю формувати зелені рослини.

Серед досліджених поживних середовищ оптимальним для рослин озимих гібридів пшениці твердої є середовище C17 з 0,2 мг/л 2,4-Д і 0,5 мг/л кінетину.

Встановили, що додавання яблучної кислоти пригнічує регенерацію «альбіно» і зелених рослин озимих гібридів пшениці твердої.

9. Foroughi-Wehr B., Zeller F.J. *In vitro* microspore reaction of different German wheat cultivars // Theoretical and Applied Genetics. – 1990. – 79. – P. 77–80.
10. Лобанова К.І., Жосонар М.В., Ігнатова С.О. Шляхи реалізації регенераційного потенціалу в культурі пиляків у різних генотипів озимої м'якої пшениці // Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів. – 2006. – 4, № 1. – С. 52–57.

DOBROVA H.O., ZAMBRIBORSH I.S., SHESTOPAL O.L.

The Plant Breeding and Genetics Institute – National Center of Seed & Cultivar Investigation, Ukraine, 365036, Odessa, Ovidiopol'ska road, 3, e-mail: dobrovaann@gmail.com

THE INFLUENCE OF THE REGENERATION CULTURAL MEDIA COMPOSITION ON DURUM WHEAT PLANTS REGENERATION IN ANTHR CULTURE *IN VITRO*

Aims. Green haploid plant regeneration is the last stage of anther culture method. Thus it is highly important to consider the effect of regeneration cultural media composition on the level of spring and winter durum wheat hybrids regeneration.

Methods. C17, N6, MS regeneration cultural media were used. The percentage of regenerated plants per number of newformations and confidence interval were calculated. **Results.** The influence of hormonal and organic components addition to the cultural media C17, N6, MS on the plant regeneration level were determined. Spring and winter hybrids were compared. Green haploid plants on spring durum wheat hybrids were obtained on MS media. Winter durum wheat hybrids were not sensitive to the cultural condition. Green plants of only one genotype were regenerated on C17 and N6 media without malic acid addition. **Conclusions.** Spring durum wheat hybrids were more sensitive to the anther culture condition than winter hybrids. The most appropriate regeneration cultural media for spring hybrids were MS2 with proline and glutamine addition and BAP as cytokinin addition. Malic acid addition suppress the plants regeneration.

Keywords: durum wheat, regeneration *in vitro*, anther culture, cultural media.