

***ВПЛИВ 2,4-Д НА АНДРОГЕНЕЗ В КУЛЬТУРІ ПИЛЯКІВ
IN VITRO ЯРОГО ТРИТІКАЛЕ***

І.В. Гребенюк, В.К.Рябчун
Інститут рослинництва ім. В.Я. Юр'єва УААН

Протягом 2007-2008 рр. вивчали вплив концентрації 2,4-Д в складі живильних середовищ на андрогенез *in vitro* в культурі пиляків ярого тритікале. Виявлена оптимальна концентрація 2,4-Д для вивчених генотипів ярого тритікале.

Яре тритікале, 2,4-Д, андрогенез, культура пиляків

Культивування пиляків *in vitro* застосовують у злакових культур для прискореного створення гомозиготних рекомбінантних ліній, які використовують в селекційних програмах та генетичних дослідженнях.

Для всіх злаків характерно, що гаплоїди з мікроспор розвиваються, коли їх основна маса знаходиться на одноядерній стадії [1, 2]. При цьому забезпечується найбільш висока здатність мікроспор переключатись з гаметофітного шляху розвитку на спорофітний. Одним із факторів, який впливає на цей процес, є холодний стрес *in situ* на пиляки [3].

Процес андрогенезу поділяють на три етапи: утворення калюсу та ембріоїдів, регенерація проростків, розвиток зелених рослин та альбіносів.

Ефективність отримання гомозиготних ліній при андрогенезі залежить від особливостей цих етапів та від співвідношення між числом гаплоїдів та спонтанних дигаплоїдів.

Фактором, що визначає прояв у процесі культивування пиляків морфогенетичних подій, які характеризуються швидкістю появи мікроструктур, частотою новоутворень, є індукційне живильне середовище. Відомо, що всі компоненти живильного середовища, не виступаючи окремо індуктором спорофітного шляху розвитку мікроспор, можуть впливати на проходження процесу [4].

Стосовно до тритікале аналіз літературних джерел показав, що найбільш частіше для індукції утворення калюсів та ембріоїдів дослідники використовують живильні середовища РОТАТО-2 та N-6 [1, 2,

4]. Живильне середовище РОТАТО-2 з додаванням картопляного екстракту, містить макросолі, а живильне середовище N-6 в своєму складі містить солі макро- і мікроелементів.

Також індукція утворення калюсів та ембріоїдів визначається балансом між концентрацією екзогенного ауксину 2,4-Д в живильному середовищі та вмістом ендогенного ауксину ІОК в пиляку в момент інокуляції [5, 6, 7]. Для кожного сорту або гібридної комбінації такий баланс буває специфічним. В дослідях по впливу 2,4-Д на вихід калюсів концентрація змінюється від 0,5 до 10 мг/л, деякі дослідники використовують безгормональне живильне середовище без додавання 2,4-Д [8, 9].

Метою даного дослідження було оптимізувати склад живильного середовища для отримання андрогенних гаплоїдів ярого тритікале за композицією солей макро- і мікроелементів та вмістом 2,4-Д.

Об'єктом досліджень були 6 сортів та ліній гексаплоїдного ($2n=42$) ярого тритікале Інституту рослинництва ім. В.Я. Юр'єва Жайворонок харківський, Аїст харківський, Хлібодар харківський, ЯТХ 111, ЯТХ 26, ЯТХ 19.

Рослини-донори пиляків були вирощені в польових умовах за прийнятою для зони східного Лісостепу України арготехнологією.

Дослідження проводились впродовж 2007-2008 рр. в лабораторії генетики і біотехнології Інституту рослинництва ім. В.Я. Юр'єва.

Для культури пиляків *in vitro* зрізали колосся зі стеблом довжиною 15-20 см на пізній одноядерній стадії розвитку мікроспор. Потім зрізане колосся піддавали обробці низькою температурою 4⁰С.

Асептична культура пиляків була отримана за методикою Белинської О.В.[10]. Для стерилізації у ламінарному боксі колосся в листовій піхві розміщували між двома кулями вати, змоченої 70% спиртом, і витримували протягом 5-15 хвилин. Пиляки переносили в пробірки з ватно-марлевими пробками на тверде живильне середовище.

Оптимальними для індукції андрогенезу є пиляки, у яких розвиток мікроспор знаходиться в інтервалі між середньою одноядерною і двоядерною стадіями. Для того, щоб мікроспори знаходилися в заданому інтервалі стадій, з нижньої і верхньої частин, підготовлених до роботи колосів рослин тритікале, видаляли 3-4 крайні колоски.

В таблицях приводяться значення стандартних помилок частки калюсів при $P < 0,05$ [11].

В роботі використано попередню температурну обробку донорного колосся при 4⁰С протягом 8-12 діб.

Для визначення оптимального складу живильного середовища в культурі пиляків ярого тритікале використовували прописи живильних середовищ РОТАТО-2 та N-6 (табл. 1).

Формування калюсів на поверхні пиляків спостерігали на обох живильних середовищах. При цьому частота виходу калюсів в залежності від генотипу тритікале змінювалась на середовищі РОТАТО-2 від 3,4 % до 14,0 %, а на середовищі N-6 від 3,0 % до 22,7 %.

За отриманими даними середовище N-6 виявилось більш сприятливим для утворення калюсів (10,4%), ніж РОТАТО-2 (5,9%).

Для отримання первинного калюсу пиляки рекомендується культивувати одночасно на декількох середовищах із різним співвідношенням регуляторів росту. Успішне отримання калюсу в значній мірі залежить від добре вибраних регуляторів росту, які індукують поділ клітин. Як ауксини найчастіше використовують 2,4-Д та ІОК.

Ми вивчили вплив концентрацій 2,4-Д на індукцію калюсів в культурі пиляків *in vitro* ярого тритікале. За основу було прийнято середовище РОТАТО-2. Були взяті наступні 4 варіанти концентрації 2,4-Д (0,25 мг/л, 0,75 мг/л, 1 мг/л, 2 мг/л) та контроль без додавання 2,4-Д. У кожному дослідному варіанті на живильне середовище було висаджено не менше 120 пиляків.

Вивчаючи здатність пиляків ярого тритікале до утворення калюсів встановили, що за часткою продуктивних пиляків на живильних середовищах з додаванням 0,25 мг/л 2,4-Д та з додаванням 0,75 мг/л 2,4-Д вони не відрізнялись від контролю (безгормональне середовище). При максимальній в даній роботі концентрації 2,4-Д (1-2 мг/л) всі використані генотипи ярого тритікале дали більш високу частку продуктивних пиляків порівняно з контролем (табл. 2).

Вивчаючи реакцію пиляків генотипів ярого тритікале на умови культивування *in vitro* при різних концентраціях 2,4-Д в ініціальному середовищі, виявили неоднакову реакцію різних генотипів за здатністю до андрогенезу. У Жайворонка харківського на живильному середовищі з додаванням 1 мг/л, 2 мг/л 2,4-Д частка продуктивних пиляків склала 25,0%.

На безгормональному середовищі, без додавання 2,4-Д, найбільша частка продуктивних пиляків була у генотипу Хлібодар харківський – 2,9 %. На живильному середовищі з додаванням 2 мг/л 2,4-Д цей генотип дав також високу частку продуктивних пиляків (44,4 %).

У Аїста харківського частки продуктивних пиляків на безгормональному середовищі та на живильному середовищі з додаванням 0,75 мг/л 2,4-Д не відрізнялись, а на живильному середовищі з додаванням 2 мг/л 2,4-Д частка продуктивних пиляків склала 10,6%.

Таблиця 1

Вплив складу живильного середовища на андрогенез *in vitro* ярого тритікале, 2007 р.

Генотип	Кількість, шт.		Частка пиляків з калюсами, %
	висаджених пиляків	пиляків з калюсами	
середовище РОТАТО 2			
Жайворонок харківський	1910	96	5,0±0,5*
Хлібодар харківський	1070	150	14,0±1,0*
Аіст харківський	1380	58	4,2±0,5
ЯТХ 26	1610	54	3,4±0,4
ЯТХ 19	1080	53	4,9±0,7
ЯТХ 111	1380	85	6,2±0,7*
Разом	8430	496	5,9±0,3*
середовище N-6			
Жайворонок харківський	300	43	14,3±2,0*
Хлібодар харківський	110	25	22,7±4,0*
Аіст харківський	360	30	8,3±1,5
ЯТХ 26	330	10	3,0±1,0
ЯТХ 19	420	40	9,5±1,4
ЯТХ 111	240	35	14,6±2,3*
Разом	1760	183	10,4±0,7*

Примітка: * - достовірно при $P < 0,05$

У ЯТХ 26 на безгормональному середовищі та на середовищі з додаванням 0,25 мг/л 2,4-Д частки продуктивних пиляків не мали різницю, а на середовищі з додаванням 2 мг/л 2,4-Д частка продуктивних пиляків склала 25,0%.

У ЯТХ 19 на безгормональному середовищі не відбувалось розвитку калюсів, а на середовищі з додаванням 1 мг/л 2,4-Д частка продуктивних пиляків склала 10,8%.

У ЯТХ 111 на живильному середовищі з додаванням 0,25 мг/л та з додаванням 0,75 мг/л частки продуктивних пиляків не мали різницю, а на живильному середовищі з додаванням 1 мг/л та 2 мг/л 2,4-Д частки продуктивних пиляків склали по 25,0%.

Таблиця 2

Вплив різних концентрацій 2,4-Д на індукцію калюсу із пиляків сортів ярого тритікале

Генотип	Частка продуктивних пиляків, %					середнє по сорту
	без 2,4-Д, контроль	0,25 мг/л 2,4-Д	0,75 мг/л 2,4-Д	1 мг/л 2,4-Д	2 мг/л 2,4-Д	
Жайворонок харківський	0,2±0,2*	0	1,3±0,5	25,0±2,8*	4,1±0,7*	5,1
Хлібодар харківський	2,9±1,1*	3,3±1,3*	1,8±1,3	5,0±1,4*	44,4±3,0*	14,0
Аїст харківський	1,7±1,0	0	0,7±0,4*	7,8±2,0	10,6±1,6*	4,2
ЯТХ 26	0,6±0,3*	0,9±0,5*	2,7±1,0*	3,7±1,3	25,0±4,0*	3,3
ЯТХ 19	0	4,0±1,3	1,2±0,5	10,8±2,7*	20,8±3,7	5,0
ЯТХ 111	1,0±0,6*	3,0±1,0	2,5±1,0	25,0±4,0*	25,0±4,0	6,2
середнє по варіанту	1,0	1,0	1,6	12,0	1,5	4,1

Примітка: * - достовірно при P<0,05

Калюси, утворенні на ініціальному середовищі з різним вмістом 2,4-Д, переносили на живильне середовище Р8 – мінеральна основа ГБ-5, 1 мг/л ІОК, 1 мг/л кінетину, 100 мг/л мезоінозиту, ½ концентрації вітамінів за Staba [12]. З наших досліджень виявлено, що рівень формування морфогенних калюсів не є запорукою реалізації їх у повноцінній рослині. Тільки калюси, отриманні на живильному середовищі РОТАТО-2 з додаванням 2 мг/л 2,4-Д, у генотипів Хлібодар харківський, ЯТХ 19, ЯТХ 111 дали кожний по одній зеленій рослині.

В результаті проведених дослідів було встановлено, що для індукції калюсоутворення в первинних живильних середовищах за отриманими даними більш сприятливою виявилась концентрація 2 мг/л 2,4-Д для всіх вивчених генотипів. Визначено живильне середовище N-6, як більш сприятливе для утворення калюсів, ніж РОТАТО-2. Виділені генотипи, які дали зелені рослини в культурі пиляків *in vitro* на середовищі N-6 (Хлібодар харківський, ЯТХ 19, ЯТХ 111).

Подальші дослідження будуть направлені на регенерацію дигаллоїдів з гібридів ярого тритікале, одержаних на основі чутливих до культури пиляків *in vitro* сортів та ліній ярого тритікале і їх гібридів.

Бібліографічний список

1. *Ігнатова С.О.* Реалізація тотипотентності мікроспор в культурі пиляків *in vitro* та її використання в селекційно-генетичних експериментах. // Генетика і селекція в Україні на межі тисячоліть. – Київ, 2001. – С. 562-572
2. *Круглова Н.Н., Батыгина Т.Б.* Методические рекомендации по использованию морфогенетического потенциала пыльника в биотехнологических исследованиях яровой мягкой пшеницы. – Уфа, 2002. – 22 с.
3. *Dogramaci-Altuntepe M., Peterson T.S.* Anther Culture-Derived Regenerants of Durum Wheat and Their Cytological Characterization. // Journal of Heredity. – 2001: 92(1). – P. 56-64
4. *Heberle-Bors E.* Experimental control of pollen development. // Androgenesis and haploid plants. – Berlin, New York, 1998. – P. 38-53
5. *El-Sherbeny G.A.R., Sato S.* et al. Effect of genotype and 2.4-D concentration on callus induction from anther culture of modern Egyptian wheat cultivars. // Cereal Research Communications. – Vol. 29 Nos. 3-4, 2001. – P. 305-310
6. *Абрамов С.И.* Статусы пыльника пшеницы при холодовом стрессе. // Докл. Годичное собрание Всерос. Общ-ва физиологов растений, Уфа, 19-22. 06. 2001 г. - №2. – С. 100-102, 192

7. *Батыгина Т.Б.* Новые алгоритмы морфогенеза.// VI съезд Общества физиологов растений России. Международная конференция «Современная физиология растений: от молекул до экосистем». – ч.1, 2007. – С. 10-12
8. *Добровольская О.Б., Першина А.А.* и др. Влияние хромосом ржи на особенности андрогенеза у пшенично-ржаных замещенных линий *Triticum aestivum* L. Сорта Саратовская 29 // Генетика. – 2001. – 37, №5. – С.624-630
9. *Hassawi D.S., Liang G.H.* Effect of cultivar, incubation temperature and stage of microspore development on anther culture in wheat and triticale. // *Plant Breeding* 105, 1990. – P. 332-336
10. *Белинская Е.В.* Генетические особенности индукции гаплоидов ячменя (*Hordeum vulgare* L.) методом культуры пыльников *in vitro* : Дис...канд. Биол. Наук - X.- 1997 -стр.170.
11. *Доспехов Б.А.* Методика полевого опыта. – М.: Колос. – 1973. – С. 186.
12. *Лукиянюк С.Ф., Игнатова С.А.* Факторы, определяющие морфогенез и выход гаплоидов в культуре пыльников тритикале. // Теорит. и приклад. аспекты селекции и семеноводства пшеницы, ржи, ячменя и тритикале. – Одесса. ВСГИ, 1981 г. – С. 34-35

На протяжении 2007-2008 гг. исследовали влияние концентрации 2,4-Д в составе питательных сред на андрогенез *in vitro* в культуре пыльников ярового тритикале. Установлено оптимальная концентрация 2,4-Д для изучаемых генотипов ярового тритикале.

During 2007-2008 ys the influence of 2.4-D concentration in the nutritious composition medium on androgenesis *in vitro* in anther culture of spring triticale was studied. The optimum concentration of 2.4-D in the investigated genotypes of spring triticale is determined.