

УДК 576.581.1-633.16

Л. С. Шепель, асп., **М. Л. Махновська**, канд. біол. наук,
С. О. Ігнатова, д-р біол. наук, зав. лаб. культури тканин

Південний біотехнологічний центр у рослинництві УААН,
Лабораторія культури тканин
Овідіопольська дорога, 3, Одеса, 65036, Україна,
e-mail: sh_lyudmila@bigmir.net

БИОТЕХНОЛОГИЧНІ МЕТОДИ ОДЕРЖАННЯ СТІЙКИХ ДО БОРОШНИСТОЇ РОСИ ФОРМ ЯРОГО ЯЧМЕНЮ

Наведено результати досліджень з отриманням стійких до борошністої роси регенерантів із ізольованих незрілих зародків віддалених гібридів *Hordeum vulgare* ($2n = 14$) \times *Hordeum bulbosum* ($2n = 28$) в умовах *in vitro*. Показано, що ефективність віддаленої гібридизації залежить від генотипів культурного ячменю. В результаті одержано амфіплоїдні та гаплоїдні рослини-регенеранти. З використанням методу культури пиляків із гібридів F_2 Гетьман \times Astoria, Гетьман \times Madonna отримані лінії, які за попередньою оцінкою є стійкими до борошністої роси.

Ключові слова: *Hordeum vulgare*, *Hordeum bulbosum*, віддалена гібридизація, гібрид, культура пиляків.

Інтенсивна розробка та вдосконалення методів культивування клітин, тканин та окремих органів *in vitro* значно вплинули на технологію виведення нових сортів основних хлібних злаків. Так, широкі перспективи для створення вихідного матеріалу, збагаченого цінними ознаками, відкрив метод ембріокультури — складової частини віддаленої гібридизації, яка є новим джерелом інтрогресії генів стійкості до біотичних та абіотичних факторів від споріднених диких видів [1–3]. Про перспективність цього напрямку свідчать результати праць щодо віддаленої гібридизації озимої пшениці з *Aegilops*. В селекційно-генетичному інституті створено 33 лінії з високою специфічною та груповою стійкістю до хвороб [4, 5]. З використанням дикорослої форми *Hordeum bulbosum*, генофонд якої містить гени високої стійкості до морозу та основних хвороб, створені гібриди та інтрогресивні форми ячменю зі стійкістю до борошністої роси, вірусу жовтої мозаїки та листової іржі [6–8].

Широко використовується в селекційній практиці метод культури пиляків, який дозволяє скоротити термін виведення сорту в 1,5–2 рази. Дослідженнями попередників [9–11] засвідчена перспективність застосування цього методу в програмах одержання стійких до хвороб ліній і гібридів ячменю і пшениці. Все це свідчить про доцільність розробки технології одержання стійкого до хвороб вихідного матеріалу ячменю шляхом віддаленої гібридизації в поєднанні з методом ембріокультури та методом культивування ізольованих пиляків *in vitro*.

Виходячи з цього, метою даної роботи було дослідження можливості одержання гібридів *Hordeum vulgare* ($2n = 14$) x *Hordeum bulbosum* ($2n = 28$), а також ліній ярого ячменю з підвищеною стійкістю до борошністої роси з використанням методів культури клітин та тканин *in vitro*.

Матеріали та методи

Для виконання досліджень були залучені два гібриди ярого ячменю другого покоління, створені за участю сорту Гетьман з комплексною стійкістю до листостеблових хвороб і стійких до борошністої роси сортів іноземної селекції Astoria та Madonna, які були надані відділом селекції ячменю Селекційно-генетичного інституту. Вказані гібриди (Гетьман x Astoria і Гетьман x Madonna) висівалися в полі в три строки (16.04; 21.04; 26.04) і використовувались в якості материнських форм у віддалених схрещуваннях з озимою формою *Hordeum bulbosum* ($2n = 28$) із колекції лабораторії культури тканин Південного біотехнологічного центру у рослинництві та в якості донорних рослин для культури пиляків. Запилювання квіток ячменю пилюком *H. bulbosum* здійснювали через 1–2 дні після кастрації. Гібридні рослини одержували з використанням ембріокультури. Для цього на 14–16 день після запилення незрілі зародки стерильно вилучали і культивували на живильному середовищі MS, збагаченому глютаміном (400 мг/л) та 2,4-Д (0,1 мг/л), в термостаті до появи колеоптиля. Далі паростки виставляли на світло (1,5 тис. люкс/м²) до формування добре розвинутої кореневої системи. Для стимуляції різогенезу паростки культивували в рідкому середовищі MS з половинним вмістом макро- і мікросолей з додаванням гормонів (ІОК — 0,4 мг/л і кінетину — 0,2 мг/л). Кількість хромосом у клітинах молодих корінців регенерантів підраховували за методикою Паушевої [12]. Перед висадженням у ґрунт паростки колхцинували (0,15% розчин колхцину в 4% диметилсульфоксиді) методом вакуум-інфільтрації [13]. Для одержання гомозиготних ліній використовували метод культивування ізольованих пиляків *in vitro*. Зрізані колосся протягом п'яти діб витримували в розчині 2,4-Д (2,5 мг/л). Ізольовані пиляки імплантували на живильне середовище Lorz [14] з додатком мелібіози (2 г/л) і гідроксинікотинової кислоти (1 мг/л).

Результати досліджень та їх аналіз

Фенологічні спостереження показали, що цвітіння рослин тетраплоїдної форми *H. bulbosum* ($2n = 28$) співпадало з цвітінням рослин ярого ячменю гібридів Гетьман x Astoria, Гетьман x Madonna другого та третього строків посіву (21.04; 26.04) і тривало на протязі восьми днів. За результатами проведених в цей період схрещувань гібридів Гетьман x Astoria, Гетьман x Madonna з *H. bulbosum* ($2n = 28$) встановлено, що обидва гібриди здатні до схрещувань з дикою формою, але різняться за кількістю зерен, що утворювались, та кількістю життєздатних зародків. Кращим за цими показниками був гібрид Геть-

ман x Astoria. Встановлено, що далеко не всі вилучені і висаджені на живильне середовище гібридні незрілі зародки призводили до регенерації рослин. Більшість зародків була нежиттєздатною і гинула на різних етапах розвитку. При цьому відсоток гібридних рослин-регенерантів, отриманих в комбінації (Гетьман x Astoria) x *H. bulbosum*, був значно вищим (табл. 1).

Таблиця 1

Одержання гібридів та гаплоїдів в результаті гібридизації *Hordeum vulgare* (2n = 14) x *Hordeum bulbosum* (2n = 28)

Гібридна комбінація	Запилено квіток, шт.	Утворилось зерен, шт.	Схрещуваність %	Регенеранти		Гаплоїди	
				Кількість, шт.	%	Кількість, шт.	%
Гетьман x Astoria x <i>H. bulbosum</i>	160	36	22,5 ± 3,3	16	44,4	2	12,5
Гетьман x Madonna x <i>H. bulbosum</i>	140	20	15 ± 3,01	4	20,0	0	0

Слід зазначити, що більшість регенерантів часто не утворювали коренів. Подолати цю проблему вдалося шляхом подальшого культивування паростків у рідкому живильному середовищі MS з половинним вмістом солей та додаванням гормонів (ІОК — 0,4 мг/л і кінетину — 0,2 мг/л). Всього від віддалених схрещувань одержали 20 рослин-регенерантів. За підрахунком кількості хромосом у меристемних клітинах молодих корінців 2 рослини були гаплоїдними (7 хромосом), у інших число хромосом становило $7 < 2n < 28$, серед яких 9 мали по 21 хромосомі. Утворення гаплоїдів свідчить про здатність хромосом *H. bulbosum* (2n = 28) до повної елімінації в гібридному зародку.

За фенологією у гібридних рослин спостерігалось неповне домінування ознак батьківської форми *H. bulbosum*. Більшість рослин були ярими, високорослими, мали високу куцистість, вузьку листову пластинку та відкритий тип цвітіння. Озимих форм виявилось дві, низькорослих — 4. Колос у всіх гібридних рослин був шестирядний. Рослини були стерильними і потребували бекросування. Дві гаплоїдні рослини, отримані в комбінації (Гетьман x Astoria) x *H. bulbosum*, після колхіцинування дали диплоїдних нащадків, які морфологічно були схожі на середньорослий культурний ячмінь з підвищеною куцистістю, великим щільним колосом і дуже великим зерном. За попередньою оцінкою в штучних умовах всі рослини, отримані від віддалених схрещувань, не вражувались борошністою росю. Рівень стійкості буде визначатись в польових умовах СГІ.

Отримані результати свідчать, що в лабораторній колекції культур тканин є клони *H. bulbosum* (2n = 28), яких можна вважати перспективними для віддаленої гібридизації ячменю як засобу одержання гібридних рослин з новими якостями і, частково, гаплоїдів. Схрещуваність та здатність гібридів до формування життєздатних зародків суттєво залежать від генотипу ячменю.

Гібриди Гетьман х Astoria і Гетьман х Madonna залучалися також для прискороного одержання стійких до борошнистої роси ліній шляхом гаплоїдизації. Гаплоїди отримували за допомогою методу культури ізольованих пиляків. Показано (табл. 2), що живильне середовище Logz та дібрані нами умови обробки зрізаного колосся і культивування ізольованих пиляків дозволяють реалізувати високу здатність гібридів до утворення ембріогенних пиляків (42,8 і 55% індукції ембріоїдів). Проте відсоток регенерації зелених рослин був, як і у інших дослідників, низьким [15, 16].

Таблиця 2

Одержання зелених регенерантів від гібридів ярого ячменю шляхом культури пиляків

Гібрид	Число висаджених пиляків, шт.	Ембріогенні пиляки		Зелені регенеранти	
		Кількість, шт.	%	Кількість, шт.	%
Гетьман х Astoria	1440	792	55,0 ± 1,31	20	2,5 ± 3,49
Гетьман х Madonna	1680	720	42,8 ± 1,2	4	0,6 ± 3,86

Прямого зв'язку між калусогенезом і регенерацією не виявлено. У випадку гібриду Гетьман х Astoria виникала значно більша кількість зелених рослин-регенерантів. Серед отриманих регенерантів за вирощування в штучних умовах частина була зі спонтанно подвоєною кількістю хромосом, що відповідає результатам досліджень інших дослідників, які працювали з культурою пиляків не тільки ячменю, а інших культур [14, 15, 17]. Відсоток спонтанного подвоєння кількості хромосом був високим, однак неоднаковим у різних генотипів. Від гібриду Гетьман х Astoria вдалося одержати 14, а від гібриду Гетьман х Madonna лише дві лінії подвійних гаплоїдів (табл. 3).

Таблиця 3

Частота спонтанної диплоїдизації в культурі пиляків гібридів ярого ячменю

Гібрид	Число зелених регенерантів	Подвоєні гаплоїди	
		Кількість, шт.	%
Гетьман х Astoria	20	14	70
Гетьман х Madonna	4	2	50

Всі лінії (2 — отримані шляхом віддаленої гібридизації і 16 — методом культури пиляків) передані до відділу фітопатології СГІ і висіяні в полі для оцінки рівня стійкості до борошнистої роси.

Аналізуючи наведені дані та публікації інших дослідників, слід виходити з того, що всі запропоновані технології одержання гаплоїдів

шляхом культури пиляків не дозволяють подолати генотипову залежність гаплопродукційної здатності у ячменю, і, на думку Zheng [17] стабільна культуральна система для всіх генотипів залишається ілюзією. Уникнути цього можна шляхом добору джерел гаплопродукційного процесу і включення їх до програм одержання гомозиготних ліній. Підвищення стійкості до борошнистої роси у вихідних форм для селекційних програм можливе завдяки використанню віддаленої гібридизації та подальшим отриманням регенерантів через ембріокультуру. Для скорочення терміну одержання стійких ліній із гібридів доцільним є застосування методу культури пиляків.

Висновки

1. Дібрана стійка до борошнистої роси дикоросла форма *Hordeum bulbosum* ($2n = 28$) для віддалених схрещувань з ярим ячменем *Hordeum vulgare* ($2n = 14$). Одержано 18 віддалених гібридів і 2 подвійних гаплоїди.
2. Ефективність віддаленої гібридизації *Hordeum vulgare* x *Hordeum bulbosum* залежить від генотипу культурного ячменю.
3. Із незрілих зародків зерна гібриду (Гетьман x Astoria) x *Hordeum bulbosum* ($2n = 28$) отримано амфігаплоїдних ($7 < 2n < 28$) та гаплоїдних регенерантів. У частини гаплоїдних рослин шляхом коліцинування кількість наборів хромосом було подвоєно ($2n = 14$).
4. Від гібридів, створених гібридизацією стійких до борошнистої роси сортів, одержано 16 ліній ярого ячменю з ознакою високої стійкості до хвороби, що можна використати у селекційних програмах по створенню нових сортів ячменю.

Література

1. Першина Л. А., Шумный В. К., Белова Л. И. Межвидовая и межродовая гибридизация дикорастущего ячменя *Hordeum geniculatum* // Цитология и генетика. — 1985. — Т. 9, № 3. — С. 392–433.
2. Банникова В. П. Межвидовая несовместимость у растений. — Киев: Наукова думка, 1986. — С. 132–140.
3. Chen J., Xu N. Studies on the utilization potentiality of the nucleo-cytoplasmic hybrids in wheat // Nat. Sci. — 2000. — Vol. 5, № 1. — P. 114–118.
4. Авсенин В. И. Мощный И. И., Рибалка А. И., Файт В. И. Гибриды *Aegilops cylindrica* Host с *Triticum durum* Desf и *T. Aestivum* L. // Цитология и генетика. — 2003. — Т. 37, № 1. — С. 11–17.
5. Бабаянц Л. Т., Рибалка О. І., Аксельруд Д. В. Нове джерело стійкості пшениці до основних хвороб // Реалізація потенційних можливостей сортів та гібридів Селекційно-генетичного інституту в умовах України: Зб. наук. праць. — Одеса, 1996. — С. 111–116.
6. Балканджиева Ю. Цитоморфологическая характеристика гибридов *Hordeum bulbosum* (4x) и *Hordeum vulgare* (4x) // Генетика и селекция — 1987. — Т. 20, № 3. — С. 211–216.
7. Walter U., Proesler G., Zigal S. *Hordeum bulbosum* initial material with new disease resistance genes in barley breeding // Barley genetics. — 2000. — Vol. 8. — P. 207–209.
8. Pickering R. P., Jonston P. A., Cromey M. G. *Hordeum bulbosum* a new source of disease and pest resistance genes for use in barley breeding programs // Barley Genet. News. — 2000. — Vol. 30. — P. 1–4.
9. Молчанова Л. М., Смолин В. П. Оценка дигаплоидных линий ярого ячменя по продуктивности и устойчивости к болезням // Совершенствование селекционно-генетических

- и семеноводческих процессов зерновых и зернобобовых культур в нечерноземье: Сб. науч. трудов. — Москва, 1988. — С. 35–43.
10. Friendt W., Yorts R., Kaiser D., Foroughi-Wehr K. Present state and prospects in breeding for resistance or immunity to barley yellow mosaic virus // Bulletin OEPP. — 1989. — P. 563–571.
 11. Анапиев Б. Б. Культура микроспор и гаплоидная биотехнология пшеницы // Биотехнология теория и практика. — 2001. — № 4. — С. 34–45.
 12. Паушева З. П. Практикум по цитологии растений. — М.: Агропромиздат, 1988. — 271 с.
 13. Лукьянюк С. Ф., Игнатова С. А. Получение гаплоидов при скрещивании *Hordeum vulgare* с *Hordeum bulbosum* // Сельскохозяйственная биотехнология. — 1983. — № 5. — С. 8–15.
 14. Jahne A., Lorz H. Cereal microspore culture // Plant Sci. — 1995. — Vol. 109. — P. 1–12.
 15. Белинская Е. В. Влияние гаметного отбора в культуре пыльников *in vitro* на изменчивость признаков продуктивности удвоенных гаплоидов ячменя // Международный симпозиум: Молекулярные механизмы генетических процессов и биотехнология. Москва 18–21 ноября 2001. — С. 121.
 16. Гурецкая В. С., Шишлов М. П., Гордей И. А. Генотипическая специфичность морфогенеза и эффективность использования фитогормонов в культуре пыльников ячменя *in vitro* // Международный симпозиум: Молекулярные механизмы генетических процессов и биотехнология. Москва 18–21 ноября 2001. — С. 128.
 17. Ming Y. Z., Zeng H. Microspore culture in wheat *Triticum aestivum* doubled haploid production via induced embryogenesis // Plant Cell, Tissue Organe culture. — 2003. — Vol. 73. — P. 213–230.

Л. С. Шепель, М. Л. Махновская, С. А. Игнатова,

Южный биотехнологический центр в растениеводстве УААН,
Лаборатория культуры тканей
Овидиопольская дорога, 3, Одесса, 65036, Украина, e-mail:
sh_lyudmila@bigmir.net

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ УСТОЙЧИВЫХ К МУЧНИСТОЙ РОСЕ ФОРМ ЯРОВОГО ЯЧМЕНЯ

Резюме

Представлены результаты исследований по получению устойчивых к мучнистой росе регенерантов из изолированных незрелых зародышей отдаленных гибридов *Hordeum vulgare* ($2n = 14$) × *Hordeum bulbosum* ($2n = 28$) в условиях *in vitro*. Показано, что эффективность отдаленной гибридизации зависит от генотипов культурного ячменя. В результате получены амфиплоидные и гаплоидные растения-регенеранты. С использованием метода культуры пыльников из гибридов F₂ Гетьман × Astoria, Гетьман × Madonna получены линии, которые по предварительной оценке были устойчивыми к мучнистой росе.

Ключевые слова: *Hordeum vulgare*, *Hordeum bulbosum* отдаленная гибридизация, гибрид, культура пыльников.

L. S. Shepel, M. L. Machnovskaya, S. A. Ignatova

South Plant Biotechnology Center,
Plant Tissue Laboratory,
Ovidiopolskaya St., 3, Odessa, 65036, Ukraine, e-mail: sh_lyudmila@bigmir.net

**THE BIOTECHNOLOGICAL METHODS OF OBTAINING SPRING
BARLEY THE FORMS RESISTANT TO POWDERY MEALYDEW**

Summary

The results of obtaining the regenerants resistant to powdery mealydew from the isolated unripe embryo of distant hybrids *Hordeum vulgare* (2n = 14) x *Hordeum bulbosum* (2n = 28) in *in vitro* conditions are presented. It is shown, that efficiency of distant hybridization depends on the genotypes of cultural barley. The amphiploid and haploid regenerants were received as the result of it. By using anther culture method the lines resistant to powdery mealydew were received by preliminary estimation from F₂ Hetman x Astoria, Hetman x Madonna hybrids.

Keywords: *Hordeum vulgare*, *Hordeum bulbosum*, wild hybridization, a hybrid, anther culture.