

УДК: 633.11:581.143.5

Умови культивування пиляків *in vitro* тритикале І.В.Гребенюк

Інститут рослинництва імені В.Я.Юр'єва (Харків, Україна)

Узагальнено дані із застосування методу культури пиляків *in vitro* у зернових та умов культивування пиляків *in vitro*. Описані основні фактори, які впливають на частоту індукції андрогенних структур *in vitro* в культурі пиляків тритикале.

Ключові слова: *культура пиляків in vitro, андрогенна структура, тритикале.*

Ідея створення гібридів між пшеницею й житом виникла понад 100 років тому. Уперше пшенично-житній гібрид описав англійський ботанік Вільсон в 1876 р. У 1891 р. німецький селекціонер Рімпау синтезував тритикале шляхом схрещування м'якої пшениці й жита (Фурсова та ін., 2004). Відкриття поліплоїдизуючих речовин – колхіцину, аценафтену дозволило здолати стерильність гібридів першого покоління в селекції тритикале.

В Україні сорти гексаплоїдного тритикале були створені в другій половині минулого століття в Інституті рослинництва ім. В.Я.Юр'єва УААН під керівництвом професора А.Ф.Шулиндіна методом біологічного синтезу. В основі методу – запилення гібридів F_1 м'якої пшениці та жита гексаплоїдними тритикале різного походження (Фурсова та ін., 2004).

Сьогодні селекцією тритикале займаються вчені багатьох країн світу. Світова площа посіву тритикале становить понад 1,5 млн. га, у тому числі в Україні близько 100 тис. га. Найбільшого поширення яре тритикале набуло в Австралії, Польщі, Білорусії, Іспанії (Рябчун та ін., 2007).

Тритикале, як нова сільськогосподарська культура, об'єднує в собі високий потенціал продуктивності та відмінних хлібопекарських властивостей пшениці з високою стійкістю до екологічних стресів і хвороб та біологічними властивостями білка жита.

Тритикале за багатьма показниками (урожайності, вмісту білка й незамінних амінокислот, харчової й кормової цінності) перевершує батьківські форми, а за стійкістю до несприятливих ґрунтово-кліматичних умов і до небезпечних хвороб переважає пшеницю й не поступається житу.

За зовнішнім виглядом зернівка тритикале поєднує в собі ознаки зернівки пшениці і жита. Вона звичайно довша (10–12 мм), і ширша (до 3 мм), ніж зернівка пшениці. Ендосперм має структуру, типову для злакових культур. Нерідко в результаті підвищеної активності амілази, яка руйнує крохмальні зерна, дозрівші зерна формуються погано виповненими, зморщеними.

За натурою зерно тритикале поступається пшениці (пшениця 785–808 г/л, тритикале 730–754 г/л), але звичайно перевершує зерно жита (550–712 г/л). Вміст білку в зерні тритикале на 1–1,5 % вищий, ніж у пшениці, і на 3–4 % вищий, ніж у жита. Вміст клейковини такий же, як і у пшеничного зерна, або на 2–4 % вищий, але якість її нижча, бо успадковується від жита. У тритикале більш сприятливий, ніж у пшениці, амінокислотний склад білків.

Зерно тритикале, порівняно до житнього, легше розмелюється, борошно містить більше золи та висівок, менше клейковини. Хлібопекарські якості борошна тритикале залежать від сполучення різних факторів: вмісту крохмалю, водоутримуючої здатності пентозанів, пружності клейковини, активності амілази.

За останній час в Україні створені сорти ярого тритикале, які мають високу продуктивність, високі хлібопекарські властивості, стійкість до хвороб, – Аіст харківський, Хлібодар харківський, Жайворонок харківський.

Яре тритикале – культура історично «молода», і дослідження, спрямовані на створення вихідного матеріалу, потребують обґрунтування і розробки нових методичних підходів, узагальнень, пояснень. При цьому доцільно використовувати різні методи, в т.ч. і біотехнологічні, серед яких метод культури пиляків *in vitro*.

Біотехнологія рослин – це синтез методів культури рослинних клітин і тканин з методами молекулярної біології і техніки рекомбінантних ДНК. Експериментально створена система – клітини і тканини вищих рослин, які вирощуються поза організмом на штучних живильних середовищах в умовах строгого контролю (умови *in vitro*) дозволяють не тільки вивчати такі процеси як ріст, клітинне диференціювання і розвиток рослинного організму, але й створювати нові технології для сільського господарства.

За допомогою подвоєних гаплоїдів досягається збільшення ефективності селекції в порівнянні з педігрі методом як за якісними ознаками, так і за кількісними (Ігнатова та ін., 2007). Ефективність збільшується також за рахунок прискорення періоду отримання подвоєних гаплоїдів.

Лінії злакових культур з певними генетичними ознаками і господарсько-цінними властивостями необхідні для селекційного процесу. В даний момент біотехнологія пропонує для використання в селекційно-генетичних цілях метод культивування пиляків *in vitro*.

Метод культури пиляків *in vitro* дозволяє створювати гомозиготні лінії, суттєво прискорюючи селекційний процес, підвищуючи надійність оцінки матеріалу, зменшуючи об'єми селекційних робіт. Важливе те, що лінії подвоєних гаплоїдів відповідають вимогам Міжнародного союзу з охорони нових сортів рослин щодо однорідності і стабільності при розмноженні і являють собою цінний матеріал для різноманітних генетичних досліджень (Білинська, 2007).

Гаплоїдам властива низка переваг в селекційній роботі:

- вони мають один набір хромосом, характерний для гамет, що дає селекціонерам можливість спостерігати мутації відразу при огляді гаплоїдних рослин, тому що всі рецесивні генні мутації в гаплоїдних рослинах не маскуються домінантними алелями;
- їх можливо використовувати для кількісного генетичного аналізу, вивчення взаємодії генів, вивчення генетичної мінливості, визначення груп зчеплення;
- вони не мають летальних або сублетальних мутацій, які призводять до загибелі або ослаблення потомства.

Культивування пиляків у злакових культур широко застосовується для прискореного створення гомозиготних рекомбінантних ліній, які використовують в селекційних програмах у Канаді, Китаї, Фінляндії, Німеччині, Франції, Австралії, Угорщині, Росії, Україні, Казахстані та інших країнах (Вајаї, 1990; Dogramaci-Altuntepe et al., 2001; Білинська, 2007).

Вперше в 1964 році гаплоїдні рослини були отримані при культивуванні пиляків дурману (Guha, Maheshwari, 1964).

Внаслідок особливого значення хлібних злаків роботи з різними представниками цієї родини просуваються найбільш успішно (Chu et al., 1975; Внучкова, 1988; Паламарчук и др., 1995; Chen, Dribnenki, 2002; Білинська, 2006).

В середині 60-х років були розпочаті генетичні дослідження культивованих *in vitro* клітин рослин в Україні. Першою була робота «Цитогенетична характеристика культури тканин гаплопаппусу» (Кунах, 2001). Було встановлено, що для тривало пасованої культури тканин *Haplorappus gracilis* характерною є міксоплоїдія з розмахом за числом хромосом від $2n$ до $24n$. Додавання до складу живильного середовища кінетину приводило до значного підвищення рівня плоїдності клітин, а також анафазних аберацій хромосом від 8% до 35,8%.

В 70-х роках генетичні дослідження культивованих рослин виконувались переважно в Інституті молекулярної біології і генетики НАН України (В.П.Зосимович, В.А.Кунах), Інституті ботаніки ім. М.Г.Холодного НАН України (П.Г.Сидоренко, М.М.Півень), Інституті фізіології рослин і генетики НАН України (Д.М.Гродзинський, А.М.Бондаренко), Селекційно-генетичному інституті УААН (С.Ф.Лук'янюк, С.О.Ігнатова) (Кунах, 2001).

Дослідження з експериментального андрогенезу *in vitro* у Інституті рослинництва ім. В.Я.Юр'єва були розпочаті у 1988 р. Вони були спрямовані на вивчення різних за природою факторів, які впливають на процеси індукції андрогенних структур і регенерації рослин у культурі пиляків *in vitro*. За мету було визначено розробку технології одержання гаплоїдів, яка не поступалася за ефективністю методу «бульбозум», який застосовувався з 1981 р. (Манзюк, Наумова, 1987), і її впровадження у селекційний процес.

У 1988–1993 рр. було виконано серію експериментів, в результаті яких була розроблена методика одержання асептичної культури пиляків *in vitro*, оптимізовано температурно-світлові режими вирощування донорських рослин і рослин-регенерантів в умовах штучного клімату та попередньої низькотемпературної обробки колосся, удосконалено склад штучних живильних середовищ для культивування пиляків, андрогенних структур і регенерації рослин (Білинська, 2007).

В якості оптимального для вирощування рослин-донорів пиляків в умовах штучного клімату було запропоновано режим, який характеризується поєднанням дещо зниженої температури ($+12^{\circ}\text{C}$) і високої освітленості (35 клк) протягом усього вегетаційного періоду (Білинська, 2007).

Основу методу культури пиляків складає явище андрогенезу *in vitro*, сутність якого полягає у зміні програми розвитку мікроспор у штучних умовах культивування із гаметофітної на спорофітну і багатократному їх поділі з утворенням андрогенних структур (багатоядерні, багатоклітинні ендоспоріальні комплекси, калюс, ембріоїди) і рослин-регенерантів (Иванова и др., 2004; Білинська, 2007).

Схемою одержання гаплоїдів та подвоєних гаплоїдів у культурі пиляків *in vitro* передбачається вирощування вихідного матеріалу, вилучення пиляків у асептичних умовах, їх культивування на штучному живильному середовищі для індукції андрогенних структур, регенерація рослин та одержання насінневого потомства рослин-регенерантів в умовах штучного клімату.

Формування із мікроспори *in vitro* рослини є складним морфогенетичним процесом (Иванова и др., 2004; Batygina, Vasilyeva, 2003; Круглова, 2002). Незважаючи на значний прогрес у галузі експериментального андрогенезу *in vitro*, досягнутий протягом останнього десятиріччя, досі невідомі регуляторні механізми, які спричиняють дедиференціацію мікроспор і їхній подальший розвиток по спорофітному шляху. Актуальною лишається проблема альбінізму рослин-регенерантів у культурі пиляків злакових.

Отримання гаплоїдних рослин із ізольованих пиляків може відбуватись двома шляхами: пряма регенерація соматичних зародків – всередині пиляків утворюються проембріодні структури, які дають начало гаплоїдним рослинам; та калюсогенез – клітини, які утворились внаслідок поділу, швидко збільшуються в розмірах та утворюють калюс. Внаслідок подальшого морфогенезу ці калюси можуть регенерувати в цілі рослини під впливом фітогормонів, які стимулюють утворення проростків (Lu et al., 2000).

Здатність регенерації в цілу рослину залежить від тотипотентності клітин, або від їх генетичного потенціалу. Завдяки цьому феномену тотипотентності рослини можуть здійснювати повне виконання програм розвитку в умовах *in vitro* (Dogramaci-Altuntepe et al., 2001). Вперше на тотипотентність рослинних клітин вказав Haberlandt (Haberlandt, 1902).

Аналіз літературних джерел свідчить про те, що на ранніх етапах роботи по вивченню андрогенезу *in vitro* виникло припущення про існування в пиляках особливої фракції морфогенних мікроспор, які здатні розвиватись по спорофітному шляху (Сидоров, 1990).

За концепцією Т.Б.Батигіної (Батыгина, 2007), отримання гаплоїдних рослин через культуру пиляків *in vitro* можливо трьома шляхами:

1. з використанням природних аномалій в самому пиляку;
2. з використанням штучних аномалій;
3. з використанням нормально розвинутих мікроспор.

В пізніших роботах автор вказує на те, що третій шлях пов'язаний із зняттям нормальної гаметофітної детермінації в розвитку цих структур; тому правильніше говорити тільки про перший та другий шлях отримання гаплоїдних регенерантів (Батыгина, 2007).

Клітини в культурі *in vitro* зазнають суттєвих змін як у ядерному, так і у позаядерному геномі (Матвиенко и др., 1994). Їх певна частина представлена у клітинах вихідних рослин ще до введення їх у культуру *in vitro*: геномні зміни закономірно виникають в клітинах у процесі їх диференціювання. Протягом онтогенезу накопичуються також незапрограмовані, випадкові зміни і мутації (Кунах, 2003). Геномні зміни можуть виникати при введенні клітин в культуру *in vitro*, під час вирощування в ізольованих умовах на штучних живильних середовищах (Кунах, 2003).

Першим етапом введення клітин у культуру *in vitro* є індукція калюсогенезу. Індукція процесів дедиференціації передбачає перепрограмування геному. Як зазначає В.А.Кунах (Кунах, 2003), це проявляється геномними перебудовами. Відмінності у геномній мінливості зумовлені генотиповими особливостями рослини (видом, сортом, лінією), станом геному в клітинах вихідного експланта (Кунах, 2003).

Особливості перебігу геномної мінливості під час дедиференціювання визначаються взаємодією системи генотип-середовище, тому що поранення, компоненти живильного середовища, конкретні умови культивування впливають на експресію генів, які відповідають за калюсогенез (Кунах, 1999).

На основі отриманих результатів В.А.Кунах зі співавторами зробили висновок про те, що у генетично гетерогенних популяціях здатність до регенерації мають переважно диплоїдні, рідше – тетраплоїдні клітини без видимих хромосомних аберацій (Кунах и др., 1984; Кунах, 1994, Зеленин, 2003).

Перші результати по отриманню гаплоїдів тритикале через культуру пиляків *in vitro* були опубліковані Wang et al. (Wang et al., 1973) у октоплоїдних форм та Ono and Larter (Ono, Larter, 1976) у гексаплоїдних форм.

Аналіз літературних джерел показав, що для підвищення частоти індукції андрогенних структур *in vitro* в культурі пиляків велике значення мають наступні фактори: генотип та фізіологічний стан донорних рослин, стадія розвитку мікроспор, попередня обробка зразків низькими температурами, живильні середовища та умови культивування.

Літературні дані по культурі пиляків *in vitro* не багаточисельні та свідчать про недостатньо високу результативність цього методу для тритикале. Стосовно цієї культури роль генотипу та умов культивування пиляків *in vitro* вивчена недостатньо, а робіт по культурі пиляків *in vitro* ярого тритикале майже немає.

Генотип рослини-донора. Відповідь генотипу контролюється конституцією донорної рослини. До цього часу кількість рослин, яку отримували, не виходила за 1% від кількості інокульованих пиляків. І тому вважалось, що злаки являють собою види, які не піддаються умовам культивування. В демонстрації своїх результатів Ouyang et al. (Ouyang et al., 1973) показали, що тільки 3% пиляків

утворюють калюси, та тільки 10% з них здібні продукувати зелені рослини (Dogramaci-Altuntepe et al., 2001).

Вплив генотипу на процес андрогенезу показано багатьма авторами. Встановлено, що різні генотипи дають різний вихід регенерантів при культивуванні пиляків на конкретному живильному середовищі (Лукьянюк, Игнатова, 1981; Сорокин, 1991; Лукьянчук, Шерер, 1992; Li, Hu, 1993; Горбунова, Круглова, 1997; Горбунова, 2001). Є публікації, в яких вказується на неспроможність пиляків деяких генотипів на всіх вивчених середовищах давати андрогенні структури (Горбунова, 1993).

При культивуванні пиляків *in vitro* гібриди дають більший вихід андрогенних структур порівняно з батьківськими формами (Martinez Garsia et al., 1992). Для збільшення ефективності отримання гаплоїдів в культурі пиляків пропонується використання гібридів F_2 (Игнатова та ін., 2007).

Рівень морфогенетичної відповіді генотипів у культурі пиляків часто буває непередбаченим через невідомий діапазон норми реакції взятої форми на умови *in vitro* та на живильне середовище. Встановлено, що його можна корегувати попереднім тестуванням генотипів у культурі пиляків на декількох варіантах різних базових середовищ, варіюючи умовами культивування (Игнатова та ін., 2007).

Взяті для культури пиляків *in vitro* генотипи можуть давати подвоєні гаплоїди в недостатній кількості для вирішення поставлених задач. Тому різними дослідниками пропонується в роботі із створення гомозиготних ліній використовувати генотипи, які мають високу здатність до регенерації зелених рослин, так звані донори чи «bridge varieties», або генетичні джерела (Chu, Hill, 1988; Choo, 1982; Махновская, 1999).

При проведенні тестування генотипів за відгуком матеріалу пшениці в умовах культури *in vitro* спостерігався розподіл вивчаємих генотипів на дві групи (Игнатова та ін., 2007). У першій групі на 15-й день культивування пиляків у мікроспорах починалось активне утворення маси ядерного матеріалу, а у період між 20 і 25 добою з'являлись багатоядерні, багатоклітинні і перші калюсні структури. У другій групі генотипів у деяких з мікроспор на 15-у добу відбувалися структурні зміни, але на 25-у добу виявлялася їх деградація, а калюсних структур утворювалась незначна кількість. Це спостереження підтверджує значення відсотку андрогенних структур від кількості висаджених пиляків. З викладеного зроблено висновок про те, що при тестуванні пилякового матеріалу на 25–30-й добі вже напевно можливо робити прогноз про рівень здатності генотипу до гаплопродукції – чим більша кількість андрогенних структур на 20–25-й добі культивування, тим вищий відгук генотипу. Якщо утворюється незначна кількість андрогенних структур, то є імовірність того, що запропоновані умови культивування та живильне середовище не є оптимальними для даного генотипу (Игнатова та ін., 2007).

В окремих експериментах з гібридами, одержаними у реципрокних схрещуваннях, виявлено материнський вплив. В деяких випадках у лінії з материнською стерильністю спостерігається високий вихід андрогенних структур (Lasar, 1987).

Інші автори стверджують, що перенесення андрогенетичної здатності до гібридів F_1 не залежить від джерела цитоплазми (Foroughi-Wehr, 1984).

S.Agache (Agache, 1988) не виявив в своїх дослідках кореляції між частотою утворення андрогенних структур та частотою регенерації з них, що свідчить про незалежний генетичний контроль цих ознак.

На основі вивчення андрогенетичної здатності нащадків гібрида F_1 A.Sonnino (Sonnino, 1992) заключив, що ця ознака контролюється більш ніж одним головним геном. Отримання рослин з андрогенетичною здатністю від батьків, які втратили цю спроможність, свідчить про те, що андрогенетична здатність контролюється рецесивними генами або отримується при комплементатії різних факторів, присутніх по одному у батьків. Виходячи з цих даних, а також робіт (Милованович, Кубович, 1995), можливо припустити, що андрогенетична здатність може бути перенесена схрещуваннями у будь-який генетичний матеріал, який її не має.

Проведене Bullock вивчення сортових особливостей по відповіді в культурі пиляків та їх гібридів від реципрокних схрещувань показало, що відповідь F_1 гібридів була проміжною у порівнянні з батьківськими формами (Bullock et al., 1992). Виходячи з цього, автор зробив припущення, що здатність до андрогенезу успадковується незалежно від материнської цитоплазми, а її передача зачіпає ядерно-цитоплазматичну взаємодію.

Стадія розвитку мікроспори. На частоту калюсогенезу висаджених на живильне середовище пиляків впливає стадія розвитку мікроспори.

Для всіх злакових культур характерно, що гаплоїди з мікроспор утворюються, коли їх основна маса знаходиться на однопольній стадії – це період від ранньої однопольної до двохпольної з піком від середньої до пізньої двохпольної стадії (вакуолізована мікроспора) (He Ding-Doang, Ouang Jun-Wen, 1984; Горбунова, Круглова, 1997; Анапиев, 1998; Schumann, 1990; Батыгина и др., 1992; Круглова, 2001; Круглова, Батыгина, 2002; Batygina, Vasilyeva, 2003). Особливість структурної

організації такої клітини: наявність добре розвинутої центральної вакуолі та крупного ядра, розташованого навпроти пори проростання. Сильновакуолізована мікроспора характеризується полярністю. В цей момент забезпечується найбільш висока компетентність мікроспор переключатись з гаметофітного шляху розвитку на спорофітний. На питання, який відсоток таких компетентних мікроспор в пиляку та якими шляхами вони реалізують свій морфогенний потенціал, дослідники мають різноманітні погляди. Heberle-Bors (Heberle-Bors, 1989) вважає, що це аномальні спори, у яких здатність змінювати шлях розвитку визначається їх генетичною природою в *in vivo* періоді. Цієї думки дотримуються й інші дослідники (Турашева и др., 1999).

Є припущення Li з співавторами, що у період від видалення пиляків з квіток до потрапляння в умови *in vitro* підключаються до роботи фактори, що впливають на змінення шляху розвитку мікроспор, такі як умови попередньої обробки зрізаних колосків, а потім і пиляків (Li et al., 2000).

В культурі пиляків рослини-регенеранти можуть утворюватись не тільки із мікроспор, а й із соматичних клітин стінки пиляка. Однак, стінка пиляка може виробляти речовини, які заважають процесу андрогенезу (Джори, Рао, 1990).

На озимих та ярих сортах пшениці вивчали ранні етапи андрогенезу мікроспор в пиляках. Спостерігали рівноядерні та нерівноядерні пилкові зерна, двоклітинні мікроспори з ядрами однакового розміру, за походженням внаслідок рівного поділу. Після першого тижня культивування можна було бачити багатоклітинні та багатоядерні пилкові зерна з більш ніж 4 ядрами. Із збільшенням терміну культивування збільшувалась частка багатоядерних структур. Використання холодової попередньої обробки сприяло появі більшої кількості багатоклітинних культур з добре розвиненими клітинними оболонками, при добрій видимості зовнішньої спільної оболонки, що їх оточує. Розтріскування оболонки приводило до створення проембріода. У деяких випадках спостерігали розпад пилкових оболонок одразу після декількох мітотичних поділів. Такі клітини швидко збільшувались в розмірах та створювали недиференційований калюс чи ембріонально-клітинний комплекс (Ігнатова, 2001).

Холодова обробка колосся донорних рослин. Обробка донорних рослин *in situ* низькими температурами (3–7°C) протягом деякого часу до інокуляції пиляків на поживне середовище також впливає на частоту калюсогенезу в культурі пиляків *in vitro*. Фактично попередня обробка холодом є складовою частиною технології отримання регенерантів в культурі пиляків. Дослідники встановили (Каерплер, Каерплер, 2000), що низькотемпературний стрес веде до утворення великої кількості багатоклітинних структур в пиляках.

В дослідях встановлено, що холод провокує «відрив» мікроспор від стінки пиляка (Круглова, 2006). Такий відрив призводить до порушення пиляка як системи, порушення морфогенетичних кореляцій між тканинами стінки пиляка та мікроспорами, що порушує детермінацію нормального розвитку пилку. Крім того, змінюється структурна організація мікроспори та стінки пиляка (дегенерація).

В більшості робіт термін холодової обробки зрізаних рослин змінювався від 1 до 14 діб (Внучкова, 1979; Slusarkiewicz-Jarzina, Ponitka, 1997; Каерплер, Каерплер, 2000; Heberle-Bors, 1989; Zhou, 1996).

В дослідях звертається увага на необхідність підбору тривалості періоду попередньої обробки для конкретних умов роботи по одержанню регенерантів, оскільки від цього може залежати активність та швидкість регенерації та співвідношення зелених та альбіносних рослин (Дмитриєва, 1981; Глеба, Сытник, 1984). Крім того, є думка про те, що вірно підібрана тривалість холодової обробки для конкретних умов вирощування може сприяти індукції спорофітного шляху розвитку (Huang, 1987; Verma, 2001).

Склад живильного середовища та його компоненти. Живильне середовище – важливий фактор гаплопродукції, від якого залежить оптимальний перебіг стадії формування андрогенних структур в культурі пиляків тритикале та безпосередньо регенерація рослин.

Живильне середовище – це базис, від якого залежить життєзабезпечення всіх структур (Clapham, 1973). Відомо, що всі компоненти живильного середовища, не виступаючи окремо індуктором спорофітного шляху розвитку мікроспор, можуть впливати на проходження процесу.

Для культивування *in vitro* використовують середовища, які різняться не тільки мінеральною основою, композицією живильних та біологічно активних речовин, але й фізичним станом: рідкі, тверді, напівтверді, з двох фаз. В декількох працях показані переваги використання рідких живильних середовищ порівняно з твердими живильними середовищами (Sunderland, 1978; Pasternak, Prinsen, 2002). Йохансен та Еріксон запропонували новий метод «подвійного шару» з додаванням в живильне середовище активованого вугілля (Jochansen, Eruckson, 1990). Вони культивували пиляки в чашках Петрі, які містили в якості нижнього шару напіврідке середовище з активованим вугіллем, а зверху було рідке середовище без активованого вугілля. В тих випадках, коли активоване вугілля вводили в живильне середовище з агаром на деякий час та виводили перед інокуляцією пиляків, відмічається збільшення числа ембріодів порівняно з культурами, які вирощують на середовищі, обробленому

активованим вугіллям. Культура пиляків, плаваючих в рідкому середовищі, має ряд переваг порівняно з культурою на твердому середовищі.

При використанні рідких живильних середовищ ріст калюсу відбувається у 6 разів швидше, ніж на живильному середовищі з використанням агару. Культура пиляків в рідкому живильному середовищі сприяє не тільки збільшенню виходу калюсів та ембріодів, а й також спонтанному виходу мікроспор з пиляків (Dunwell et al., 1987).

Агар-агар. Для приготування живильних середовищ як ущільнюючу речовину використовують агар-агар (Дьячук, Дьячук, 1986) в кількості 6–8 г/л, який являє собою складну суміш полісахаридів. Але є експериментальні дані про те, що навіть найбільш очищені зразки агар-агару містять речовини, які зменшують калюсогенез та регенерацію рослин в культурі пиляків *in vitro* (Kohlenbach, Wernike, 1978; Тырнов, 1998). У зв'язку з цим рекомендується замінювати агар-агар агарозою (Fadel, Wenzel, 1990) або крохмалем, а також використовувати рідкі живильні середовища з фіколом – синтетичним полімером на основі глюкози (Као, 1991). У результаті дослідів з мікроклонального розмноження овочевих культур значне зниження вітрифікації рослин-регенерантів отримали при заміні агару модифікованими крохмаллями ДККмод та ДР-1 (Гончарова, 2004).

У досліді з утвореними андрогенними структурами 2004 року ячменю було встановлено, що на середовищі з агаром утворювався калюс, не здатний до регенерації. На середовищі з ДККмод калюси були невеликого розміру (1 мм), однак з таких глобул утворювались ембріоди (Белинская, Дульнев, 2007; Білинська, 2007).

Кожний дослідник в своїй роботі використовує, як правило, не один варіант середовища. Рекомендується культивування одночасно на декількох живильних середовищах із різним співвідношенням регуляторів росту. Успіх отримання калюсу в значній мірі залежить від добре вибраних регуляторів росту, які індукують поділ клітин. Як зазначається у більшості робіт, найбільш поширеними живильними середовищами, які використовують для культури пиляків *in vitro*, є: китайські середовища N-6 (Chu, 1978) та середовище з картопляним екстрактом POTATO-2 (Chuang et al., 1978); середовище Мурасіґа та Скуґа MS (Murashige, Skoog, 1962), середовище Гамборґа та Евелєґа B-5 (Gamborg, Eveleigh, 1968).

При оптимізації живильного середовища, його складу та концентрації фітогормонів Єрмішина та Гордей (Єрмішина, Гордей, 2001) зробили висновок, що такий підхід ефективний при роботі з невеликою кількістю генотипів тритикале, які мають відносно високу андрогенетичну здатність. В досліді з участю різного в генетичному відношенні матеріалу з невисокою андрогенетичною здатністю використовується невелика кількість живильних середовищ.

Зміни, які вносять в живильне середовище, стосуються тільки деяких компонентів, – фітогормони, амінокислоти, джерело вуглецю, вітаміни. Маніпулюючи складом живильного середовища на певних етапах, можна дедиференціювати окремі генотипи та проводити порівняння їх поведінки у культурі пиляків. Особливо великий внесок у вивчення впливу компонентів середовища на результати гаплопродукції був зроблений китайськими дослідниками. Почавши з вивчення концентрації цукрози та доведення її рівня до 9%, з вивчення амоній-нітратного співвідношення складу середовища N-6 та двох варіантів середовищ POTATO, дослідникам вдалось збільшити вихід гаплоїдів для будь-якого генотипу в середньому на 10% (Абрамов, 2001; Александрова, Лукьянюк, 1990).

Компоненти живильного середовища поділяють на наступні групи: мікроелементи, макроелементи, джерела заліза, вітаміни, джерела вуглецю, фітогормони.

Основою для всіх живильних середовищ є суміш **мінеральних солей**.

Азот. У складі більшості поживних середовищ азот представлений у вигляді нітрату, в деяких середовищах додають ще і солі амонію (середовища Мурасіґа і Скуґа, Гамборґа). Нітрати, як основне джерело азоту, вводяться в середовище в концентрації від 2 до 25 мМ. Існує чітка кореляція між збільшенням сирової ваги суспензії клітин рослин і використанням нітратів із середовища, що свідчить про значне перетворення нітратів в органічні сполуки. Заміна 10–20 % нітратів на солі амонію сприяє кращому росту тканин (Сидоров, 1990).

Фосфор. Для росту калюсних культур необхідним компонентом є фосфор, який використовується у вигляді ортофосфату.

Сірка. Вносять її до складу середовища у вигляді сульфату, сульфіту, цистеїну, глутатіону або метіоніну.

Залізо. Вводиться у вигляді неорганічних солей (FeCl_2 , $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$) і солей органічних кислот (лимоннокисле залізо). Доцільно вводити хелатуючі реагенти, такі як етилендіамінтетраоцтова кислота (ЕДТА). Наявність цієї сполуки покращує доступ заліза при широкому діапазоні рН.

Крім основних мікроелементів, до складу також входять мікроелементи.

Для формоутворення в культурі пиляків *in vitro* необхідні біологічні регулятори росту та розвитку – **фітогормони**. Ці речовини впливають на диференціацію та дедиференціацію клітин,

ініціюють гістогенез, поділ та розтягнення клітин або знижують ріст та розвиток калюсних культур (Dogramaci-Altuntepe et al., 2001).

В біотехнологічних досліджах використовують гормони, які стимулюють ріст та розвиток: ауксини, цитокініни, гібереліни. Першу роботу про введення фітогормонів в склад живильного середовища було опубліковано в 1964 році (Guha, Maheshwari, 1964).

2,4-дихлорфеноксиоцтова кислота (2,4-Д) – основний фітогормон, який застосовують для ініціації калюсогенезу. Концентрації 2,4-Д змінюються від 0,5 (Добровольская и др., 2001) до 10 мг/л (Hassawi, Liang, 1990). Деякі дослідники використовують безгормональне живильне середовище без додавання 2,4-Д (Добровольская и др., 2001).

При аналізі літературних джерел встановлено, що найбільш оптимальною концентрацією для ініціації калюсогенезу у злакових культур є концентрація 2 мг/л (Bernard, 1980; Martinez Garsia et al., 1992).

В результаті багаточисельних експериментів встановлено, що індолилоцтова кислота (ІОК) – ключовий гормон в системі регуляції морфогенезу у рослин. Встановлено, що індукція утворення андрогенних структур визначається балансом між концентрацією екзогенного 2,4-Д в модифікованому живильному середовищі та вмістом ендогенної ІОК в пиляку на момент інокуляції (Круглова, 2002). Для кожного сорту або гібриду такий баланс буде свій. Підбір такого балансу дозволяє керувати процесом морфогенезу мікроспор в культурі *in vitro* і сприяє прискоренню отримання андрогенних структур (Roitsch, 2000).

У дослідях з тритикале проведено порівняльне вивчення впливу 2,4-Д, калієвої та натрієвої солей, як первинних індукторів дедиференціювання. За впливом на загальну кількість сформованих андрогенних структур, представлених в основному калюсами та ембріодами, виявилася ефективною 2,4-Д. Солі, знижуючи кількість андрогенних структур в цілому, позитивно впливали на утворення ембріодів. Калієва сіль, зокрема, створювала позитивний вплив на регенерацію рослин і поліпшувала співвідношення на користь зелених рослин.

Зміна співвідношення ауксин/цитокінін в живильному середовищі призводить до змін в розвитку клітин *in vitro*. При переважанні ауксинів починається процес ризогенезу, при переважанні цитокінінів починається органогенез. При вилученні із живильного середовища ауксинів і цитокінінів в культурі пиляків починається утворення біполярних структур – зародків. У кожного з них буде своє джерело цитокінінів та ауксинів (Dogramaci-Altuntepe et al., 2001).

Амінокислоти. Важливими компонентами живильного середовища для культури пиляків *in vitro* є амінокислоти. Вони відіграють важливу роль в метаболізмі клітини, є джерелом азоту.

Проте потреба у цих речовинах для кожного генотипу різна. Ігнатова із співавторами (Ігнатова та ін., 2007) вивчали у одного генотипу тритикале зміну вмісту амінокислот в пиляку, починаючи з одноядерної стадії розвитку мікроспор до моменту появи калюсів (два тижні культивування). Порівняно з вмістом амінокислот в пиляках до обробки пиляків низькими температурами не спостерігали зміни вмісту амінокислот після холодової обробки.

Після культивування на живильному середовищі В-5 збільшився рівень глютамінової кислоти в 1,5 рази, проліну – більш ніж в 3 рази, в розрахунок на вміст азоту в сухій речовині пиляка. Ці результати свідчать про важливу роль вказаних амінокислот в метаболізмі мікроспор. Також Ігнатова із співавторами вивчали вплив додавання в культуральне живильне середовище проліну, оксипроліну, глютаміну. Отримані дані свідчать про те, що майже в 6 разів збільшується частота утворення андрогенних структур при додаванні проліну, більш ніж в 4 рази – при додаванні оксипроліну, в 5 разів – при додаванні глютаміну. Введення цих компонентів також вплинуло на подальший органогенез.

Глютамін в основному впливав на появу калюсів, а пролін і оксипролін – на ембріогенез. Цілком імовірно, що ці амінокислоти беруть активну участь у синтетичних процесах утворення різних білкових комплексів і ферментів, що відіграють важливу роль у побудові багатоклітинних структур і їхніх клітинних стінок, можливо, і в реалізації важливих морфорегуляторних функцій у клітинах. Також вивчено ефективність впливу додавання у живильне середовище деяких органічних кислот (у концентраціях по 25 мг/л), що нарівні з амінокислотами мають важливе значення для рослинного організму і є попередниками їх синтезу. Високу активність впливу на частоту появи андрогенних структур відзначено у варіанті з кетаглютаровою кислотою та піровинограднокислим натрієм. За кількістю одержаних рослин кращими виявилися варіанти з присутністю бурштинової кислоти. Зелених рослин було одержано більше на середовищах з піровинограднокислим натрієм, бурштиновою, фумаровою, ізолимонною та яблучними кислотами.

Джерело вуглецю. Живлення культивованих тканин є гетеротрофним, тому джерело вуглецю вводиться в склад живильного середовища у вигляді сахарози або глюкози.

У дослідях з тритикале відмічали інтенсивне калюсоутворення при збільшенні рівня сахарози в середовищі до 10–12 % (Ono, Larter, 1976), однак це збільшувало процент альбіносних рослин.

Виходячи з цього, в роботі по отриманню андрогенних структур було запропоновано зменшити концентрацію сахарози до 3% (Сулима, Ігнатова, 1992).

Важливу роль у покращенні ефективності середовища для процесу гаплопродукції в культурі пиляків мало додавання вуглецевого джерела мальтози (Charmet, Bernard, 1984; Karsai et al., 1994).

Вітаміни. Як відомо, більшість вітамінів, що входять до складу живильних середовищ, є коферментами, які каталізують різні реакції. Вітаміни використовують для стимуляції біохімічних реакцій в клітинах. Це вітаміни групи В (В₁, В₆, В₁₂), С (аскорбінова кислота), РР (нікотинова кислота), мезоінозит.

Тіамін (вітамін В₁) входить до складу піруватдекарбоксилази і відіграє важливу роль у перетворенні вуглеводів, а також в окислювальному декарбоксилюванні кетокислот. До складу живильного середовища тіамін вводиться в кількості 0,1–10 мг/л.

До складу багатьох живильних середовищ входить піридоксин (вітамін В₆), який бере участь у процесах декарбоксилювання та переамінування амінокислот.

Нікотинова кислота (РР) у вигляді аміду входить до складу окислювально-відновних ферментів – дегідрогеназ. В живильні середовища нікотинова кислота вводиться в концентрації 0,5–1 мг/л (Сидоров, 1990).

Біологічні добавки. Використовують рослинні екстракти (10–15 % від загального об'єму живильного середовища), кокосове молоко (рідкий ендосперм кокосового горіха), гідролізат казеїну (200–800 мг/л) або дріжджовий екстракт (50–100 мг/л) (Eapen, Rao, 1985).

Введення в живильне середовище розчинного крохмалю дозволяє легше досягти відтворення методики, працюючи зі стандартним типом підбраного крохмалю, ніж з картоплею, властивості якої визначаються сортом та умовами вирощування (Chu, Hill, 1988).

Не залишається без уваги наявність трьох перешкод методу – альбіносні рослини, непрогнозована кількість спонтанно отриманих подвоєних гаплоїдів та часто їх генетична нестабільність (Ананьев и др., 1986; Галиева и др., 2002).

В результаті наших дослідів встановлена роль генотипу як визначального фактору в досягненні результативності гаплопродукційного процесу в культурі пиляків ярого тритикале. Також отримані результати показали, що на культуру пиляків *in vitro* впливає склад живильного середовища (більш сприятливими виявились середовища РОТАТО-2 та N-6).

Таким чином, літературні дані та результати наших досліджень (Гребенюк, Рябчун, 2008) дають підставу вважати, що для успішного культивування пиляків в умовах *in vitro* доцільно використовувати в складі живильного середовища:

- помірну концентрацію 2,4-Д (до 2–4 мг/л);
- амінокислоти (пролін, оксипролін, глютамін) – можливо, разом з органічним джерелом азоту в якості макрокомпоненту;
- помірну концентрацію (3–6 %) сахарози; для підтримки проліферації необхідне її зменшення до 2–3 %.

Для збільшення чутливості до умов *in vitro* в культурі пиляків тритикале рекомендується використовувати генетичні джерела з високою гаплопродукційною здатністю і підвищеним виходом спонтанно подвоєних гомозиготних форм, що мають господарсько-цінні ознаки і високу комбінаційну здатність до передачі генетичним шляхом усіх зазначених ознак (Ігнатова та ін., 2007).

Наведений огляд літератури свідчить про інтенсивний розвиток методу культури пиляків *in vitro* у злаків. Разом з тим, досліді з вивчення цього процесу у тритикале обмежені, хоча цей біотехнологічний прийом достатньо перспективний для створення нових високопродуктивних сортів цієї цінної культури.

На нашу думку, вагомим чинником подальшого вдосконалення методу культури пиляків *in vitro* тритикале може бути вивчення залежності інтенсивності морфогенезу і регенерації від стадії розвитку мікроспор, модифікації живильного середовища, температурного режиму культивування, складу живильного середовища для регенерації рослин *in vitro* і умов вирощування рослин-регенерантів.

Список літератури

- Абрамов С.И. Статусы пыльника пшеницы при холодомом стрессе // Докл. годичного собрания Всерос. общ-ва физиологов растений. – Уфа, 2001. – №2. – С. 100–102; 192.
- Александрова Л.Г., Лукьянюк С.Ф. Получение гаплоидных растений в культуре пыльников // Доклады ВАСХНИЛ. – 1990. – №9. – С. 15–17.
- Ананьев Е.В., Бочканов С.С., Сони́на Н.В. и др. Изменение структуры хлоропластного генома у регенерантов тритикале, полученных из микроспор при культивировании пыльников // Доклады ВАСХНИЛ. – 1986. – №6. – С. 2–3.

- Анапиев Б.Б. Особенности андрогенеза *in vitro* в культуре микроспор *Triticum aestivum* L. // Почвозащитная система земледелия и зерновое производство на Евразийском континенте в XXI в.: Тез. докладов междунар. научно-теор. конф. – Новосибирск, 1998. – С. 71–73.
- 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.
- Батыгина Т.Б., Круглова Н.Н., Горбунова В.Ю. Культура изолированных пыльников злаков с позиции экспериментальной эмбриологии растений (методические аспекты). – Уфа: БНЦ УрОРАН, 1992. – 32с.
- Белинская Е.В., Дульнев П.Г. Модифицированный крахмал как компонент питательной среды для получения гаплоидов ячменя в культуре пыльников *in vitro* // Физиология и биохимия культ. растений. – 2007. – Т.39, №2. – С. 136–142.
- Білінська О.В. Культура пиляків *in vitro* як метод одержання вихідного матеріалу в селекції ярого ячменю // Теоретичні основи селекції польових культур: Збірник наукових праць. – Харків, 2007. – С. 174–186.
- Білінська О.В. Особливості застосування культури пиляків *in vitro* для створення вихідного матеріалу в селекції ярого ячменю // Науковий вісник Національного аграрного університету. – 2006. – №100. – С. 13–19.
- Внучкова В.А. Получение гаплоидов из пыльников тритикале и их цитологическая характеристика // Доклады ВАСХНИЛ. – 1979. – №10. – С. 8–10.
- Внучкова В.А. Разработка и совершенствование методов создания нового исходного материала для селекции зерновых культур на основе гаплоидии // Тез. докл. Всесоюз. конференции по биотехнологии злаковых культур. – Алма-Ата, 1988. – С.5.
- Галиева Э.Р., Шакирова Ф.М., Круглова Н.Н. Феномен андроклинии и альбинизм у злаков // Успехи современной биологии. – 2002. – Т.122, №4. – С. 342–352.
- Глеба Ю.Ю., Сытник К.М. Клеточная инженерия растений. – Киев, Наукова думка, 1984. – С. 38–39.
- Гончарова С.А. Вивчення впливу заміників агар-агару на гідратацію тканин у рослин-регенерантів колекційних сортозразків огірка // Генетичні ресурси рослин. – 2004. – №1. – С. 47–50.
- Горбунова В.Ю. Индукция андрогенеза *in vitro* у ярой мягкой пшеницы. Баланс экзогенных и эндогенных фитогормонов // Изв. РАН. Сер. биол. – 2001. – №1. – С. 31–36.
- Горбунова В.Ю., Круглова Н.Н. Индукция андрогенеза *in vitro* у яровой мягкой пшеницы. Оптимальная фаза микроспорогенеза // Изв. РАН. Сер. биол. – 1997. – №6. – С. 668–676.
- Гребенюк І.В., Рябчун В.К. Вплив 2,4-Д на андрогенез в культурі пиляків *in vitro* ярого тритікале // Селекція та насінництво. – 2008. – Вип.96. – С. 267–274.
- Джори Б.М., Рао П.С. Экспериментальная эмбриология // Эмбриология растений в генетике, селекции, биотехнологии. – М.: Агропромиздат, 1990. – С. 343–411.
- Дмитриева Н.Н. Проблема регуляции морфогенеза и дифференциации в культуре клеток и тканей растений // В кн.: Культура клеток растений. – М., Наука, 1981. – С. 113–118.
- 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. – Т.37, №5. – С. 624–630.
- Дьячук П.А., Дьячук Т.Н. Получение гаплоидного растения мягкой яровой пшеницы саратовских сортов в культуре пыльников // Доклады ВАСХНИЛ. – 1986. – №10. – С. 3–4.
- Ермишина Н.М., Гордей И.А. Влияние генотипа на эффективность андрогенеза в культуре пыльников тритикале и секалотритикум // Весці нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. – 2001. – №2. – С. 61–65.
- Зеленин А.В. Геном растений // Вестник Российской Академии наук. – 2003. – Т.8, №9. – С. 797–805.
- Иванова Э.А., Вафина Г.Х., Куксо П.А., Круглова Н.Н. Активность триптаз репродуктивных клеток в процессе морфогенеза пыльника пшеницы // Вісник Харків. націон. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія. – 2004. – Вип.2 (5). – С. 65–71.
- 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. – Т.1. – Київ: Логос, 2001. – С. 562–568.
- Ігнатова С.О., Файт В.І., Жосонар М.В., Шестопап О.Л. Прогнозування відгуку генотипів озимої м'якої пшениці в культурі пиляків на основі тестування етапів морфогенезу // Аграрний Вісник Причорномор'я. – 2007. – №18. – С. 14–17.
- Круглова Н.Н. Микроспора злаков как модельная система для изучения путей морфогенеза. Автореф. дисс. ... д-ра биол. наук. – Санкт-Петербург, 2002. – 48с.
- Круглова Н.Н. Морфогенез в культуре пыльников пшеницы: эмбриологический подход. – Уфа: Гилем, 2001. – С. 117–119.
- Круглова Н.Н. Морфогенез и молекулярно-биологический анализ растений // Труды междунар. конф. «Проблемы ботаники XXI века». – 2006. – Т.1. – С.124.

- Круглова Н.Н., Батыгина Т.Б. Методические рекомендации по использованию морфогенетического потенциала пыльника в биотехнологических исследованиях яровой мягкой пшеницы. – Уфа, 2002. – 22с.
- Кунах В.А. Геномная изменчивость соматических клеток растений. 1. Изменчивость в онтогенезе // Биополимеры и клетка. – 1994. – Т.10, №6. – С. 5–35.
- Кунах В.А. Еволюція геному рослин в культурі клітин *in vitro*: особливості, причини, механізми та наслідки // Генетика і селекція в Україні на межі тисячоліть. – Т.1. – Київ: Логос, 2001. – С. 53–64.
- Кунах В.А. Изменчивость растительного генома в процессе дедифференцировки и каллусообразования *in vitro* // Физиология растений. – 1999. – Т.46, №6. – С. 919–930.
- Кунах В.А. Механізми та деякі закономірності соматональної мінливості рослин // Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів. – 2003. – №1. – С. 101–105.
- Кунах В.А., Алхимова Е.Г., Войтюк Л.И. Изменчивость числа хромосом в каллусных тканях и регенерантах гороха // Цитология и генетика. – 1984. – Т.18, №1. – С. 20–25.
- Лукьянчук С.Ф., Шерер Н.В. Влияние генотипа донорных растений мягкой пшеницы на гаплопродукцию при культивировании пыльников // Методы биотехнологии в селекции с/х растений: Сборник научных трудов. – Одесса, СГИ, 1992. – С. 45–50.
- Лукьянюк С.Ф., Игнатова С.А. Факторы, определяющие морфогенез и выход гаплоидов в культуре пыльников тритикале // Теорет. и приклад. аспекты селекции и семеноводства пшеницы, ржи, ячменя и тритикале. – Одесса: ВСГИ, 1981. – С. 34–35.
- Манзюк В.Т., Наумова Л.Н. Создание исходного материала в селекции ячменя // Сельскохозяйственная биология. – 1987. – №7. – С. 3–8.
- Матвиенко С.Н., Хотылева Л.В., Каминская Л.Н. Генетический анализ культуры пыльников тритикале *in vitro* // Генетика. – 1994. – Т.30, №9. – С. 1238–1242.
- Махновская М.Л. Технология получения удвоенных гаплоидов и источников высокой андрогенной способности у пшеницы // Цитология и генетика. – Киев, 1999. – Т.33, №2. – С. 45–49.
- Милованович М.С., Кубович М. Проявление генов скрещиваемости в гексаплоидном тритикале // Сиб. вест. с/х науки. – 1995. – № 1–2. – С. 33–36.
- Паламарчук А.И., Махновская М.Л., Игнатова С.А. Изучение возможности использования методов биотехнологии в селекции озимой твердой пшеницы // Доклады Рос. Академии с/х наук. – 1995. – №4. – С. 7–9.
- Рябчун В.К., Шатохин В.И., Лісничий В.А., Капустіна Т.Б. Яре тритикале для стабільного виробництва зерна. – Харків, 2007. – С. 4-16.
- Сидоров В.А. Биотехнология растений. – К.: Наук. думка, 1990. – 280с.
- Сорокин А.П. Генетические особенности андрогенеза и эмбриокультуры *in vitro* в процессе создания аллодигаплоидов тритикале и пшеницы. Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. – Минск, 1991. – 20с.
- Сулима Ю.Г., Игнатова С.А. Получение гаплоидов тритикале методом культуры пыльников *in vitro* // Гаплоидия и селекция. – М., Наука, 1992. – С. 99–110.
- Турашева С.К., Манабаева М.А., Жамбакин К.Ж. Морфогенез в культуре гаплоидных клеток и тканей пшеницы // 4-й съезд физиологов растений России. Международная конф. «Физиология растений – наука 3-го тысячелетия». – Т.2. – М., 1999. – С. 715–716.
- Тырнов В.С. Гаплоидия у растений. – Москва: Наука, 1998. – С. 5–39.
- Фурсова Г.К., Фурсов Д.И., Сергеев В.В. Рослинництво. Лабораторно-практичні заняття. – Ч.І. Зернові культури. – Харків: ТО «Ексклюзив», 2004. – С. 105–112.
- Agache S.I. Studies on the genetic relationship between anther culture and somatic tissue culture ability in wheat // Plant Breed. – 1988. – Vol.100. – P. 23–33.
- Bajaj Y.P.S. In vitro production of haploids and their use in cell genetics and plant breeding // Biotechnology in agriculture and forestry (Ed. Y.P.S.Bajaj). – Berlin: Springer-Verlag, 1990. – P. 40–43.
- Batygina T.B., Vasilyeva V.E. Periodization of development of reproductive structures. Critical periods // Acta Biol. Cracov. Ser. Bot. – 2003. – №45. – P. 27–36.
- Bernard S. In vitro androgenesis in hexaploid triticale: determination of physical conditions increasing embryoid and green plant production // Z. Pflanzenzuchtg. – 1980. – Vol.85. – P. 308–321.
- Bullock W.P., Baenziger P.S., Shaeffer G. W., Bottino P.I. Anther culture of wheat F₁ 1S and their reciprocal crosses // TAG. – 1992. – Vol.68. – P. 155–159.
- Charmet G., Bernard S. Diallel analysis of androgenetic plant production in hexaploid Triticale x Triticosecale Wittmack // Theor. Appl. Genet. – 1984. – Vol.69. – P. 55–61.
- Chen Y., Dribnenki P. Effect of genotype and medium composition on flax *Linum usitatissimum* L. anther culture // Ibid. – 2002. – Vol.21. – P. 204–207.
- Choo T.M. Doubled haploids for estimating additive epistatic genetic variances in self-pollinating crops // Can. J. Genet. Cytol. – 1982. – Vol.22. – P. 125–127.

- Chu C.C. The N6 medium and its application to anther culture of cereal crops // Proc. Symp. Plant Tissue Culture. – Peking: Science press, 1978. – P. 43–50.
- Chu C.C., Hill R.D. An improved anther culture method for obtaining higher frequency of pollen embryoids in *Triticum aestivum* L. // Plant Sci. – 1988. – Vol.55. – P. 175–181.
- Chu C.C., Wang C.C., Sun C.S. et al. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources // Sci. Sin. – 1975. – Vol.18. – P. 659–668.
- Chuang C.C., Ouyang J., Chia H. et al. A set of potato media for wheat anther culture // Proc. China-Australia Plant Tissue Culture Symp. – Peking, 1978. – P. 51–66.
- Clapham D. Haploid *Hordeum* plants from anthers in vitro // Z. Plantz. Tg. – 1973. – Vol.69. – P. 142–155.
- Dogramaci-Altuntepe M., Peterson T.S., Jauhar P.P. Anther culture-derived regenerants of durum wheat and their cytological characterization // Journal of Heredity. – 2001. – Vol.92, №1. – P. 56–64.
- Dunwell J.M., Francis R.J., Powell W. Anther culture of *Hordeum vulgare* L.: a genetic study of microspore callus production and differentiation // Theor. Appl. Genet. – 1987. – Vol.74, №1. – P. 60–64.
- Eapen S., Rao P.S. Plant regeneration from immature inflorescence callus of wheat, rye and Triticale // Euphytica. – 1985. – Vol.34. – P. 153–159.
- Fadel F., Wenzel G. Medium-genotype-interaction on androgenetic haploid production in wheat // Plant Breeding. – 1990. – Vol.105, №3. – P. 278–282.
- Foroughi-Wehr F. Rapid production of recombinant barley yellow mosaic virus resistant *H. vulgare* lines by anther culture // TAG. – 1984. – Vol.67. – P. 377–387.
- Gamborg O.L., Eveleigh D.E. Culture methods and detection of gluconases in suspension in culture of wheat and barley // Can. J. Bot. – 1968. – Vol.46, №5. – P. 417–421.
- Guha S., Maheshwari S.C. In vitro production of embryos from anthers of *Datura* // Nature. – 1964. – Vol.204. – P.497.
- Haberlandt G. Kulturversuche mit isolierten Pflanzenzellen // Sitzungsber. Akad. Wiss. – Wien, Mathnaturw, 1902. – Bd III. – P. 69–92.
- 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. – 1990. – Vol.105. – P. 332–336.
- He Ding-Doang, Quang Jun-Wen Callus and plantlet formation from cultured wheat anthers at different developmental stages // Plant. Sci. Letters. – 1984. – Vol.33. – P. 71–79.
- Heberle-Bors E. Isolation pollen culture in tobacco: Plant reproductive development in nutshell // Sex. Plant Reprod. – 1989. – №2. – P. 1–10.
- Huang B. Effects of incubation temperature on microspore callus production and plant regeneration on wheat anther cultures // Plant Cell, Tissue and Organ culture. – 1987. – Vol.9. – P. 45–48.
- Jochansen C.V., Eruckson S.P. The regulation of somatic embryo development in plant cell cultures // Biotechnology. – 1990. – Vol.4. – P. 1087–1090.
- Kaeppler S.M., Kaeppler H.F. Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants // Plant Mol. Biol. – 2000. – Vol.43. – P. 179–188.
- Kao K.N. Plant formation from barley anther culture with Ficoll media // Z. Pflanzenphysiol. – 1991. – Vol.103, №5. – P. 437–443.
- Karsai I., Bdo Z., Hayes P.M. Effect of induction medium pH and maltose concentration on in vitro androgenesis of hexaploid winter triticale and wheat // Plant Cell Tiss. and Org. Cult. – 1994. – Vol.39. – P. 49–53.
- Kohlenbach H.W., Wernike W. Investigation on the inhibitory effect of agar and the function of active carbon in anther culture // Ibid. – 1978. – Vol.86, №5. – P. 463–472.
- Lazar M.D. Immature embryo and anther culture of chromosome addition lines of rye in Ch. Spring wheat // Plant Sci. – 1987. – Vol.51. – P. 77–81.
- Li W.Z., Hu H. The effects of genotypes and mannitol pretreatment of high frequency androgenesis in barley // Chinese. Sci. Bull. – 1993. – Vol.38. – P. 151–155.
- Li W., Zhou M., Zharg X. Studies and improvement of wheat breeding for scab resistance using biotechnology // Proceeding of International Symposium on Wheat Improvement for Scab Resistance. – 2000. – P. 151–156.
- Martinez Garcia C., Martin Sanchez J.A., Sin Casas E. Plant regeneration from anther culture in six hexaploid triticale varieties and their F₁ hybrids // In: Livre des Resume de Posters. Book of Poster Abstracts. XIIIth EUCARPIA Congress. – Angers-France, 1992. – P. 189–190.
- Murashige T., Skoog F. A revised medium for growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. – 1962. – Vol.15, №13. – P. 473–497.
- Ono H., Larter H.N. Anther culture of Triticale // Crop. Sci. – 1976. – Vol.16, №1. – P. 120–122.
- Ouyang T.W. Induction of pollen plants from anther of *Triticum aestivum* cultured in vitro // Sci. Sin. – 1973. – Vol.16, №1. – P. 79–95.

- Ouyang T.W., Hu H., Chuang C.C., Tseng C.C. Induction of pollen plants from anther of *Triticum aestivum* cultured *in vitro* // *Sci. Sin.* – 1973. – Vol.16, №1. – P. 79–95.
- Pasternak T.P., Prinsen E. The role of auxin, pH and stress in the activation of embryogenetic cell division in leaf protoplast-derived cells of alfalfa // *Ibid.* – 2002. – Vol.129. – P. 1807–1819.
- Ramsay M.M. Conservation of Orchids // *Kew Scientist.* – 2000. – P.4.
- Roitsch T. Regulation of source/sink relations by cytokinins // *Plant Growth Regul.* – 2000. – Vol.32. – P. 359–367.
- Schumann G. *In vitro* production of haploids in Triticale // *Biotechnology in agriculture and forestry.* Vol.13. Wheat (Ed. Y.P.S.Bajaj). – Berlin: Springer-Verlag, 1990. – P. 382–402.
- Slusarkiewicz-Jarzina A., Ponitka A. Effect of genotype and media composition on embryoid induction and plant regeneration from anther culture in triticales // *J. Appl. Genet.* – 1997. – Vol.38 (3). – P. 253–258.
- Sonnino A. Plant regeneration from anther culture in hexaploid triticales varieties and their F₁ hybrids // In: *Lirve des Resume de Posters. Book of Poster Abstracts. XIIIth EUCARPIA Congress.* – Angers-France, 1992. – P. 189–190.
- Sunderland N. Strategies in the improvement of yields in anther culture // *Proc. Symp. on Plant Tiss. Cult.* – Peking: Scien. Press, 1978. – P. 65–86.
- Verma D. Cytokinesis and building of the cell plate in plants // *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* – 2001. – Vol.52. – P. 751–784.
- Wang Y.Y., Sun C.S., Wang C.C., Chien N.F. The induction of pollen plantlets of triticales and *Capsicum annum* from anther culture // *Sci. Sin.* – 1973. – Vol.16. – P. 147–151.
- Zhou H. Genetics of green plant regeneration from anther culture in cereals // *In vitro haploid production in higher plants.* – 1996. – Vol.2. – P. 169–187.

Условия культивирования пыльников *in vitro* тритикале И.В.Гребенюк

Обобщены данные о применении метода культуры пыльников *in vitro* у зерновых и условиях культивирования пыльников *in vitro*. Описаны основные факторы, влияющие на частоту индукции андрогенных структур в культуре пыльников тритикале.

Ключевые слова: *культура пыльников in vitro, андрогенная структура, тритикале.*

Conditions for triticales anthers *in vitro* cultivation I.V.Grebenyuk

The data on the application of anther culture *in vitro* method for cereal crops and conditions of triticales anthers *in vitro* cultivation are summarized. Major factors having an influence on the frequency of induction of androgenic structures in anther *in vitro* culture are shown.

Key words: *anther culture in vitro, androgenic structure, triticales.*

Представлено: В.К.Пузіком
Рекомендовано до друку: В.В.Жмурком