

ЗАМБРІБОРЩ І.С.<sup>✉</sup>, ШЕСТОПАЛ О.Л., БОЙКО М.С.

Селекційно-генетичний інститут – Національний центр насіннєзнавства та сортовивчення, Україна, 65036, м. Одеса, Овідіопольська дорога, 3, e-mail: izambriborsh@gmail.com

<sup>✉</sup> izambriborsh@gmail.com, (067) 922-48-02

### ГЕНОТИПОВІ ОСОБЛИВОСТІ МОРФОГЕНЕТИЧНИХ РЕАКЦІЙ СОРТІВ І ГІБРИДІВ F<sub>1</sub> ПШЕНИЦІ ОЗИМОЇ М'ЯКОЇ ЗА ПРОХОДЖЕННЯ РІЗНИХ ЕТАПІВ АНДРОГЕНЕЗУ *IN VITRO*

**Мета.** Тестування гаплопродукційної здатності 47 сортів та 143 гібридів F<sub>1</sub> озимої м'якої пшениці. **Методи.** Культура *in vitro* ізольованих пиляків пшениці. Відсоток новоутворень і регенерації зелених рослин для кожного генотипу розраховували від кількості висаджених пиляків. **Результати.** Виявлені відмінності щодо частоти індукції калусогенезу й здатності до регенерації рослин у процесі андрогенезу *in vitro* пшениці м'якої озимої. Діапазон варіювання показників гаплопродукції був широким і становив за показником «формування новоутворень» у сортів від 0 до 21,2 %, а у гібридів від 0 до 38,8 %; за показником «регенерації зелених рослин» – у сортів від 0 до 9,4 %, у гібридів від 0 до 9,1 %. Показано позитивний вплив 1BL/1RS транслокації на показники гаплопродукції в культурі ізольованих пиляків *Triticum aestivum* L. **Висновки.** Виявлені генотипоспецифічні морфогенетичні реакції мікроспор пшениці м'якої озимої в процесі андрогенезу *in vitro*. Встановлено, що гібриди F<sub>1</sub> мають більший гаплопродукційний потенціал у культурі пиляків, ніж сорти. За період з 2011 р. до 2017 р. у селекційні відділи передано 580 ліній озимої м'якої пшениці.

**Ключові слова:** пшениця м'яка озима, культура пиляків *in vitro*, калус, регенерація.

Використання гаплоїдних технологій велими доцільне в селекційних програмах м'якої пшениці, спрямованих на прискорення адаптації в місцевому генофонді нових генів, які контролюють цінні ознаки від віддалених гібридів і особливо гібридів, що містять екзотичну геноплазму. У цих випадках завдяки швидкій гомозиготизації матеріалу, який одержують за допомогою гаплоїдії на ранніх етапах селекційного процесу, останній скорочується вдвічі. Аналізуючи результати наших досліджень і дані літератури [1–3], ми дійшли до висновку, що рівень ефективності такої біотехнології визначається

генетичною конституцією донорного матеріалу, і тому вдосконалення етапів процесу гаплопродукції, напевно, буде постійним завданням біотехнологів за введення в селекційну роботу нових генотипів пшениці або за зміни напрямку селекції цієї цінної зернової культури. У зв'язку з цим співробітниками лабораторії біотехнології СГІ-НЦНС протягом останніх п'ятнадцяти років проводяться тривалі методичні розробки щодо подальшої інтенсифікації морфогенетичних процесів у культурі пиляків різних генотипів м'якої пшениці з метою збільшення виходу подвоєних гаплоїдів.

#### Матеріали і методи

Дослідження проводилися в лабораторії культури тканин СГІ-НЦНС. Матеріал досліджень: 190 генотипів (сорти та гібриди F<sub>1</sub>) пшениці м'якої (*Triticum aestivum* L.) вітчизняної та зарубіжної селекції. Як метод для отримання подвоєних гаплоїдів пшениці використовували культуру *in vitro* ізольованих пиляків пшениці [4, 5]. Для цього пиляки пшениці в стадії сильновакуолізованої мікроспори після тридобової холодової обробки (2–4°C) у розчині АБК (0,5 мг/л) висаджували на поживне середовище 190-2 у модифікації [6], після чого культивували три доби в темряві за +30°C, а потім культивували в термостаті за +24°C до формування на пиляках новоутворень. Такі макроструктури культивували в темряві до появи на них центрів меристематизації на регенераційному живильному середовищі MS у модифікації: 30 г/л сахарози, 0,5 мг/л кінетину, по 200 мг/л проліну та глутаміну. Сформовані регенеранти культивували за +24°C та фотоперіоду 16 год за інтенсивності освітлення 3–3,5 тис. люкс на безгормональному середовищі MS із половинною концентрацією макро- та мікросолей. Регенеранти подвоєних гаплоїдів пшениці яровизували та дорощували в умовах штучного клімату. Відсоток новоутворень і регенерації зелених рослин для

© ЗАМБРІБОРЩ І.С., ШЕСТОПАЛ О.Л., БОЙКО М.С.

кожного генотипу розраховували від кількості висаджених пиляків.

Оцінку отриманих даних проводили методами статистичних досліджень [7].

### Результати та обговорення

Інтерес дослідників привертає пошук шляхів збільшення ефективності методу культури пиляків *in vitro*. В лабораторії культури тканин СГІ з метою збільшення ефективності виходу дигаплоїдів м'якої пшениці був розроблений комплекс умов, яких включає добір донорного матеріалу для роботи в умовах *in vitro*, температурну й гормональну попередню обробку пагонів із колоссям, модифікацію живильних середовищ для культивування пиляків, новоутворень і регенерантів [4–14].

У нашій роботі проаналізовані результати досліджень, отримані співробітниками лабораторії культури тканин СГІ за сім останніх років (2011–2017 рр.) під час тестування гаплопродукційної здатності сортів, ліній та гібридів F<sub>1</sub> озимої м'якої пшениці. В результаті проведених досліджень у пиляках різних генотипів пшениці, що культивували на різних етапах морфогенезу, виявлені генотипоспецифічні морфогенетичні реакції мікроспор із відмінностями щодо частоти індукції процесів калусогенезу, ембріодогенезу й формування ембріонально-клітинних комплексів, які надалі проявляли різну здатність до регенерації рослин. Так, серед досліджених 190 генотипів озимої м'якої пшениці діапазон варіювання показників гаплопродукції був доволі широким і становив за показником «формування новоутворень» у сортів від 0 до 21,2

відсотка від висаджених пиляків, а у гібридів від 0 до 38,8 %, проте за показником «регенерації зелених рослин» розмах отриманих даних майже не різнився – у сортів від 0 до 9,4 %, у гібридів від 0 до 9,1 %.

Усі досліджені генотипи було розподілено на 5 груп залежно від ступеня їх чутливості до андрогенезу *in vitro*: I – нечутливі генотипи (0); II – низькочутливі, у яких відсоток формування новоутворень та регенерації зелених рослин був у межах від 0 до 1 %, середньочутливі (2 групи); III група – генотипи зі значеннями показників гаплопродукції від 1 до 3 %; IV група (від 3 до 5 %) і високочутливі; V група – відсоток формування новоутворень та регенерації зелених рослин більший від 5 % (рис. 1, 2).

Дані на рисунках представлені як доля (у відсотках) генотипів, що за показниками гаплопродукції відносяться до тієї чи іншої групи, відносно загальної кількості досліджених генотипів (для сортів – n=47, для гібридів F<sub>1</sub> – n=143).

Аналізуючи отримані дані, встановлено, що гібриди мають більший гаплопродукційний потенціал, ніж сорти. Загальна більш висока чутливість гібридних генотипів до першого етапу андрогенезу *in vitro* (рис. 1) досягається за рахунок меншої (порівняно з сортами) частки гібридів F<sub>1</sub>, що є нечутливими або слабкочутливими до наданих умов *in vitro* за більш високої частки високочутливих генотипів. При цьому доля генотипів зі значеннями показників гаплопродукції від 1 до 3 % як серед сортів, так і серед гібридів не розрізняється.

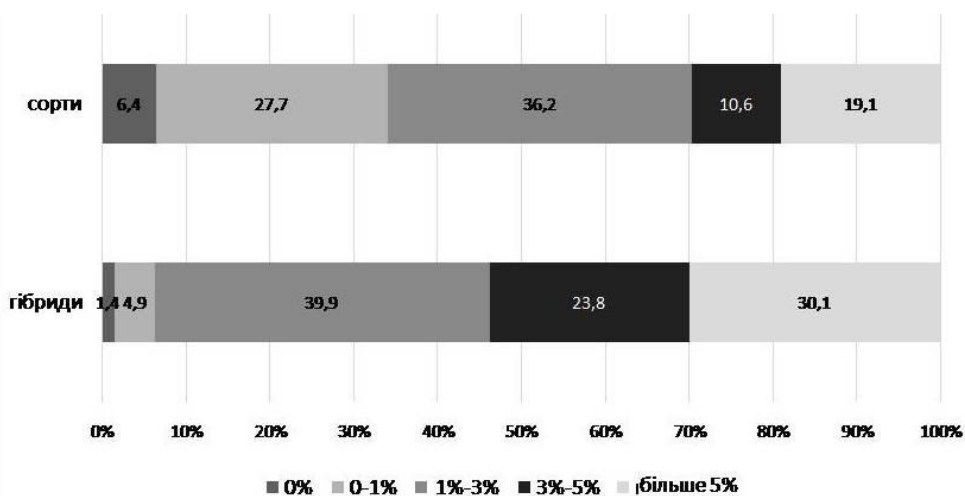


Рис. 1. Розподіл генотипів пшениці м'якої озимої за показником «формування новоутворень» у культурі пиляків *in vitro*.

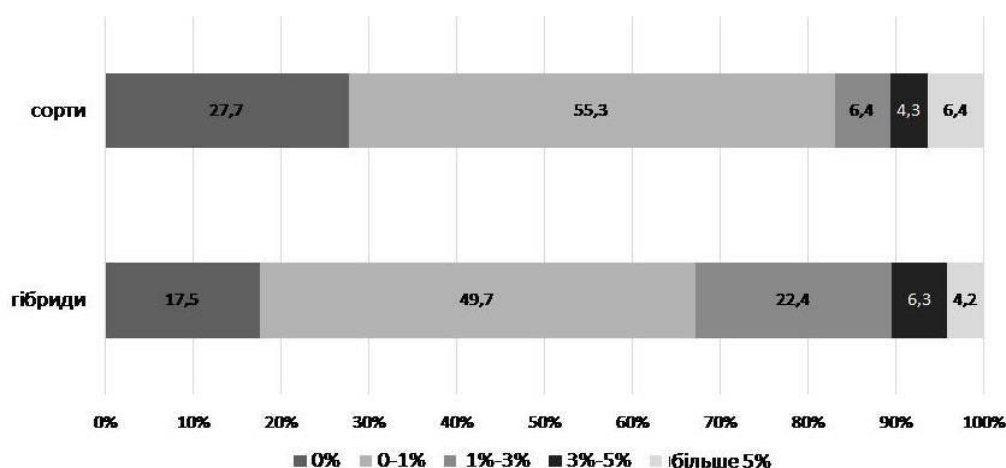


Рис. 2. Розподіл генотипів пшениці м'якої озимої за показником «регенерація зелених рослин» у культурі пиляків *in vitro*.

Щодо показника «регенерація зелених рослин», тут теж спостерігається подібна до показника «формування новоутворень» тенденція, однак доля високочутливих (IV та V групи) та низькочутливих (перша група) генотипів серед обох досліджених груп однакова. А більш висока регенераційна здатність гібридів, ніж сортів, досягається за рахунок меншої долі невідгучних генотипів та більш високої долі генотипів із значеннями показника «регенерація зелених рослин» від 1 до 3 відсотків від висаджених пиляків.

Максимальними показниками гаплопродукції в культурі ізольованих пиляків вирізнявся гібрид першого покоління між сортом Кавказ (має в геномі пшенично-житню транслокацію 1BL/1RS) та лінією пшениці, що несе модифіковану (без ділянки ДНК, що кодує білки секаліни) пшенично-житню транслокацію 1BL/1RS – 38,8 % (для новоутворень) та 9,1 % (для зелених регенерантів). Позитивний вплив цієї транслокації на показники гаплопродукції в культурі ізольованих пиляків відзначали й інші автори [15, 16]. Серед сортів високими показниками регенерації характеризувалися Куяльник (9,4 %), Лютестенс 155 (2,89 %) та Щедрість одеська (3,36 %). Ці три сорти можуть слугувати генетичними джерелами для підвищення гаплопродукційної здатності у цінних селекційних форм із низьким рівнем такої ознаки або за її відсутності [11, 12].

Аналіз та узагальнення результатів багаторічних досліджень щодо пошуку підвищення ефективності гаплопродукції генотипів у системі *in vitro* дозволив виявити такі методичні ню-

анси, які рекомендовані нами для використання в практичній роботі з селекційним матеріалом:

- відбирати для роботи зразки пшениці з найбільш коротким періодом «сходи – вакуолізована мікроспора», починаючи добір зразка з 1-го пагона, що вийшов з вузла кушіння донорної рослини, коли мікроспори в пиляках переважно перебувають у середньо-пізній фазі розвитку [9, 13];

- використовувати для роботи *in vitro* пиляки із середньої частини колосу донорної рослини [4, 5];

- використовувати в культурі пиляків як донорний матеріал зразки пшениці з низькою фотоперіодичною чутливістю, з коротким періодом тривалості яровизації, оскільки вони характеризуються підвищеним рівнем формування новоутворень та регенерацією зелених рослин [4, 8, 10];

- оптимізувати параметри та умови проходження індукційного етапу гаплопродукції в ізольованих пиляках, що дозволяє збільшити ефективність цієї системи за рахунок підвищення рівня регенерації новоутворень в 1,5–2 рази й більше, залежно від генотипу-донора пшениці [5, 6, 14].

## Висновки

Виявлені генотипоспецифічні морфогенетичні реакції мікроспор пшениці м'якої озимої у процесі андрогенезу *in vitro*. Встановлено, що гібриди F<sub>1</sub> мають більший гаплопродукційний потенціал в культурі пиляків *in vitro*, ніж сорти озимої м'якої пшениці.

Проведена оптимізація параметрів про-

дження усіх етапів гаплопродукції дозволила досягти збільшення ефективності цієї системи отримання дигаплоїдів шляхом андрогенезу *in vitro*, що дозволяє широко використовувати да-

такуну систему в селекції озимої м'якої пшениці. За період з 2011 р. до 2017 р. у селекційно-генетичного інституту передано 580 ліній м'якої озимої пшениці.

### Література

1. Дьячук Т.И., Столярова С.В., Хомякова О.В., Колдырева А.В., Итальянская Ю.В., Сафронова Н.Ф., Медведева Л.П. Роль метода гаплоидии в создании исходного материала для селекции зерновых культур в НИИСХ Юго-Востока. *Геном растений*. Одеса, 2008. С. 178–181.
2. Mihaly R., Lantos C., Kertesz Z., Mesterhazy A., Pauk J. Using of doubled haploids in wheat breeding. *Haploid in Higher Plants*: III. Intern. Conf (Vienna, February 12–15, 2006). P. 34.
3. Литвиненко М.А. Биотехнологические методы у селекции сельско-хозяйственных культур. *Вісник аграрної науки*. 2010. № 6. С. 11–14.
4. Игнатова С.А. Биотехнологические основы получения гаплоидов, отдаленных гибридов и соматических регенерантов зерновых и бобовых культур в различных системах *in vitro*: автореф. дис. ... д-ра биол. наук. Ялта, 2004. 45 с.
5. Ігнатова С.О., Жосонар М.В., Лобанова К.І., Шестопап О.Л. Отримання подвоєних гаплоїдів м'якої пшениці в культурі пиляків: Методичні рекомендації. Одеса, 2008. 12 с.
6. Лобанова К.І. Регенерація рослин в культурі пиляків м'якої пшениці, шляхи її підвищення: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Одеса, 2009. 19 с.
7. Атраментова Л.О., Утевська О.М. Статистичні методи в біології. Х.: ХНУ імені В.Н. Каразіна, 2007. 288 с.
8. Жосонар М.В., Ігнатова С.А., Файт В.И., Фёдорова В.Р. Регенерационная способность различных по продолжительности яровизации и фотопериодической чувствительности сортов озимой пшеницы в культуре пыльников *in vitro*. *Вісник Харківського національного аграрного університету*. Харків, Серія: біологія. 2004. Вип. 2 (5). С. 79–83.
9. Лобанова Е.И., Игнатова С.А., Шестопап О.Л., Нарган Т.П. Регенерация в культуре пыльников озимой мягкой пшеницы у генотипов с разной продолжительностью периода "всходы-колошение". *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2008. Т. 5. С. 291–297.
10. Ігнатова С.О., Жосонар М.В., Лобанова К.І. Особливості виявлення рівня чутливості до андрогенезу різних генотипів м'якої пшениці в культурі пиляків. *Фізіологія та біохімія культурних рослин*. 2010. Т. 42, № 2 (244). С. 107–117.
11. Шестопап О.Л., Замбріборщ І.С., Топал М.М., Литвиненко М.А., Ігнатова С.О. Вивчення гаплопродукційної здатності м'якої пшениці з пшенично-житніми транслокаціями. *Фактори експериментальної еволюції організмів*: зб. наук. пр. К.: Логос, 2013. Т. 12. С. 326–330.
12. Шестопап О.Л., Замбріборщ І.С., Топал М.М. Гаплопродукційна спроможність пшениці м'якої озимої за наявності в генотипі пшенично-житних транслокацій. *Вісник Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна*. Серія: біологія. Вип. 23. 2014. С. 51–56.
13. Ігнатова С.О., Лобанова К.І., Шестопап О.Л. Спосіб прогнозування рівня регенерації рослин в культурі пиляків озимої м'якої пшениці: Пат. на корисну модель 36253 Україна. № u 200803034; заявл. 11.03.08, опубл. 27.10.2008, Бюл. № 20.
14. Ігнатова С.О., Лобанова К.І., Шестопап О.Л. Спосіб підвищення регенераційного потенціалу в культурі пиляків озимої м'якої пшениці: Пат. на корисну модель 21988 Україна. № u 200611658; заявл. 6.11.06, опубл. 10.04.07, Бюл. № 4.
15. Henry Y., Bernard S., Bernard M., Gay G., Marcotte J.-L., Buysier J.De. Nuclear gametophytic genes from chromosome arm 1RS improve regeneration of wheat microspore-derived embryos. *Genome*. 1993. 36(5). P. 808–814.
16. Henry Y., de Buysier J. Effect of the 1B/1R translocation on anther culture ability in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Cell Reports*. 1985. Vol. 4 (6). P. 307–310.

### References

1. Diyachuk T.Y., Stolyarova S.V., Khomyakova O.V., Koldyeva A.V., Ytaliyanskaya Gu.V., Safronova N.F., Medvedeva L.P. The role of the haploidy method in creating the initial material for the selection of cereals in the NIISH of the South-East. *Genom of plants*. Odessa, 2008. P. 178–181.
2. Mihaly R., Lantos C., Kertesz Z., Mesterhazy A., Pauk J. Using of doubled haploids in wheat breeding. *Haploid in Higher Plants*: III. Intern. Conf (Vienna, February 12–15, 2006). P. 34.
3. Litvynenko M.A. Biotechnological methods in selection of agricultural crops. *Bulletin of Agrarian Science*. 2010. № 6. P. 11–14.
4. Ignatova S.A. Biotechnological foundations for obtaining haploids, distant hybrids and somatic regenerants of cereals and legumes in various invitro systems: author's abstract. dis. ... Dr. Biol. sciences. Yalta, 2004. 45p.
5. Ignatova S.O., Zhosonar M.V., Lobanova K.I., Shestopal O.L. Getting haploidy doubling in wheat anther culture: *Methodical recommendations*. Odessa, 2008. 12 p.
6. Lobanova K.I. Regeneration plants in anther culture of wheat, ways to increase AI: author's abstract. dis. ... Candidate biol. sciences Odessa, 2009. 19 s.
7. Atramentova L.O., Utjevskaya O.M. Statistical methods in biology. Kh: KhNU named V.N. Karazina, 2007. 288 p.
8. Zhosonar M.V., Ignatova S.A., Vait V.I., Fedorova V.R. Regeneration capacity of different vernalization and photoperiodic sensitivity of winter wheat varieties in anther culture in vitro. *Bulletin of Kharkiv National Agrarian University*. Series: biology. Kharkiv, 2004. Vol. 2 (5). P. 79–83.
9. Lobanova E.I., Ignatova S.A., Shestopal O.L., Narhan T.P. Regeneration in anther culture of winter wheat genotypes from different lengths of time "shoots-earring". *Factor of Experimental Evolutionary Organisms*. 2008. Vol. 5, 5. P. 291–297.

10. Ignatova S.O., Zhosonar M.V., Lobanova K.I. Features identify the level of sensitivity to androgenic different genotypes of soft wheat anther culture. *Physiology and biochemistry of cultivated plants*. 2010. Vol. 42, № 2 (244). P. 107–117.
11. Shestopal O.L., Zambriborshch I.S., Topal M.M., Lytvynenko M.A., Ignatova S.O. The study of the haploproduction ability of soft wheat with wheat-rye translocations. *Factors of experimental evolution organisms*. K.: Logos, 2013. Vol. 12. P. 326–330.
12. Shestopal O.L., Zambriborshch I.S., Topal M.M. Haploproduction capacity of soft winter wheat from the presence of wheat-rye translocations in the genotype. *Bulletin of Kharkiv National Agrarian University*. Series: biology. Kharkiv, 2014. Vol. 23. P. 51–56.
13. Ignatova S.O., Lobanova K.I., Shestopal O.L. Method of forecasting the level of plant regeneration in the culture of winter wheat pests: Pat. to utility model 36253 Ukraine. № u 200803034; stated. 11.03.08, published. 27.10.08, Bull. № 20.
14. Ignatova S.O., Lobanova K.I., Shestopal O.L. Method of increasing the capacity of regeneration in winter wheat anther culture: Pat. to the utility model 21988 Ukraine. № u 200611658; stated. 6.11.06, pub. 10.04.07, Bul. № 4.
15. Henry Y., Bernard S., Bernard M., Gay G., Marcotte J.-L., De Buyser J. Nuclear gametophytic genes from chromosome arm 1RS improve regeneration of wheat microspore-derived embryos. *Genome*. 1993. 36(5). P. 808–814.
16. Henry Y., de Buyser J. Effect of the 1B/1R translocation on anther culture ability in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Cell Reports*. 1985. Vol. 4 (6). P. 307–310.

**ZAMBTRIBORSHCH I.S., SHESTOPAL O.L., BOYKO M.S.**

*Plant Breeding & Genetics Institute – National Center of Seed and Cultivar Investigation, Ukraine, 65036, Odessa, Ovidiopol'skaya road 3, e-mail: izambriborsh@gmail.com*

**GENOTYPIC FEATURES OF MORPHOGENETIC REACTIONS OF VARIETIES AND HYBRIDS F<sub>1</sub> OF WINTER SOFT WHEAT DURING VARIOUS STAGES OF ANDROGENESIS *IN VITRO***

**Aim.** Testing the haploproduction ability of 47 varieties and 143 F<sub>1</sub> hybrids of winter bread wheat. **Methods.** In vitro culture of isolated anthers of wheat. The percentage of callus and regeneration of green plants for each genotype calculated as a percentage of the planted anthers. **Results.** The differences in the frequency of callus induction and the ability to regenerate plants in the process of androgenesis *in vitro* of winter soft wheat were detected. The range of variation haploproduction activity was broad. The sign of "the formation of callus" for varieties was limited from 0 to 21.2 % and for hybrids – from 0 to 38.8 %; on the sign of "regeneration of green plants" for varieties – from 0 to 9.4 %, and for hybrids from 0 to 9.1 %. The positive effect of 1BL/1RS translocation on signs of haploproduction in anther culture *Triticum aestivum* L. **Conclusions.** Genotype-specific of microspores morphogenetic reactions of soft winter wheat in the process of androgenesis *in vitro* were revealed. It has been found that F<sub>1</sub> hybrids have a higher potential production potential in anther culture than varieties. During the period from 2011 to 2017, the 580 lines of winter wheat were transferred to the breeding departments.

**Keywords:** soft winter wheat, anther culture *in vitro*, callus, regeneration.