

ЗАМБРІБОРЩ І. С.[✉], ШЕСТОПАЛ О. Л., НАРГАН Т. П., ЧЕКАЛОВА М. С.

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

[✉] izambriborsh@gmail.com, (067) 922-48-02

СТАБІЛІЗАЦІЯ СЕЛЕКЦІЙНОГО МАТЕРІАЛУ ПШЕНИЦІ М'ЯКОЇ, ЩО Є РЕЗУЛЬТАТОМ СХРЕЩУВАННЯ ІЗ ДИКИМИ РОДИЧАМИ

Мета. Тестування гаплопродукційної здатності 30 селекційних зразків озимої м'якої пшениці різного генетичного походження (складні гібриди), що вирізняються стійкістю до бурої та стеблової іржі. **Методи.** Культура *in vitro* ізольованих пиляків пшениці. Відсоток новоутворень та відсоток 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* селекційних зразків озимої м'якої пшениці різного генетичного походження. Встановлено, що в культурі пиляків *in vitro* мікроспори 17 з 30 гібридів сформували новоутворення. Інтенсивність останнього процесу була різною: більше половини генотипів (18 шт.) характеризувалася низьким відсотком новоутворень (від 0,10 до 1,0 %), 6 генотипів – середнім (від 1,0 до 3,0 %), і три – високим (4,36 %; 15,11 % і 15,81 % відповідно). **Висновки.** Виявлені генотипоспецифічні морфогенетичні реакції мікроспор пшениці м'якої озимої в процесі андрогенезу *in vitro*. Найвищий рівень формування новоутворень показали зразки П26 та П27. Одержано 10 зелених рослин-регенерантів.

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

Високий потенціал андрогенезу *in vitro* при створенні подвоєних гаплоїдів рослин пояснюється великою кількістю мікроспор, що містяться в одному пиляку. Потенційно з кожної з них може розвинути нова рослина [1]. Процес відбувається в штучних лабораторних умовах, де з незрілих чоловічих спор розвиваються гаплоїдні рослини або спонтанно подвоєні гаплоїди [2], які особливо бажані для генетичних, молекулярних та біохімічних досліджень, що стосуються селекції [3, 4]. Застосування ліній подвоєних гаплоїдів дозволяє селекціонерам вводити

нові генетичні варіації в рослинний матеріал за коротший час, ніж це потрібно для звичайних методів [3]. Незважаючи на численні дослідження андрогенезу пшениці, індукція та регенерація зелених рослин за цієї біотехнології все ще занижка. [5, 6]. Розробити ефективний метод регенерації рослин у культурі пиляків – складне завдання, оскільки існує безліч факторів, що впливають на ефективність андрогенної індукції [7]. Успіх одержання подвоєних гаплоїдів здебільшого залежить від генотипу рослин-донорів, тривалості впливу стресу, умов культивування, вмісту гормонів у живильному середовищі та взаємодії між всіма цими факторами [8–10]. Непередбачуваність результатів під час роботи з будь-яким генотипом і підштовхує дослідників на пошуки можливої активації морфогенетичної компетентності таких генотипів пшениці в умовах *in vitro*. Актуальним завданням дослідників є розробка і оптимізація біотехнологічної методики, яка дозволить максимально швидко і ефективно отримувати стабільні форми стійких рослин пшениці. Мета роботи – оцінити рівень гаплопродукційної здатності та отримати лінії подвоєних гаплоїдів у процесі андрогенезу *in vitro* селекційно-генетичного матеріалу пшениці м'якої, що є результатом схрещування пшениці із дикими родичами.

Матеріали і методи

Дослідницький матеріал: 30 селекційних зразків озимої м'якої пшениці різного генетичного походження (складні гібриди), що вирізняються стійкістю до бурої та стеблової іржі, надані відділом селекції та насінництва пшениці СГІ–НЦНС. Як метод для отримання подвоєних гаплоїдів пшениці використовували культуру *in vitro* ізольованих пиляків пшениці. Для цього пиляки пшениці в стадії сильновакулізованої мікроспори після тридобової попередньої холодової обробки (+ 2–4 °C) у водному розчині абсцизової кислоти (АБК) з концентра-

цією 0,5 мг/л висаджували на поживне середовище 190-2 у модифікації [11], після чого культивували три доби в темряві за температури + 30 °С, а потім культивували в термостаті за + 24 °С до формування на пиляках новоутворень. Сформовані макроструктури пересаджували на середовище MS у модифікації [11] і культивували у темряві 10–14 діб, після чого пересаджували на живильне середовище MS з додаванням 0,5 мг/л ГК та 25 мг/л яблуневої кислоти і культивували перші 3–5 діб у термостаті, надалі 2–3 тижні за освітлення до появи центрів регенерації за умов 16-годинного фотоперіоду, інтенсивності освітлення – 5 тис. люкс, температури + 24 °С до формування рослин, які пересаджували далі на безгормональному середовищі MS із половинною концентрацією макро- та мікросолей. Після етапу адаптації до умов ґрунту регенеранти подвоєних гаплоїдів пшениці яровизували та дорощували в умовах штучного клімату. Відсоток новоутворень і регенерації зелених рослин для кожного генотипу розраховували від кількості висаджених пиляків.

Оцінку отриманих даних проводили методами статистичних досліджень [12].

Результати та обговорення

Культура пиляків пшениці привертає увагу дослідників простотою виконання і дозволяє одержати протягом одного покоління генетично однорідний і стабільний селекційний матеріал, відкриває можливість отримання широкого спектра константних рекомбінантів із гібридів перших поколінь [13, 14]. Однак, незважаючи на успішні результати, важливою є проблема залежності ефективності гаплопродукції в культурі пиляків м'якої пшениці від генотипу, яка не дає змоги забезпечити передбачуваність результатів під час роботи з будь-яким генотипом і підштовхує дослідників на пошуки можливої активації морфогенетичної компетентності таких генотипів пшениці в умовах *in vitro*.

Одним із актуальних завдань біотехнології сьогодні є стабілізація генетично нестабільного селекційного матеріалу із конкретними маркерними ознаками, що є результатом схрещування пшениці із дикими родичами й наступним доббором і насичуючими схрещуваннями. У 2020 році досліджували 30 селекційних зразків різного генетичного походження (П1 – П31), у родоводі кожного з них був присутній спонтанний фертильний гібрид пшениці та егілопса [Амфіплоїд* × озима пшениця], який на-

сичували різними сортами та гібридами *Triticum aestivum* L. Амфіплоїд* – місцевий зразок егілопса, стійкий до листових хвороб, опушений. Донорний матеріал, що залучали в роботу, характеризувався наявністю або відсутністю опушення листа та стебла, воскового нальоту, антоціанового забарвлення вушок та остей. Ці ознаки є результатом селекційно-генетичної роботи з передачі в культурну пшеницю корисних ознак від диких родичів.

Дослідження такого матеріалу в культурі пиляків *in vitro* показало, що мікроспори 27 з 30 гібридів сформували новоутворення. Інтенсивність останнього процесу була різною: більше половини генотипів (18 шт.) характеризувалася низьким відсотком новоутворень від кількості висаджених пиляків (від 0,10 до 1,0 %), 6 генотипів – більш високим (від 1,0 до 3,0 %), і три генотипи (№№ П23, П26 та П27) мали високий рівень формування новоутворень (4,36 %; 15,11 % і 15,81 % відповідно) (табл.).

Регенераційна здатність одержаних новоутворень була невисокою і не перевищувала 1,2 % (№ П27). Зелені рослини-регенеранти шляхом андрогенезу *in vitro* отримані лише в культурі пиляків семи гібридів із сімнадцяти, які сформували новоутворення. Альбіно-регенеранти отримали в культурі пиляків трьох генотипів (табл.).

Особливістю проведеного дослідження була обмеженість кількості донорного матеріалу (1–3 колоси на номер), оскільки ми брали в культуру колосся з однієї рослини. Тому вважаємо, що отримані на цьому етапі результати є задовільними. Цікаво, що окремі рослини з однієї комбінації схрещування, що розчіплюється, мали однакові величини показників гаплопродукції. Так, генотип П18 (восковий наліт, антоціанове забарвлення вушок) та генотип П19 (без воскового нальоту) є рослинами з однієї комбінації {[Амфіплоїд* × озима пшениця Ужинок] × Ужинок] Гладь} й отримані результати щодо їхньої гаплопродукційної спроможності збігаються. Те ж саме можна сказати й про інші рослини однієї комбінації: № П26 (опушений, без воскового нальоту) та № П27 (воскового нальоту, фіолетове забарвлення остей) – нащадків однієї пізньостиглої рослини {[Амфіплоїд* × озима пшениця Ужинок] × Хуторянка} × Дачнянка} із 38 хромосомами. А номери П13 (опушений, ранній), П14 (опушений з антоціановими вушками, ранній) та П15 (опушений, антоціанові вушки) – нащадки гібриду {[Амфіплоїд* ×

озима пшениця) × Хуторянка] ×
(Од.267/Саратовская 29/Од. 267³seif⁴НІ (опуш.))
× Обряд. Усі ці рослини в межах однієї комбі-
нації, незважаючи на морфологічні розбіжності,

мають однакові показники гаплопродукції.
Схематично усі етапи біотехнології отримання
подвоєних гаплоїдів показано на рис.

Таблиця. Ефективність гаплопродукційного процесу в культурі пиляків пшениці озимої м'якої із чужорідним генетичним матеріалом

Генотип	Кількість висаджених пиляків	Новоутворення		Зелені регенеранти		Альбіно регенеранти	
		шт.	% ^	шт.	% ^	шт.	% ^
П1	842		0,00		0,00		0,00
П2	111	2	1,80±1,26		0,00		0,00
П3	241	4	1,66±0,82		0,00		0,00
П4	97	2	2,06±1,44		0,00		0,00
П5	495		0,00		0,00		0,00
П6	133		0,00		0,00		0,00
П7	153		0,00		0,00		0,00
П8	348	2	0,57±0,41		0,00	1	0,29±0,29
П9	618	4	0,65±0,32		0,00		0,00
П10	570		0,00		0,00		0,00
П11	319	1	0,31±0,31	1	0,31±0,31		0,00
П13	470		0,00		0,00		0,00
П14	427		0,00		0,00		0,00
П15	401		0,00		0,00		0,00
П16	490	13	2,65±0,73		0,00	3	0,61±0,35
П17	794	2	0,25±0,18	2	0,25±0,18		0,00
П18	224	3	1,34±0,77	1	0,45±0,45		0,00
П19	496	5	1,01±0,45	1	0,20±0,20		0,00
П21	605	1	0,17±0,17		0,00		0,00
П22	263	1	0,38±0,38		0,00		0,00
П23	298	13	4,36±1,18		0,00		0,00
П24	1039	1	0,10±0,10		0,00		0,00
П25	454		0,00		0,00		0,00
П26	139	21	15,11±3,04*	1	0,72±0,72		0,00
П27	253	40	15,81±2,29*	3	1,19±0,68		0,00
П28	498		0,00		0,00		0,00
П29	380	7	1,84±0,69	1	0,26±0,26		0,00
П30	192		0,00		0,00		0,00
П31	398		0,00		0,00		0,00

Примітки: ^ – відсоток від висаджених пиляків; * – різниця між генотипами достовірна за P < 0,01.



Рис. Отримання подвоєних гаплоїдів пшениці м'якої.

Висновки

У результаті дослідження проведено тестування в культурі пиляків *in vitro* 30 різних генотипів пшениці м'якої. Найвищими показниками гаплопродукції характеризувалися зразки П26 та П27: рівень формування новоутворень

15,11 % і 15,81 % відповідно. Одержано 10 зелених рослин-регенерантів. На сьогодні після етапів адаптації до умов ґрунту та яровизації дорощуються в кліматичній камері 2 рослини № П27 та 1 рослина П29.

References

1. Touraev A., Indrianto S., Wratschko I., Vincente O., Heberle-Bors E. Efficient microspore embryogenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.) induced by starvation at high temperature. *Sex. Plant Reprod.* 1996. 9. P. 209–215.
2. Testillano P.S. Microspore embryogenesis: targeting the determinant factors of stress-induced cell reprogramming for crop improvement. *J Exp Bot.* 2019. 70 (11). P. 2965–2978. doi: 10.1093/jxb/ery464. PMID: 30753698.
3. Lantos C., Pauk J. Anther culture as an effective tool in winter wheat (*Triticum aestivum* L.) breeding. *Genetika.* 2016. 52 (8). P. 910–918. doi: 10.7868/s0016675816080075. PMID: 29368884.
4. Osadchaya T.S., Pershina L.A., Trubacheeva N.V., Belan I.A., Rosseeva, L.P., Devyatkina E.P. Androgenetic ability in euplasmic lines of common wheat and alloplasmic recombinant lines (*H. vulgare*) – *T. aestivum* carrying 1RS.1BL and 7DL-7Ai translocations and development of double haploid lines. *Rus. J. Genet. Appl. Res.* 2015. 5. P. 174–181. [in Russian]
5. Litvynenko M.A. Biotechnological methods in selection of agricultural crops. *Bulletin of Agrarian Science.* 2010. № 6. P. 11–14. [in Ukrainian]
6. Dunwell J.M. Haploids in flowering plants: Origins and exploitation. *Plant Biotechnol. J.* 2010. 8. P. 377–424.
7. Lantos C., Bóna L., Boda K., Pauk J. Comparative analysis of *in vitro* anther- and isolated microspore culture in hexaploid Triticale (x *Triticosecale* Wittmack) for androgenic parameters. *Euphytica.* 2014. 197. P. 27–37. <https://doi.org/10.1007/s10681-013-1031-y>.
8. Weigt D., Kiel A., Siatkowski I., Zyprych-Walczak J., Tomkowiak A., Kwiatek M. Comparison of the Androgenic Response of Spring and Winter Wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plants (Basel).* 2019. 9 (1). P. 49. doi: 10.3390/plants9010049.
9. Zambrorshch I.S., Shestopal O.L., Boyko M.S., Dobrova H.O., Agafonova S.V. The efficiency of androgenesis *in vitro* in anther culture of soft wheat winter varieties and their different generations hybrids. *Faktori eksperimental'noi evoliucii organizmiv.* 2017. Vol. 20. P. 194–197. doi: 10.7124/FEEO.v20.762. [in Ukrainian]

10. Zambriborshch I.S., Shestopal O.L., Chekalova M.S., Golub E.A. The testing of haploproduction ability of soft winter wheat different hybrids in anther culture *in vitro*. *Faktori eksperimental'noi evolucii organizmiv*. 2020. Vol. 26. P. 207–211. doi: <https://doi.org/10.7124/feeo.v26.1267>. [in Ukrainian]
11. Ignatova S.O., Zhosonar M.V., Lobanova K.I., Shestopal O.L. Getting haploidy doubling in wheat anther culture : Methodical recommendations. Odesa, 2008. 12 p. [in Ukrainian]
12. 12, Atramentova L.O., Utjevskaya O.M. Statistical methods in biology. Kh: KhNU named V.N. Karazina, 2007. 288 p. [in Ukrainian]
13. Zambriborshch I.S., Shestopal O.L., Ignatova S.O. Creation of *in vitro* source breeding material for wheat and rice. *Agricultural biotechnology: theoretical developments and implementation in plant breeding*. Odessa: Astroprint. 2016. P. 139–148. [in Ukrainian]
14. Litvynenko M.A., Topal M.M., Shestopal O.L., Zambriborshch I.S., Galaev O.V. Udoskonalena tekhnolohiya selekciynogo procesu pshenyци myakoi ozymoi z vykoryctannjam biotekhnolohichnykh i moleculyarno-genetychnykh metodiv. *Naukovo-metodychnyi posibnyk*. Odesa: Astroprint. 2015. 41 p. [in Ukrainian]

ZAMBRIBORSHCH I.S., SHESTOPAL O.L., NARGAN T.P., CHEKALOVA M.S.

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

STABILIZATION OF SOFT WHEAT SELECTION MATERIAL WHICH IS THE RESULT OF CROSSING WITH WILD RELATIVES

Aim. Testing the haploproduction ability of 30 hybrids of winter soft 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 microspores of 17 of 30 hybrids formed callus by *in vitro* anther culture were shown. The intensity of one process was different: more than half of the genotypes (18 pcs.) were characterized by a low percentage of callus (from 0.10 to 1.0%), 6 genotypes - medium (from 1.0 to 3.0%), and three - high (4.36%; 15.11% and 15.81%, respectively). **Conclusions.** Genotype-specific of microspores morphogenetic reactions of soft winter wheat in the process of androgenesis *in vitro* were revealed Samples P26 and P27 showed the highest level of callus formation. The 10 green regenerating plants were obtained.

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