

ЗАМБРІБОРЩ І. С. ✉, ШЕСТОПАЛ О. Л., ЧЕКАЛОВА М. С., ГОЛУБ Є. А.

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

ТЕСТУВАННЯ ГАПЛОПРОДУКЦІЙНОЇ ЗДАТНОСТІ РІЗНИХ ГІБРИДІВ ПШЕНИЦІ М'ЯКОЇ В КУЛЬТУРІ ПИЛЯКІВ *IN VITRO*

**Мета.** Вивчити ефективність андрогенезу *in vitro* в культурі пиляків різних гібридів пшениці м'якої озимої. **Методи.** Отримання ліній подвійних гаплоїдів пшениці м'якої озимої в культурі пиляків *in vitro*. Статистичні методи. **Результати.** Протестовано здатність до андрогенезу в культурі *in vitro* пиляків 30 генотипів пшениці м'якої озимої. Виявлено відмінності у частоті індукції новоутворень і здатності до регенерації рослин у процесі андрогенезу *in vitro* пшениці м'якої озимої. Діапазон варіювання показників гаплопродукції (у відсотках від висаджених пиляків) був широким і становив за показником «формування новоутворень» від 0 до 13,0 %, а за показником «регенерації зелених рослин» – від 0 до 1,8 %. Було отримано 126 зелених рослин-регенерантів. **Висновки.** Виявлено генотипоспецифічні морфогенетичні реакції мікроспор пшениці м'якої озимої в процесі андрогенезу *in vitro*. Для створення ефективної технології отримання подвоєних гаплоїдів пшениці м'якої озимої у якості донорного матеріалу доцільно використовувати пиляки рослин із популяції гібридів F<sub>2</sub>.

**Ключові слова:** гібриди пшениці, культура пиляків *in vitro*, новоутворення, регенерація.

Сьогодні рівень розробок та технологічних прийомів отримання лінійного матеріалу пшениці (андрогенез *in vitro* чи метод гаплопродуктора) знаходиться на високому рівні, що дозволяє використовувати такий метод, як невід'ємну частину селекційного процесу цієї культури [1–3]. Біотехнологічні методи дають можливість отримати нові форми пшениці, стійкі до різних несприятливих факторів, у максимально короткі терміни і без залучення великих посівних площ [4]. Однак, незважаючи на успішні результати, багато проблемних питань все ще не вирішено. Дуже важливою є проблема залежності ефективності гаплопродукції в культурі пиляків м'якої пшениці від генотипу. Вона не дає змоги забезпечити передбачуваність ре-

зультатів під час роботи з будь-яким генотипом і підштовхує дослідників на пошуки можливої активації морфогенетичної компетентності цих генотипів пшениці в умовах *in vitro*. Мета дослідження – розробка та впровадження *in vitro* технологій для отримання вихідного лінійного матеріалу пшениці із певними господарсько-цінними ознаками шляхом гаплоїдії.

**Матеріали і методи**

У якості рослинного матеріалу застосовували пиляки гібридів першого покоління: Самурай/Мелодія, Мелодія/Самурай, (Самурай х Мелодія)/Мелодія, (Самурай х Мелодія)/Самурай, (Самурай х Мелодія)/Ера, (Мелодія х Самурай)/Мелодія, (Мелодія х Самурай)/Самурай, (Мелодія х Самурай)/Ера, Самурай/Наснага, Наснага/Самурай, (Самурай х Наснага)/ Наснага, (Самурай х Наснага)/Самурай, (Самурай х Наснага)/Кантата, (Наснага х Самурай)/Наснага, (Наснага х Самурай)/Самурай, (Наснага х Самурай)/Кантата, Колонія/Нива, Нива/Колонія, (Колонія х Нива)/Нива, (Колонія х Нива)/Колонія, (Колонія х Нива)/Кантата, (Нива х Колонія)/Нива, (Нива х Колонія)/Колонія, (Нива х Колонія)/Кантата та гібридів другого покоління: Самурай/Мелодія, Мелодія/Самурай, Самурай/Наснага, Наснага/Самурай, Колонія/Нива, Нива/Колонія.

Рослини вирощували на польових ділянках СГІ–НЦНС. Пагони з пиляками зрізали з донорних рослин, коли мікроспори знаходилися на вакуолізованій фазі розвитку (від ранньої до пізньої вакуолізації). Попередню обробку зрізаних пагонів проводили у водному розчині АБК (0,5 мг/л) протягом 3–5 діб за +2 – +4 °С у темряві. Колосся поверхнево стерилізували насиченим розчином гіпохлориту кальцію за прийнятною методикою. Ізольовані пиляки висаджували на індукційне живильне середовище 190-2 [5] у модифікації [6]. Висаджені пиляки культивували перші 3 доби у темряві за температури +30 °С, далі – при +24 °С до появи новоутво-

рень. Сформовані макроструктури пересаджували на середовище MS у модифікації [6] 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 та культивували перші 3–5 діб у термостаті, надалі (2–3 тижні) за освітлення до появи центрів регенерації за умов 16-годинного фотоперіоду, інтенсивності освітлення – 8 тис. люкс, температури + 24 °С до формування рослин. Зелені рослини пересаджували на безгормональне живильне середовище MS та яровизували у високих широких пробірках (Ø20мм x 200мм) та скляних банках (200 мл) за температури +2–4 °С, 16-годинного фотоперіоду, інтенсивності освітлення 1500–2000 люкс. Отримані рослини-регенеранти зростають в умовах штучного клімату.

### Результати та обговорення

Проблема отримання необхідної кількості дигаплоїдних рослин від будь-якого генотипу є сьогодні дуже актуальною. Залежність ефективності гаплопродукції в культурі пиляків м'якої пшениці від генотипу не дає змоги забезпечити передбачуваність результатів під час роботи з будь-яким генотипом і підштовхує дослідників на пошуки можливої активації морфогенетичної компетентності в умовах *in vitro*. Тому на початку роботи з невідомим (з боку його чутливості до андрогенезу *in vitro*) генетичним матеріалом обов'язковим етапом є тестування його гаплопродукційної здатності в культурі пиляків *in vitro* [7–10]. Результати проведеного дослідження різних генотипів пшениці озимої м'якої наведені в табл.

Таблиця. Ефективність гаплопродукційного процесу в культурі пиляків *in vitro* різних генотипів пшениці озимої м'якої

Генотип	Висаджені пиляки, шт.	Новоутворення,		Зелені регенеранти	
		шт.	% від пиляків	шт.	% от новоутворень*
1	2	3	4	5	6
F <sub>1</sub> Самурай / Мелодія	842	90	10,69 ± 1,06	2	0,24 ± 0,17
F <sub>1</sub> Мелодія / Самурай	777	101	13,00 ± 1,21	14	1,80 ± 0,48
F <sub>1</sub> (Самурай x Мелодія) / Мелодія	1964	47	2,39 ± 0,34	4	0,20 ± 0,10
F <sub>1</sub> (Самурай x Мелодія) / Самурай	1890	49	2,59 ± 0,37	7	0,37 ± 0,14
F <sub>1</sub> (Самурай x Мелодія) / Ера	2886	182	6,31 ± 0,45	12	0,42 ± 0,12
F <sub>1</sub> (Мелодія x Самурай) / Мелодія	1761	49	2,78 ± 0,39	4	0,23 ± 0,11
F <sub>1</sub> (Мелодія x Самурай) / Самурай	1709	153	8,95 ± 0,69	7	0,41 ± 0,15
F <sub>1</sub> (Мелодія x Самурай) / Ера	1271	8	0,63 ± 0,22	2	0,16 ± 0,11
F <sub>1</sub> Самурай / Наснага	2544	132	5,19 ± 0,44	3	0,12 ± 0,07
F <sub>1</sub> Наснага / Самурай	787	9	1,14 ± 0,38		
F <sub>1</sub> (Самурай x Наснага) / Наснага	818	36	4,40 ± 0,72	1	0,12 ± 0,12
F <sub>1</sub> (Самурай x Наснага) / Самурай	500	7	1,40 ± 0,53		
F <sub>1</sub> (Самурай x Наснага) / Кантата	632	22	3,48 ± 0,73	3	0,47 ± 0,27
F <sub>1</sub> (Наснага x Самурай) / Наснага	1101	6	0,54 ± 0,22		
F <sub>1</sub> (Наснага x Самурай) / Самурай	1882	137	7,28 ± 0,60	2	0,11 ± 0,08
F <sub>1</sub> (Наснага x Самурай) / Кантата	1814	87	4,80 ± 0,50	3	0,17 ± 0,10

1	2	3	4	5	6
F <sub>1</sub> Колонія / Нива	1637	88	5,38 ± 0,56	2	0,12 ± 0,09
F <sub>1</sub> Нива / Колонія	732	17	2,32 ± 0,56	1	0,14 ± 0,14
F <sub>1</sub> (Колонія x Нива) / Нива	731	17	2,33 ± 0,56		
F <sub>1</sub> (Колонія x Нива) / Колонія	1398	111	7,94 ± 0,72	6	0,43 ± 0,17
F <sub>1</sub> (Колонія x Нива) / Кантата	1392	109	7,83 ± 0,72	4	0,29 ± 0,11
F <sub>1</sub> (Нива x Колонія) / Нива	1523	155	10,18 ± 0,77	16	1,05 ± 0,26
F <sub>1</sub> (Нива x Колонія) / Колонія	3313	54	1,63 ± 0,22	5	0,15 ± 0,07
F <sub>1</sub> (Нива x Колонія) / Кантата	1193	27	2,26 ± 0,43		
F <sub>2</sub> Самурай / Мелодія	2827	19	0,67 ± 0,15	1	0,04 ± 0,04
F <sub>2</sub> Мелодія / Самурай	2909	216	7,43 ± 0,49	6	0,21 ± 0,08
F <sub>2</sub> Самурай / Наснага	2725	36	1,32 ± 0,22	3	0,11 ± 0,06
F <sub>2</sub> Наснага / Самурай	2707	78	2,88 ± 0,32	11	0,41 ± 0,12
F <sub>2</sub> Колонія / Нива	2290	70	3,06 ± 0,36	2	0,09 ± 0,06
F <sub>2</sub> Нива / Колонія	2215	78	3,52 ± 0,39	5	0,23 ± 0,10
HCP <sub>0,05</sub>			1,96		0,51

Доведено, що за таких умов експерименту всі досліджені генотипи виявилися чутливими до першого етапу андрогенезу *in vitro* (формування новоутворень). Відсоток формування новоутворень від висаджених пиляків коливався від  $0,54 \pm 0,22$  (F<sub>1</sub> (Наснага x Самурай)/Наснага) до  $13,00 \pm 1,21$  (F<sub>1</sub> Мелодія/Самурай). Слід зазначити, що цей показник мав досить високі, як для генотипів озимої пшениці, величини. Так, лише три з усіх досліджених генотипів характеризувалися відсотком новоутворень, що був нижчим від одиниці. Якщо порівнювати із результатами наших досліджень 2018 року, то тоді, навпаки, лише у дев'яти (з 31) генотипів відсоток новоутворень від висаджених пиляків був вищим від одиниці. Однак зелені рослини-регенеранти отримали лише в культурі пиляків двадцяти чотирьох з тридцяти генотипів.

Майже кожного року за останнє десятиріччя нами проводиться дослідження щодо визначення гаплопродукційної здатності гібридів першого покоління та рослин популяції F<sub>2</sub> того

самого генотипу одночасно. В переважній більшості випадків у попередні роки дослідження ми отримували більші величини показників гаплопродукції саме у рослин популяції F<sub>2</sub> [10], проте у цьому році результати виявилися неоднозначними (рис.).

Так, за показником «формування новоутворень» чотири з шести гібридів F<sub>1</sub> мали достовірно більші значення, ніж рослини з популяції F<sub>2</sub> тієї ж комбінації схрещування. І лише для двох гібридних популяцій (Наснага/Самурай та Нива/Колонія) саме в культурі пиляків рослин F<sub>2</sub> формування новоутворень відбувалось інтенсивніше від такої ж у гібридів F<sub>1</sub>.

Щодо регенерації зелених рослин шляхом андрогенезу *in vitro*, то результати дослідження були ще більш показовими: отримано зелені рослини лише з новоутворень п'яти комбінацій гібридів F<sub>1</sub>, тоді як із новоутворень рослин гібридних популяцій F<sub>2</sub> зелені регенеранти одержані від кожної комбінації схрещування (рис.).

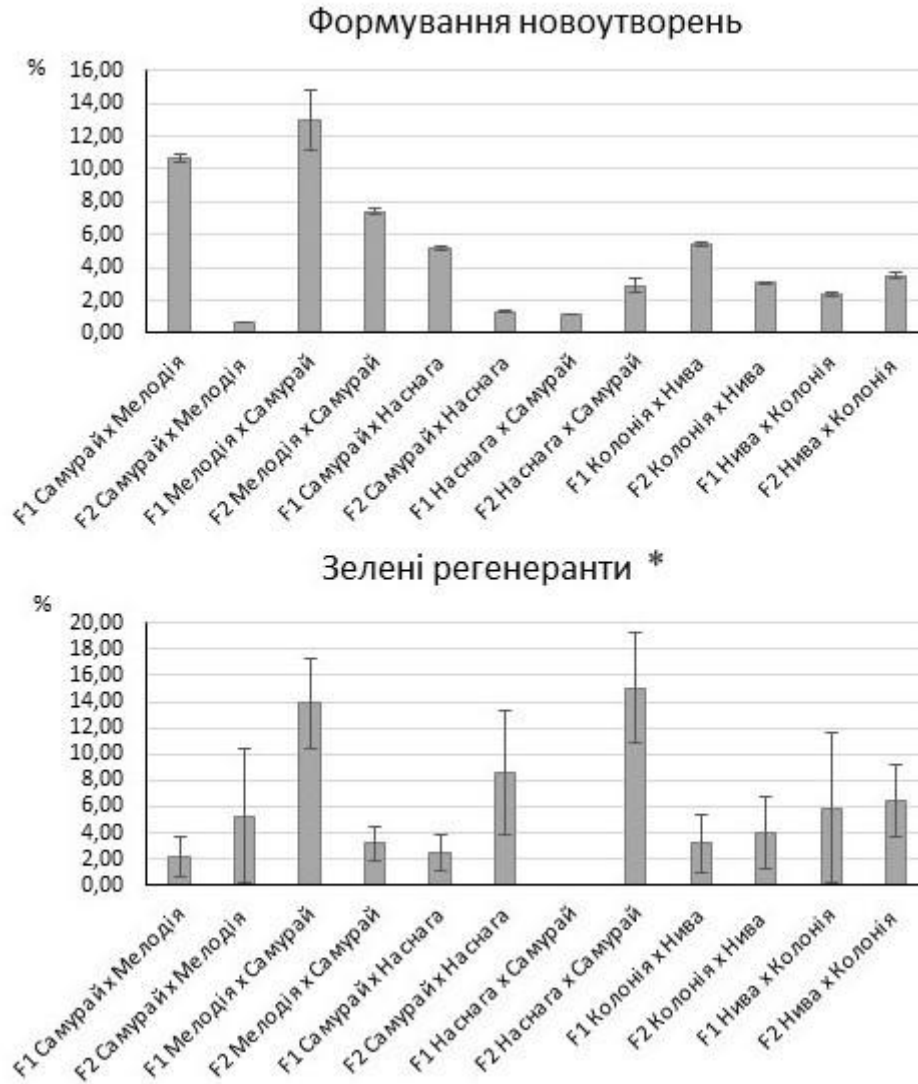


Рис. Показники гаплопродукції в культурі *in vitro* пиляків гібридів F<sub>1</sub> та рослин популяції F<sub>2</sub> пшениці м'якої озимої: \* – відсоток від отриманих новоутворень.

Отже, як з'ясовано нами за результатами дворічних досліджень, для створення ефективної біотехнології отримання подвоєних гаплоїдів із простих гібридних популяцій пшениці м'якої озимої в якості донорного матеріалу доцільно використовувати пиляки гібридів другого покоління, однак необхідна обов'язкова оцінка селекційної цінності отриманих регенерантів та проведення додаткових експериментів (більшої кількості комбінацій схрещувань) для остаточного висновку щодо цього питання.

Загалом було отримано 126 зелених рослини, які в цей час досліджуються селекціонерами.

### Висновки

У результаті дослідження процесу гаплопродукції в культурі ізольованих пиляків *in vitro* виявлено генотипоспецифічні морфогенетичні реакції мікроспор гібридів пшениці м'якої озимої. Шляхом андрогенезу *in vitro* із пиляків 30 різних генотипів одержано 126 зелених рослин-регенерантів. Для створення ефективної технології отримання подвоєних гаплоїдів пшениці м'якої озимої у якості донорного матеріалу доцільно використовувати пиляки рослин із популяції гібридів F<sub>2</sub>.

**References**

1. Litvynenko M.A. Biotechnological methods in selection of agricultural crops. *Bulletin of Agrarian Science*. 2010. № 6. P. 11–14. [in Ukrainian] / Літвиненко М.А. Біотехнологічні методи у селекції сільсько-господарських культур. *Вісник аграрної науки*. 2010. № 6. С. 11–14.
2. Rizkala Aida, Al-Ansary, Attia, Haiba, Nasseef. Response of some Egyptian and introduced wheath hybrids to androgenic process. *International Journal of Agricultural Research*. 2012. Vol. 7. P. 205–214. doi: 10.3923/ijar.2012.205.214.
3. Tadesse W., Tawkaz S., Inagaki M.N., Picard E., and Baum M. Methods and Applications of Doubled Haploid Technology in Wheat Breeding. *ICARDA, Aleppo, Syria*. 2013. P. 3–6.
4. Reshetnikov V., Spiridovich A., Fomenko T., Nosov A. Plant biotechnology as a way of biosynthetic potential rational use. *Science and Innovation*. 2014. № 5. P. 21–25. [in Russian] / Решетников В.Н. Спиридонович Е.В., Фоменко Т.И., Носов А.М. Растительная биотехнология – способ рационального использования биосинтетического потенциала. *Наука и инновации*. 2014. № 5. С. 21–25.
5. Wang X., Hu H. The effect of potato II medium for triticale anther culture. *Plant Sci. Lett.* 1984. Vol. 36. P. 237–239.
6. Litvynenko M.A., Topal M.M., Shestopal O.L., Zambriborshch I.S., Galaev O.V. Udoskonalena tekhnolohiya selekciynogo procesu pshenyци myakoi ozymoi z vykorystanniam biotekhnolohichnykh i moleculyarno-genetychnykh metodiv: naukovometodychnyi posibnyk. Odesa: Astroprint, 2015. 41 p. [in Ukrainian] / Литвиненко М. А., Топал М. М., Шестопал О. Л., Замбрїборщ І. С., Галаєв О. В. Удосконалена технологія селекційного процесу пшениці м'якої озимої з використанням біотехнологічних і молекулярно-генетичних методів: науково-методичний посібник. Оdesa: Астропринт, 2015. 41 с.
7. Ignatova S.O., Zhosonar M.V., Lobanova K.I., Shestopal O.L. Getting haploidiv doubling in wheat anther culture: methodical recommendations. Odesa, 2008. 12 p. [in Ukrainian] / Ігнатова С.О., Жосонар М.В., Лобанова К.І., Шестопал О.Л. Отримання подвоєних гаплоїдів м'якої пшениці в культурі пиляків: методичні рекомендації. Оdesa, 2008. 12 с.
8. Zambriborshch 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. *Factors of experimental evolution organisms: sb. sciences pr. K.*, 2017. Vol. 20. P. 194–197. [in Ukrainian] / Замбрїборщ І.С., Шестопал О.Л., Бойко М.С., Добрава Г.О., Агафонова С.В. Ефективність андрогенезу *in vitro* в культурі пиляків сортів та їхніх гібридів пшениці м'якої озимої різних генерацій. *Фактори експериментальної еволюції організмів: зб. наук. пр. К.*, 2017. Т. 20. С. 194–197.
9. Zambriborshch I.S., Shestopal O.L., Boyko M.S. Genotypic features of morphogenetic reactions of varieties and hybrids F<sub>1</sub> of winter soft wheat during various stages of androgenesis *in vitro*. *Factors of experimental evolution organisms: sb. sciences pr. K.*, 2018. Vol. 22. P. 252–256. [in Ukrainian] / Замбрїборщ І.С., Шестопал О.Л., Бойко М.С. Генотипові особливості морфогенетичних реакцій сортів і гібридів F<sub>1</sub> пшениці озимої м'якої проходження різних етапів андрогенезу *in vitro*. *Фактори експериментальної еволюції організмів: зб. наук. пр. К.*, 2018. Т. 22. С. 252–256.
10. Shestopal O.L., Zambriborshch I.S., Boyko M.S. Haploproduction ability of varieties and F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub> hybrids of soft winter wheat. *Actual scientific research in the modern world: sb. sciences pr.* 2017. Vol. 6 (26), part 2. P. 156–161. [in Ukrainian] / Шестопал О.Л., Замбрїборщ І.С., Бойко М.С. Гаплопродукційна здатність сортів й F<sub>1</sub> та F<sub>2</sub> гібридів пшениці м'якої озимої. *Актуальні наукові дослідження в сучасному світі: сб. научных трудов XXVI Междунар. научн. конф.*, 26–27 июня. Переяслав-Хмельницький, 2017. Вып. 6 (26), ч. 2. С. 156–161.

**ZAMBTRIBORSHCH I.S., SHESTOPAL O.L., CHEKALOVA M.S., GOLUB E.A.**

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

**THE TESTING OF HAPLOPRODUCTION ABILITY OF SOFT WINTER WHEAT DIFFERENT HYBRIDS IN ANTHER CULTURE *IN VITRO***

**Aim.** Study the the efficiency of androgenesis *in vitro* in anther culture of different genotyps winter wheat. **Methods.** Obtaining of soft winter wheat double haploid lines by anther culture *in vitro*. The statistical methods. **Results** The ability to androgenesis in an *in vitro* anthers culture of 30 soft winter wheat genotypes was tested. 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 activiti (from % of implanted anthers) was broad. The sign of "the formation of callus" was in limited from 0 to 13.2 % and on the sign of "regeneration of green plants" – from 0 to 1.8 %. The 126 green plants-regenerants were received. **Conclusions.** Genotype-specific of microspores morphogenetic reactions of soft winter wheat in the process of androgenesis *in vitro* were revealed. It is advisable to use the anthers from the F<sub>2</sub> hybrid population plant as a donor material to create an effective technology for producing double haploids of soft winter wheat was shown.

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