

ЗАМБРІБОРЩ І. С.✉, ШЕСТОПАЛ О. Л., ЧЕКАЛОВА М. С., АФІНОГЕНОВ О. А., ЛИТВИНЕНКО М. А., ВАСИЛЬЄВ О. А.

Селекційно-генетичний інститут – Національний центр насіннезнавства та сортовивчення, Україна, 65036, м. Одеса, Овідіопольська дорога, 3, ORCID: 0000-0003-2430-3690, 0000-0002-2987-9712, 0000-0001-7505-8459, 0009-0000-9392-0233

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

АНДРОГЕНЕЗ *IN VITRO* В КУЛЬТУРІ ПИЛЯКІВ ПШЕНИЦІ М'ЯКОЇ ОЗИМОЇ

Мета. Вивчення ефективності окремих етапів андрогенезу *in vitro* в культурі пиляків за створення гомозиготних дигаплоїдних ліній пшениці м'якої озимої **Методи.** Культура *in vitro* ізольованих пиляків пшениці. Для кожного генотипу визначали такі параметри андрогенезу *in vitro*: відсоток новоутворень та відсоток регенерації зелених рослин для від кількості висаджених пиляків; відсоток акліматизованих рослин від регенованих зелених паростків, а також відсоток фертильних (подвоєні гаплоїди) рослин від числа акліматизованих рослин. **Результати.** Вивчено андрогенез *in vitro* в культурі пиляків 105 генотипів пшениці м'якої озимої різного генетичного походження. Виявлені відмінності щодо частоти індукції калусогенезу (від 0,17 до 21,25 % від висаджених пиляків) й здатності до регенерації рослин (від 0 до 4,94 % від висаджених пиляків). Отримано насіння дигаплоїдних ліній в культурі пиляків майже 50 % досліджених генотипів. Спонтанна диплоїдизація в середньому складала 29,41 % від отриманих регенерантів. **Висновки.** Виявлені генотипоспецифічні морфогенетичні реакції мікроспор пшениці м'якої озимої в процесі андрогенезу *in vitro*. Одержано 122 дигаплоїдних ліній пшениці м'якої озимої.

Ключові слова: дигаплоїди, пшениця, андрогенез *in vitro*, калус, регенерація.

Стратегії сучасної біотехнології полягають в необхідності розроблення нових та удосконалення наявних технологій *in vitro* для створення нових генотипів, адаптованих до конкретних агрокліматичних умов згідно з вимогами сучасної селекції. Успіх селекційної роботи багато в чому визначається наявністю вихідного матеріалу, у розширенні спектра якого можуть бути використані біотехнологічні методи [1]. Останні мають велике значення для полегшення і прискорення селекційного проце-

су. Вони дають можливість отримати нові форми пшениці, стійкі до різних несприятливих факторів, у максимально короткі терміни й без залучення великих посівних площ [2–6]. Ефективність отримання дигаплоїдних ліній у культурі пиляків м'якої пшениці сильно залежить від генотипу, що не дає змогу забезпечити передбачуваність результатів при роботі з будь-яким генотипом. Все це підштовхує дослідників на пошуки можливої активації морфогенетичної компетентності в умовах *in vitro* [1, 6–9].

Мета дослідження – вивчити ефективність окремих етапів андрогенезу *in vitro* в культурі пиляків за створення гомозиготних дигаплоїдних ліній пшениці м'якої озимої.

Матеріали і методи

Дослідний матеріал наданий відділом селекції та насінництва пшениці, відділом селекції пшениці Селекційно-генетичного інституту Національного центру насіннезнавства та сортовивчення (СГІ-НЦНС) і відділом фітопатології СГІ-НЦНС. У роботу з отримання дигаплоїдних ліній пшениці озимої м'якої залучено 105 селекційних зразків (сорти, батьківські селекційні лінії, гібриди F₁ і популяції F₄, F₈). Цей матеріал отриманий за двома селекційними напрямками: 1) вирізняється комплексною стійкістю до бурої та стеблової іржі, отриманий на основі донорів, стійкість яких походить від дикорослих родичів пшениці (*Aegilops cylindrica*, *Ae. variabilis*, *Triticum erebuni*) [10, 11]; 2) є результатом селекційної програми отримання високобілкових генотипів від схрещувань пшениці зі стабільними формами, носіями гена GPC-B1 (далі GPC-B1):

2021 рік: 23 селекційних зразки різного походження, які вирізняються стійкістю до бурої та стеблової іржі; сорти Куяльник, Традиція, лінії 9300, 9525 та 3238 та 8 гібридів першого покоління між цими генотипами; сорти Відпо-

© ЗАМБРІБОРЩ І. С., ШЕСТОПАЛ О. Л., ЧЕКАЛОВА М. С., АФІНОГЕНОВ О. А., ЛИТВИНЕНКО М. А., ВАСИЛЬЄВ О. А.

віль, Наснага та чотири гібридні популяції F₂ BC₁: (Відповідь / Наснага) / Відповідь; (Відповідь / Наснага) / Наснага; (Наснага / Відповідь) / Наснага; (Наснага / Відповідь) / Відповідь.

2022 рік: 25 селекційних зразків (11 батьківських ліній та 14 гібридів першого покоління), які вирізняються стійкістю до бурої та стеблової іржі; тринадцять селекційних гібридів різного походження, що є результатом селекційної програми отримання високобілкових генотипів від схрещувань пшениці зі стабільними формами, носіями гена GPC-B1 (останні отримані в результаті віддалених схрещувань культурної пшениці з *Aegilops tauschii* (лінія 3238) та *Triticum dicoccoides* (лінії 9225, 9300) з наступним добором і насичуючими схрещуваннями).

2023 рік: селекційні лінії Ег. 126, Ег. 143, Ег. 70, Ег. 261, 1944, 9155, 9200, 9250, 9300, 3238, 1935, 1925, 1968, 1952, лінія, яка є носієм гена GPC-B1; гібриди F₁: Куяльник x GPC-B1, Оптима x GPC-B1, Кантата x GPC-B1, Ег. 261 x 1944-1, Ег. 261 x 1944-2; три популяції F₈ за №№ 800, 900, 1001, отримані від схрещування пшениці м'якої озимої Одеська 267 з оригінальними амфіплоїдами ЧЕ (2n = 42, AABBStSt), виділеними раніше з комбінації – *T. durum* Чорномор x *Elytricum fertile* (матеріал наданий провідним науковим співробітником відділу загальної та молекулярної генетики к. б. н. Моцним І. І.).

Рослини вирощували на польових ділянках СГІ-НЦНС. Пагони з пиляками зрізали з донорних рослин, коли мікроспори знаходились на вакуолізованій фазі розвитку (від ранньої до пізньої вакуолізації).

Як метод для отримання подвоєних гаплоїдів (DH) пшениці використовували культуру *in vitro* ізольованих пиляків пшениці. Для цього пиляки пшениці в стадії сильновакуолізованої мікроспори після тридобової попередньої холодової обробки (+2–4°C) у водному розчині абсцизової кислоти (АБК) з концентрацією 0,5 мг/л висаджували на поживне середовище 190-2 у модифікації [12], після чого культивували три доби в темряві за температури +30°C, а потім культивували в термостаті при +24°C до формування на пиляках новоутворень. Сформовані макроструктури пересаджували на середовище MS у модифікації [13] 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 при освітленні до появи центрів регенерації за умов 16-годинного фотоперіоду, інтенсивності освітлення – 5 тис. люкс, температури +24°C до формування рослин, які пересаджували далі на безгормональному середовищі MS із половинною концентрацією макро- та мікросолей. Відсоток новоутворень і регенерації зелених рослин для кожного генотипу розраховували від кількості висаджених пиляків. Після етапу адаптації до умов ґрунту, регенеранти подвоєних гаплоїдів пшениці яровизували та дорощували в умовах штучного клімату. Визначали відсоток рослин, що залишилися після етапів адаптації та яровизації, від загальної кількості зелених регенерантів. А також відсоток фертильних рослин від загальної кількості рослин, які викалошилися.

Оцінку отриманих даних проводили методами статистичних досліджень [14] з використанням пакета програм Excel.

Результати та обговорення

Стабілізація генетично нестабільного селекційного матеріалу із конкретними маркерними ознаками, що є результатом схрещування пшениці з інтрогресивними лініями (отриманими на основі схрещувань із дикими родичами й наступним добором і насичуючими схрещуваннями) є на сьогодні актуальним завданням біотехнології. У цій роботі представлені результати роботи лабораторії культури тканин за 2021–2023 роки [13, 15] щодо дослідження 105 генотипів озимої м'якої пшениці в культуру пиляків, більшість з яких мали невідому чутливість до андрогенезу *in vitro* (табл. 1).

Показано, що за цих умов експерименту, усі досліджені зразки виявились чутливими до першого етапу андрогенезу *in vitro* – формування калюсу (табл. 1, рис. 1 а). Відсоток сформованих калюсів від висаджених пиляків коливався від 0,17 ± 0,08 (F₁ 5/21 / 237/21) до 21,25 ± 1,29 (генотип № 1968). Отже, виявлено, що цей показник у культурі пиляків досліджених зразків у більшості мав середні величини. Так, 31 генотип мав значення відсотку калюсів від висаджених пиляків менше за 1 %; 48 генотипів – від 1 % до 3 %, 11 генотипів – від 3 % до 5 %; 10 генотипів – від 5 % до 10 %; 5 генотипів – вище 10 %.

Таблиця 1. Ефективність гаплопродукційного процесу в культурі пиляків *in vitro* різних генотипів пшениці озимої м'якої (2021–2023 рр.)

Показники андрогенезу <i>in vitro</i>		2021 рік	2022 рік	2023 рік	Всього	
Генотипи	досліджено	шт.	43	39	23	105
	отримано калюс	шт.	43	39	23	105
	отримані зелені рослини	шт.	32	33	18	83
	отримані лінії	шт. / %	21 / 48,84	18 / 46,15	дорошування	
Висаджено пиляків (ВП)		шт.	76645	92142	44821	213608
Калюс		шт.	1605	1123	1650	4378
		% від ВП	2,09 ± 0,05	1,22 ± 0,04*	1,92 ± 0,06	2,05 ± 0,03
Зелені регенеранти (ЗР)		шт.	207	208	199	614
		% від ВП	0,27 ± 0,02	0,23 ± 0,02	0,31 ± 0,03	0,29 ± 0,01
Адаптовані регенеранти (АР)		шт.	180	189	129	498
		% від ЗР	87,0 ± 2,3	90,9 ± 2,0	64,9 ± 3,4	81,1 ± 1,6
Фертильні рослини (ДН лінії)		шт.	70	52		122
		% від АР	38,89 ± 3,63	27,51 ± 3,25	дорошування	

Примітка. *відмінності, порівнюючи з контролем вірогідні при $P < 0,05$.

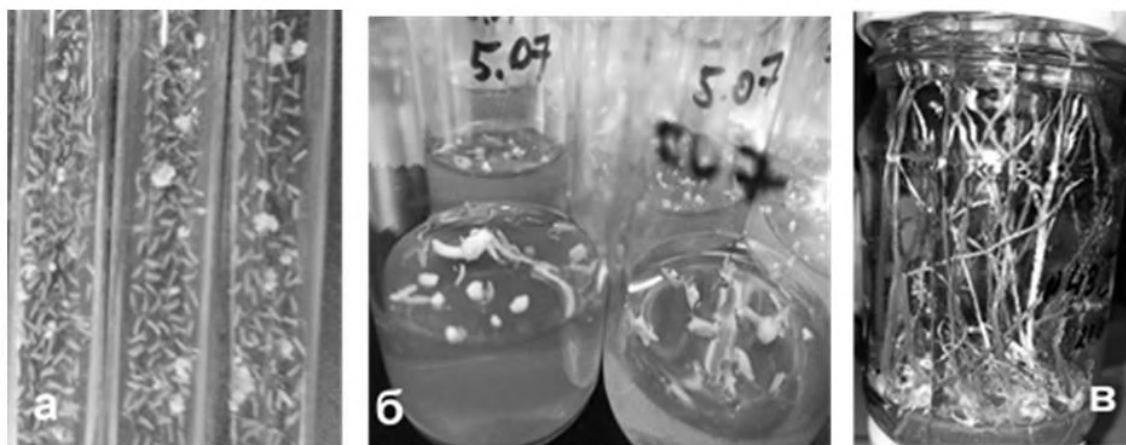


Рис. 1. Андрогенез у культурі пиляка озимої м'якої пшениці *in vitro*: а) утворення калюсу на поверхні пиляків, середовище 190-2; б) регенерація паростків після трансплантації новоутворень на середовище MS; в) зелені та альбіносний рослини-регенеранти.

На наступному етапі – регенерації рослин (рис. 1 б, в) – зелені рослини-регенеранти отримали в культурі пиляків лише для 83 зі 105 генотипів (табл. 1). Регенерація рослин – це складний процес, який залежить від багатьох факторів, основним із яких є генотип [16]. Здатність окремих генотипів до регенерації зелених проростків різна. Так, у наших дослідженнях відсоток зелених регенерантів від пиляків, які висадили, коливався від 0 до 4,94 %, в середньому – 0,39 %. Всього було отримано 614 зелені рослини.

Відсоток регенерації переважної більшості генотипів був менший за одиницю (25 генотипів), лише у восьми з них цей показник був у межах 1–3 %. Особливість процесу регенерації у досліджених генотипів – невелика кількість альбіносів серед рослин-регенерантів – майже 21,4 % від усіх отриманих регенерантів. Якщо оцінювати обидва етапи андрогенезу *in vitro* різних генотипів пшениці із комплексною стійкістю до іржі, то найбільш ефективним цей процес був у культурі пиляків двох батьківських ліній: КП 132/20 та КП 352/20.

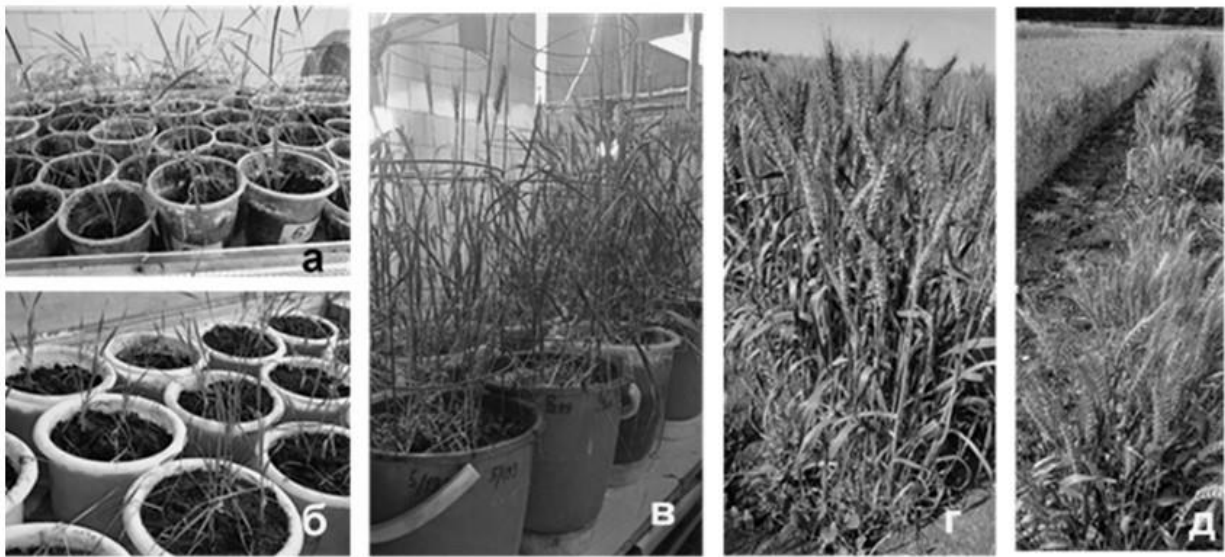


Рис. 2. Рослини-регенеранти на різних етапах вирощування та польових випробувань: а, б, в – вирощування в теплиці (штучний клімат); г, д – дигаплоїди на польових ділянках.

Один із найкритичніших етапів будь-якої біотехнології *in vitro* – адаптація рослин-регенерантів до умов *ex vitro*. Показано, що на етапі адаптації «живильне середовище – ґрунт» у середньому гине до 40 % отриманих у культурі регенерантів. У нашому дослідженні відсоток виживаності після етапів адаптації до умов *ex vitro* та 45 добової яровизації отриманих рослин був досить високим – у середньому $81,1 \pm 1,6$ % від усіх отриманих зелених регенерантів. У 2023 році отримано 199 зелених рослин-регенерантів. Після адаптації до ґрунту та яровизації в умовах штучного клімату дорошуються 129 рослин. Підрахунок фертильних рослин будемо визначати після закінчення вегетаційного періоду (друга половина березня).

У результаті дослідження на сьогодні отримали 122 дигаплоїдні лінії від 39 генотипів, що складає майже 50 відсотків від генотипів, які регенерували зелені рослини (табл. 1). Частота спонтанної диплоїдизації в середньому становила $38,89 \pm 3,63$ (2021 р.) та

$27,51 \pm 3,25$ (2022 р.), що відповідає аналогічним результатам у культурі пиляків пшениці у інших авторів: 32,72 % [7] та 28,40 % [8].

Висновки

У результаті дослідження показано, що успішність андрогенезу *in vitro* за отримання лінійного матеріалу пшениці м'якої озимої залежить від донорного матеріалу. Досліджені гібриди, які несуть в геномі чужорідний генетичний матеріал із геном *GPC-B1* від *Ae. tauschii* та *T. dicoccoides*, мають низький та середній гаплоредукційний потенціал. Проте різні генотипи пшениці із комплексною стійкістю до різних видів іржі та інших хвороб мають середні та високі показники андрогенезу *in vitro*. Методом культури пиляків *in vitro* отримано 122 гомозиготні дигаплоїдні лінії різних генотипів пшениці м'якої озимої. Частота спонтанної диплоїдизації склала в середньому 29,41 % від регенерантів, які виколосилися.

References

1. Lytvynenko M. A., Topal M. M., Shestopal O. L., Zambrivorshch I. S., Galaev O. V. Udoskonalena tekhnolohiya selekciynogo procesu pshenyci myakoi ozymoi z vykorystannyam biotekhnolohichnykh i moleculyarno-genetychnykh metodiv. *Naukovo-metodychnyi posibnyk*. Odesa : Astroprint, 2015. 41 s. [in Ukrainian]
2. Lytvynenko M. A. Biotechnological methods in selection of agricultural crops. *Bulletin of Agrarian Science*. 2010. № 6. P. 11–14. [in Ukrainian]
3. Weigt D., Kiel A., Siatkowski I., Zypych-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.
4. Zambrivorshch 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: 10.7124/feeo.v26.1267. [in Ukrainian]

5. Tadesse W., Tawkaz S., Inagaki M. N., Picard E., Baum M. Methods and Applications of Doubled Haploid Technology in Wheat Breeding. ICARDA, Aleppo, Syria. 2013. P. 3–6.
6. Broughto S., Castello M., Liu L., Killen J., Hepworth A., O'Leary R. The Effect of Caffeine and Trifluralin on Chromosome Doubling in Wheat Anther Culture. *Plants*. 2020. № 9 (1). P. 105.
7. 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.
8. Lantos C., Purgel S., Ács K., Langó B., Bóna L., Boda K., Békés F., Pauk J. Utilization of *in vitro* anther culture in spelt wheat breeding. *Plants (Basel)*. 2019. 8 (10). P. 436. doi: 10.3390/plants8100436.
9. Kanbar O. Z., Lantos C., Chege P. K., Kiss E., Pauk J. Generation of doubled haploid lines from winter wheat (*Triticum aestivum* L.) breeding material using *in vitro* anther culture. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*. 2020. Vol. 56 (4). P. 150–158. doi: 10.17221/113/2019-CJGPB.
10. Babayants O., Babayants L., Gorash A., Vasilev A., Traskovetskaya V., Galaev A. Physiologic specialization of *Puccinia triticina* check for this species in other resources Erikss. and effectiveness of Lr-genes in the south of Ukraine during 2013–2014. *Chilean Journal of Agricultural Research*. 2015. Vol. 75 (4). P. 443–450. doi: 10.4067/S0718-58392015000500009.
11. Babaiants O. V., Babaiants L. T., Sauliak N. I., Ternovoy K. P., Vasiliev A. A., Bushulian M. A., Traskovetskaia V. A. Unique source breeding material of wheat with group resistance to pathogens by pyramidation of effective *Lr*, *Sr*, *Yr*, *Pm*, *Bt*, *Ut* genes. Breeding of cereals and legumes in the context of climate change: directions and priorities. International Scientific Conference : abstracts (Odesa, May 5, 2021). Odesa: PBGI–NCSCI. P. 122. [in Ukrainian]
12. 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]
13. Zambriborshch I., Shestopal O., Traskovetskaya V., Vasiliev O., Halaiev O., Halaieva M., Afinogenov O., Chekalova M. Obtaining dihaploid lines of winter bread wheat with complex resistance. *Cereal Research Communications*. 2024. doi: 10.1007/s42976-023-00466-3.
14. Atramentova L. O., Utjevskaya O. M. Statistical methods in biology. Kharkiv : KhNU named V. N. Karazina, 2007. 288 p. [in Ukrainian]
15. Shestopal O. L., Zambriborshch I. S., Traskovetskaya V. A., Vasiliev O. A., Babayants L. T., Chekalova M. S., Afinogenov O. A. Obtaining dihaploid lines of soft winter wheat with complex resistance to rust and hard smut by anther culture *in vitro*. *Fakty eksperymental'noi evolucii organizmiv*. 2023. Vol. 32. P. 125–130. doi: 10.7124/FEEO.v32.1548. [in Ukrainian]
16. Upadhyay Richa Anther culture for haploid plant production. Editor(s) : Avinash Chandra Rai, Ajay Kumar, Arpan Modi, Major Singh. *Advances in Plant Tissue Culture. Academic Press*. 2022. Chapter 7. P. 157–174. doi: 10.1016/B978-0-323-90795-8.00004-7.

ZAMBRIBORSHCH I. S., SHESTOPAL O. L., CHEKALOVA M. S., AFINOGENOV O. A., LYTUVYENKO M. A., VASILIEV O. A.

Plant Breeding & Genetics Institute – National Center of Seed and Cultivar Investigation, Ukraine, 65036, Odessa, Ovidiopolskaya road, 3

ANDROGENESIS *IN VITRO* IN ANTHER CULTURE OF BREAD WINTER WHEAT

Aim. Study of the effectiveness of stages of *in vitro* androgenesis in anther culture for the creation of dihaploid lines of bread winter wheat. **Methods.** *In vitro* culture of isolated wheat anthers. For each genotype, the following parameters of androgenesis *in vitro* were determined: the percentage of caluses and the percentage of regeneration of green plants from the number of planted anthers; the percentage of acclimatized plants from regenerated green plantlets, as well as the percentage of fertile (doubled haploid) plants. **Results.** Androgenesis *in vitro* in the anther culture of 105 genotypes of soft winter wheat of different genetic origin was studied. Differences regarding the frequency of callusogenesis induction (from 0.17 to 21.25 percent of planted anthers) and the ability to regenerate plants (from 0 to 4.94 percent of planted anthers) were found. The dihaploid lines in anther culture for almost 50 % of the studied genotypes were obtained. Spontaneous diploidization averaged 29.41 % of the obtained regenerants. **Conclusions.** Genotype-specific morphogenetic reactions of bread winter wheat microspores in the process of *in vitro* androgenesis were revealed. 122 dihaploid lines of bread winter wheat were obtained.

Keywords: dihaploids, wheat, androgenesis *in vitro*, callus, regeneration.