

ЗАМБРИБОРШ І.С.✉, ШЕСТОПАЛ О.Л., БОЙКО М.С., ДОБРОВА Г.О., АГАФОНОВА С.В.

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

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

ЕФЕКТИВНІСТЬ АНДРОГЕНЕЗУ *IN VITRO* В КУЛЬТУРІ ПИЛЯКІВ СОРТІВ ТА ЇХНІХ ГІБРИДІВ ПШЕНИЦІ М'ЯКОЇ ОЗИМОЇ РІЗНИХ ГЕНЕРАЦІЙ

Сучасний селекційний процес у розвинутих країнах Світу базується на залученні новітніх біотехнологічних розробок молекулярної генетики, культури тканин *in vitro*, цитогенетики та ін. Біотехнологічні методи мають велике значення для полегшення і прискорення селекційного процесу. Вони дають можливість отримати нові форми пшениці, стійкі до різних несприятливих факторів, в максимально короткі терміни і без задіяння великих посівних площ [1–4]. 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, яка не дає змогу забезпечити передбачуваність результатів при роботі з будь-яким генотипом і підштовхує дослідників на пошуки можливої активації морфогенетичної компетентності цих 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 в процесі андрогенезу *in vitro* популяцій різних поколінь (F_1 , F_2) гібридів пшениці м'якої озимої однієї і тієї ж комбінації схрещування і визначити оптимальну генерацію пшениці для максимально ефективного застосування цієї біотехнології.

Матеріали і методи

Дослідницький матеріал наданий відділом селекції та насінництва пшениці Селекційно-генетичного інституту – Національного центру насіннізнавства та сортовивчення (СГІ–НЦНС). У роботу з тестування гаплопродукційної здатності пшениці озимої м'якої залучено:

- сорт селекції СГІ – Вікторія одеська, що відрізняється стійкістю до високих температур і чутливістю до жовтої іржі, та 4 сортрозкладки іноземної селекції – Lavantus, Alhambra, лінія 070028s24, лінія 114013,

які погано переносять заморозки, але стійкі до іржі;

- 4 прості гібриди першого покоління:
 F_1 Вікторія од. / Lavantus; F_1 Вікторія од. / 070028s24;
 F_1 Вікторія од. / 114013; F_1 Вікторія од. / Alhambra;
- 4 гібриди другого покоління (тих же комбінацій схрещувань):
 F_2 Вікторія од. / Lavantus; F_2 Вікторія од. / 070028s24;
 F_2 Вікторія од. / 114013; F_2 Вікторія од. / Alhambra.

Рослини вирощували на польових ділянках відділу селекції та насінництва пшениці СГІ–НЦНС. Пагони з пиляками зрізали з донорних рослин, коли мікроспори знаходились 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 при +2 – +4°C 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°C, далі – при +24°C до появи новоутворень. 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 гіберелової кислоти ($ГК_3$) та 25 мг/л яблуневої кислоти та культивували перші 3–5 діб у термостаті, надалі 2–3 тижня за освітлення до появи центрів регенерації за умов 16-годинного фотоперіоду, інтенсивності освітлення – 8 тис. люкс, температурі + 24°C до формування рослин. Зелені рослини пересаджували на безгормональне живильне середовище MS та яровизували у високих широких пробірках (Ш 20 мм x 200 мм) та скляних банках (200 мл) за

© ЗАМБРИБОРШ І.С., ШЕСТОПАЛ О.Л., БОЙКО М.С., ДОБРОВА Г.О., АГАФОНОВА С.В

температури +2–4°C, 16-годинному фотоперіоді, інтенсивності освітлення 500–1000 люкс.

Отриманні рослини-регенеранти зростають в умовах штучного клімату.

Результати та обговорення

Проблема отримання необхідної кількості дигаплоїдних рослин від будь якого генотипу є сьогодні найбільш актуальною. Залежність ефективності гаплопродукції в культурі пиляків м'якої пшениці від генотипу не дає змогу забез-

печити передбачуваність результатів при роботі 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, 8]. Результати цього 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*
Вікторія одеська	1376	41	2,98		
Lavantus	1160	12	1,03		
070028s24	1316	63	4,79	2	3,17
114013	1322	102	7,19	4	4,21
Alhambra	1508	22	0,99		
F ₁ Вікторія/Lavantus	794	45	1,76	1	7,14
F ₂ (Вікторія/Lavantus)	2179	61	1,51	4	12,12
F ₁ Вікторія/070028 s 24	943	17	0,64		
F ₂ (Вікторія/070028s24)	3236	62	1,92	2	3,23
F ₁ Вікторія/114013	735	29	2,45		
F ₂ (Вікторія/114013)	1526	127	8,33	7	5,51
F ₁ Вікторія/Alhambra	1654	55	1,39		
F ₂ (Вікторія/Alhambra)	2326	91	1,93	1	2,22
HCP _{0,05}			0,74		6,35

Показано, що за даних умов експерименту усі досліджені генотипи виявились чутливими до першого етапу андрогенезу *in vitro* (формування новоутворень). Відсоток формування новоутворень від висаджених пиляків коливався від $0,64 \pm 0,26$ до $8,33 \pm 0,71$. Слід зазначити, що цей показник у всіх 13 генотипів був вищим за одиницю. При цьому, три генотипи (070028s24, 114013, F₂ (Вікторія/114013)) характеризувалися високим відсотком новоутворень (від 4,79 до 8,33), а десять – мали середній рівень цього показника (від 1,03 до 2,98 відсотків). Однак, зелені рослини-регенеранти отримали лише в культурі пиляків сімнадцяти з двадцяти восьми генотипів.

Показано, що серед досліджених сортів високими показниками гаплопродукційної здатності (формування новоутворень та зелених рослин-регенерантів) характеризувались сорти іноземної селекції 070028s24 і 114013 (табл. 1).

Сорт Вікторія одеська відрізнявся досить високим рівнем показника «формування новоутворень» ($2,98 \pm 0,46$ відсотків від висаджених пиляків), проте жодної зеленої рослини з отриманих новоутворень не одержано. Найвищим показником «регенерація зелених рослин» серед досліджених генотипів характеризувався гібрид F₂ (Вікторія/Lavantus). Виявлений низький регенераційний потенціал мікроспор у пиляках батьківських сортів (Вікторія од., Lavantus, Alhambra) не міг не позачитися на такому в культурі пиляків їхніх гібридів. Так, з новоутворень трьох із чотирьох досліджених гібридів першого покоління зелених рослин-регенерантів не отримано. Це становить значну частку для такої кількості гібридів F₁, якщо аналізувати результати наших попередніх досліджень, де доля гібридів F₁ із нульовим відсотком регенерації зелених рослин не перевищувала 1–3 % [9, 10].

Вкрай цінними для подальшої роботи з отримання подвоєних гаплоїдів пшениці є отримані дані щодо чутливості до умов андрогенезу гібридів різних генерацій (F₁ та F₂) однієї комбінації схрещування, а саме для визначення оптимальної генерації, що є найбільш ефективною для добору донорного матеріалу в культуру

in vitro пиляків з колосся популяції гібридів пшениці озимої м'якої. Досліджували гаплопродукційну здатність першої та другої генерації гібридів чотирьох комбінацій схрещувань: Вікторія/Lavantus, Вікторія/070028s24, Вікторія/114013, Вікторія/Alhambra (рис.).

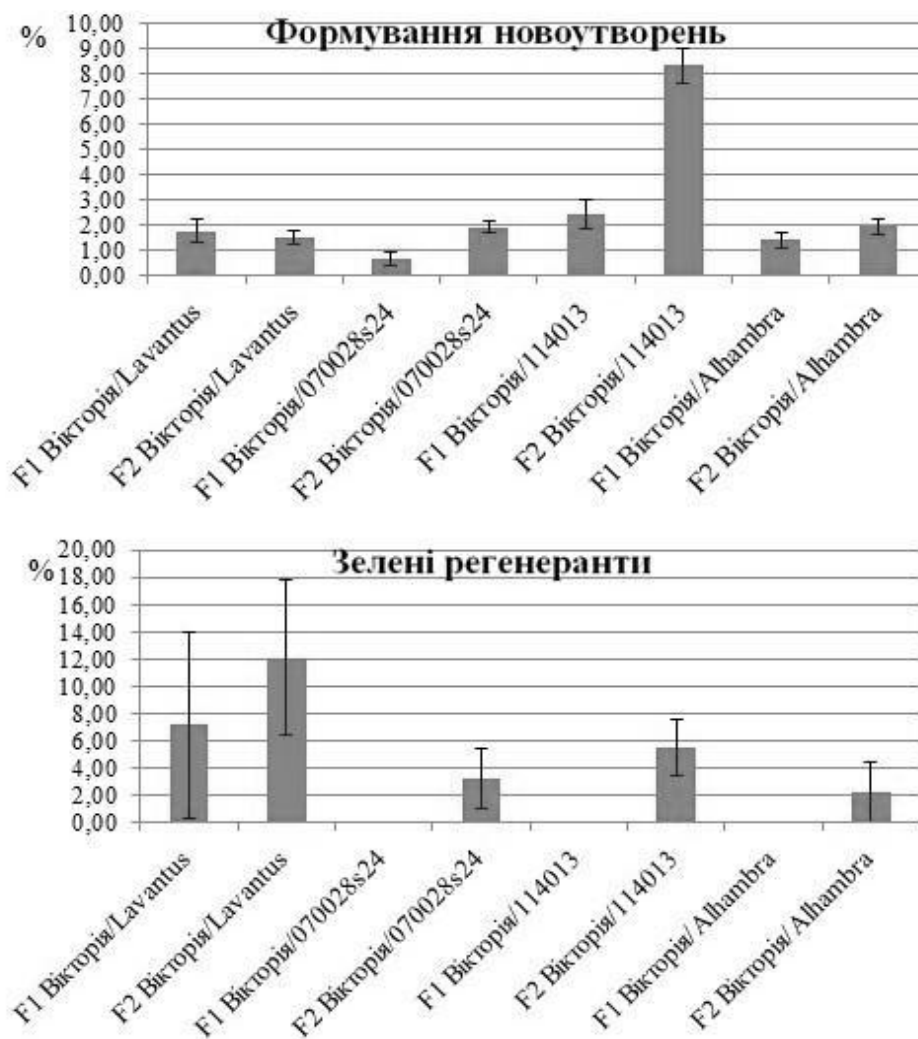


Рис. Показники гаплопродукції в культурі пиляків гібридів F₁ та F₂ різних генотипів пшениці м'якої озимої.

Виявлено відмінності між показниками гаплопродукційної здатності (як за показником «формування новоутворень», так і за показником «регенерація зелених рослин») між даними групами генотипів (табл., рис.). Генерації двох гібридів Вікторія/Lavantus і Вікторія/Alhambra не розрізнялись за показником «формування новоутворень», тоді як гібриди другого покоління двох інших комбінацій схрещувань – Вікторія/070028s24, Вікторія/114013 мали достові-

рно більший відсоток новоутворень за такої у гібридів F₁. Щодо регенерації зелених рослин шляхом андрогенезу *in vitro*, результати дослідження були ще більш показовими: зелені рослини отримано з новоутворень усіх чотирьох комбінацій гібридів F₂, і лише з однієї комбінації (Вікторія/Lavantus) гібридів F₁.

Отже, за результатами нашого дослідження, з точки зору біотехнолога, для створення ефективної технології отримання подвоєних

гаплоїдів з 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 від обох генерацій та проведення додаткових експериментів (більшої кількості комбінацій схрещувань) для остаточного висновку щодо цього питання.

Загалом було отримано лише 21 зелену рослину, які висаджені у ґрунт та проходять обов'язковий етап яровизації. Такий низький рівень регенерації ми отримали вперше за останні 5–6 років. Однією з причин цього, можливо, є той факт, що велика частка геному більшості зразків несе гени сортів іноземної селекції, а при схрещуванні цього матеріалу з сорта-

ми селекції СГІ, одержуємо таку комбінацію генів, яка негативно впливає на регенераційний потенціал в культурі пиляків *in vitro* при вирощуванні гібридів в екологічних умовах Півдня України.

Висновки

Протестовано здатність до андрогенезу в культурі *in vitro* пиляків 13 генотипів пшениці м'якої озимої; отримано 21 зелений регенерант, які після яровизації, висаджено у ґрунт для адаптації та дорощування в умовах *ex vitro*. Показано, що для створення ефективної технології отримання подвоєних гаплоїдів з простих гібридних популяцій пшениці м'якої озимої як донорний матеріал доцільно використовувати пиляки гібридів другого покоління.

Література

1. Літвиненко М.А. Біотехнологічні методи у селекції сільськогосподарських культур // Вісник аграрної науки. – 2010. – № 6. – С. 11–14.
2. Rizkala Aida, Al-Ansary, Attia, Haiba, Nasseef Response of some Egyptian and introduced wheat hybrids to androgenic process // International Journal of Agricultural Research. – 2012. – V. 7. – P. 205–214.
3. 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. – 36 p.
4. 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. – V. 36. – P. 237–239.
6. Лобанова К.І., Жосонар М.В., Ігнатова С.О. Шляхи реалізації регенераційного потенціалу в культурі пиляків у різних генотипів озимої м'якої пшениці // Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів. – 2006. – Т. 4, № 1. – С. 52–57.
7. Ігнатова С.О., Жосонар М.В., Лобанова К.І. та ін. Отримання подвоєних гаплоїдів м'якої пшениці в культурі пиляків: методичні рекомендації / Півден. біотехнолог. центр в рослин-ві УААН. – Одеса, 2008. – 12 с.
8. Литвиненко М.А., Топал М.М., Шестопап О.Л., Замбріборщ І.С., Галаєв О.В. Удосконалена технологія селекційного процесу пшениці м'якої озимої з використанням біотехнологічних і молекулярно-генетичних методів: науково-методичний посібник. – Одеса: Астропринт, 2015. – 41 с.
9. Шестопап О.Л., Замбріборщ І.С., Топал М.М., Літвиненко М.А., Ігнатова С.О. Вивчення гаплопродукційної здатності м'якої пшениці з пшенично-житніми транслокаціями // Фактори експериментальної еволюції організмів. – К.: Логос, 2013. – Т. 12. – С. 326–330.
10. Шестопап О.Л., Замбріборщ І.С., Топал М.М. Гаплопродукційна спроможність пшениці м'якої озимої за наявності в генотипі транслокацій 1RS.1BL TA 1RS.1AL // III Міжнар. наук. конфер. «Регуляція росту та розвитку рослин: фізіолого-біохімічні та генетичні аспекти», 11–12 листопада 2014 р. – Харків, 2014. – С. 53–58.

ZAMBRIBORSHCH I.S., SHESTOPAL O.L., BOYKO M.S., DOBROVA H.O.

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

THE EFFICIENCY OF ANDROGENESIS *IN VITRO* IN ANther CULTURE OF SOFT WHEAT WINTER VARIETIES AND THEIR DIFFERENT GENERATIONS HYBRIDS

Aim. To estimate the level of *in vitro* haploproduction androgenic ability of different generations populations (F_1 , F_2) soft winter wheat hybrids of the same combination to maximize the use of biotechnology cereals. **Methods.** Obtaining of bread wheat double haploid lines by anther culture *in vitro*. The statistical methods. **Results.** The influence different generation of wheat hybrids on the processes of induction and regeneration in anther culture of winter bread wheat were studied. The 21 green plants-regenerants were received. **Conclusions.** The using of anthers of the second generation simple hybrids as donor material for the effective technology creation of doubled haploid of bread winter wheat was shown.

Keywords: wheat, anther culture *in vitro*, callus, regeneration, generation simple hybrids.