

ШЕСТОПАЛ О. Л., ЗАМБРІБОРЩ І. С.✉, ТРАСКОВЕЦЬКА В. А., ВАСИЛ'ЄВ О. А., БАБА-ЯНЦ Л. Т., ЧЕКАЛОВА М. С., АФІНОГЕНОВ О. А.

Селекційно-генетичний інститут – Національний центр насіннезнавства та сортовивчення, Україна, 65036, м. Одеса, Овідіопольська дорога, 3

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

## ОТРИМАННЯ ДИГАПЛОЇДНИХ ЛІНІЙ ПШЕНИЦІ М'ЯКОЇ ОЗИМОЇ З КОМПЛЕКСНОЮ СТІЙКІСТЮ ДО ІРЖІ ТА ТВЕРДОЇ САЖКИ МЕТОДОМ КУЛЬТУРИ ПИЛЯКІВ *IN VITRO*

**Мета.** Отримання методом андрогенезу *in vitro* гомозиготного лінійного матеріалу озимої м'якої пшениці різного генетичного походження (складні гібриди), що вирізняються стійкістю до різних видів іржі. **Методи.** Культура *in vitro* ізольованих пиляків пшениці. Відсоток новоутворень та відсоток регенерації зелених рослин для кожного генотипу розраховували від кількості висаджених пиляків. Методи фітопатологічної оцінки стійкості до комплексу різних хвороб. **Результати.** Виявлені відмінності щодо частоти індукції калусогенезу (від 0,99 до 16,26 % від висаджених пиляків) й здатності до регенерації рослин (від 0 до 3,05 % від висаджених пиляків) у процесі андрогенезу *in vitro* селекційних зразків озимої м'якої пшениці різного генетичного походження. Отримано фертильні рослини-регенеранти в культурі пиляків 5 з 9 досліджених гібридів. Результативність останнього процесу була різною: від 12,5 до 60,0 % (у середньому 29,41 %) від отриманих регенерантів. Показано високий ступінь (8–9 балів) стійкості отриманих дигаплоїдів до комплексу хвороб. **Висновки.** Виявлені генотипоспецифічні морфогенетичні реакції мікроспор пшениці м'якої озимої в процесі андрогенезу *in vitro*. Найвищий рівень формування новоутворень показали зразки 120/20 та 132/20. Одержано 15 дигаплоїдних ліній із комплексною стійкістю до іржі та твердої сажки.

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

Сьогодні рівень розробок та технологічних прийомів отримання лінійного матеріалу пшениці (андрогенез *in vitro* чи метод гаплопродюсера) знаходиться на високому рівні, що дозволяє використовувати цей метод, як невід'ємну частину селекційного процесу цієї культури [1, 2]. Біотехнологічні методи мають велике значення для полегшення і прискорення селекційного процесу. Вони дають можливість

отримати нові форми пшениці, стійкі до різних несприятливих факторів, у максимально короткі терміни і без задіяння великих посівних площ [3–5]. За програмою створення вихідного селекційного матеріалу пшениці з груповою стійкістю до збудників головних хвороб (види іржі і сажки, борошнистої роси) з метою «пірамідування» у одному генотипі ефективних *Lr*, *Yr*, *Sr*, *Pm* і *Bt*-генів здійснили гібридизацію поміж ліній і сортів пшениці, які є у генофонді відділу фітопатології і ентомології. У польових розсадниках пшениці на штучно створених інфекційних фонах (окремі, комбіновані) проведено фітопатологічні оцінювання і добори гібридів, ліній, сортів пшениці, які є стійкими до збудників бурої (*Puccinia triticina*), жовтої (*Puccinia glumarum* Erikss. et Henn.), стеблової (*Puccinia graminis* f. sp. *tritici*) іржі, борошнистої роси (*Blumeria graminis* (DC) Speer f. sp. *tritici*) та твердої сажки (*Tilletia caries*) [6–8]. Мета дослідження – методом андрогенезу *in vitro* створити гомозиготні дигаплоїдні лінії з груповою стійкістю, що мають комплекс ефективних генів стійкості до хвороб.

### Матеріали і методи

З цієї метою відділом фітопатології та ентомології СГІ-НЦНС у лабораторію культури тканин були надані дев'ять селекційних ліній гібридів (F4–F5), отриманих на основі донорів, стійкість яких походить від дикорослих родичів пшениці (*Aegilops cylindrica*, *Ae. variabilis*, *Triticum erebuni*) [6, 7]. Надані лінії мали групову стійкість до бурої, стеблової, жовтої іржі, борошнистої роси, твердої та летючої сажки. Незважаючи на те, що надані гібриди отримані методом індивідуального добору «pedigree» до п'ятого покоління, більшість із них є гетерозиготи.

Як метод для отримання подвоєних гаплоїдів (DH) пшениці використовували культуру *in vitro* ізольованих пиляків пшениці. Для цього

© ШЕСТОПАЛ О. Л., ЗАМБРІБОРЩ І. С., ТРАСКОВЕЦЬКА В. А., ВАСИЛ'ЄВ О. А., БАБАЯНЦ Л. Т., ЧЕКАЛОВА М. С., АФІНОГЕНОВ О. А.

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 [8], 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 [8] 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 тижня при освітленні до появи центрів регенерації за умов 16-годинного фотоперіоду, інтенсивності освітлення – 5 тис. люкс, температурі +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, які залишилися після етапів адаптації та яровизації, від загальної кількості зелених регенерантів. А також відсоток фертильних рослин від загальної кількості рослин, що виколосилися.

У 2022 році була проведена польова оцінка отриманих у 2021 р. дигаплоїдних ліній гібридів 2/20, 3/20, 120/20, 132/20, 352/20. Проводили оцінку цього матеріалу на стійкість до

бурої, стеблової, жовтої іржі, борошнистої роси, твердої сажки на штучному комплексному інфекційному фоні цих хвороб у польовому розсаднику [9].

Оцінку отриманих даних проводили методами статистичних досліджень [10] з використанням пакету програм Excel.

### Результати та обговорення

Залежність ефективності гаплопродукції в культурі пиляків м'якої пшениці від генотипу не дає змогу забезпечити передбачуваність результатів при роботі з будь-яким генотипом і підштовхує дослідників на пошуки можливої активації морфогенетичної компетентності в умовах *in vitro* [11, 12]. У цьому році проводили гомозиготацію генотипів пшениці, стійких до бурої, стеблової, жовтої іржі, борошнистої роси та твердої сажки. Наданий дослідний матеріал вперше залучався в культуру пиляків, тобто мав невідому чутливість до андрогенезу *in vitro*. Результати досліджень цього матеріалу різних генотипів пшениці озимої м'якої наведені в табл. 1.

Показано, що на першому етапі андрогенезу *in vitro* за умов експерименту усі досліджені генотипи сформували новоутворення. Відсоток формування останніх від висаджених пиляків коливався від 0,99±0,20 (№ 385/20) до 16,26±0,74 (№ 132/20). Слід зазначити, що цей показник у культурі пиляків всіх досліджених зразків мав досить високі величини, а у чотирьох (№№ 10/20, 120/20, 132/20, 352/20) – на рівні генотипів озимої пшениці, які є донорами гаплопродукції.

Таблиця 1. Ефективність гаплопродукційного процесу в культурі пиляків *in vitro* різних генотипів пшениці озимої м'якої

Генотип	Висаджені пиляки, шт.	Новоутворення		Зелені регенеранти		Альбіносні регенеранти	
		шт.	%	шт.	%	шт.	%
2/20	2114	91	4,30±0,44	7	0,33±0,12	1	0,05±0,05
3/20	2574	100	3,89±0,38	15	0,58±0,15	3	0,12±0,07
10/20	1897	144	7,59±0,61	9	0,47±0,16	6	0,32±0,13
120/20	1835	264	14,39±0,82	25	1,36±0,27	5	0,27±0,12
114/20	2423	24	0,99±0,20	0	0	0	0,00
132/20	2460	400	16,26±0,74	75	3,05±0,35	6	0,24±0,10
155/20	1799	61	3,39±0,43	0	0	0	0,00
352/20	1938	109	5,62±0,52	8	0,41±0,15	11	0,57±0,17
385/20	1900	62	3,26±0,41	3	0,16 ±0,09	1	0,05±0,05
HCP <sub>0,05</sub>			1,86		0,62		

Однак, на наступному етапі – регенерації рослин – зелені рослини-регенеранти отримали лише в культурі пиляків семи з дев'яти генотипів. Генотипи № 120/20 та 132/20 на етапі регенерації характеризувались найбільшим регенераційним потенціалом (1,36 % та 3,05 % відповідно). Два інших гібриди, які показали високий рівень формування новоутворень (№ 10/20 та № 352/20), на другому етапі андрогенезу за показником «регенерація зелених рослин» не виділялись серед цього набору генотипів.

Наступні етапи біотехнології отримання лінійного матеріалу пшениці шляхом андрогенезу – адаптація до умов *ex vitro*, яровизація та дорощування регенерантів – є одними із найкритичніших. Це пов'язано з високим відсотком рослин, які гинуть на цьому етапі в силу різних причин: різкому водному дефіциту в тканинах після перенесення з умов *in vitro*, хромосомної незбалансованості регенерантів та інше [13]. Результати подальшого дорощування отриманих рослин регенерантів наведено в таблиці 2.

За результатами нашого дослідження на етапі акліматизації до ґрунту та яровизації виживає від 30 до 60 відсотків зелених рослин-регенерантів. Однак, і серед цих рослин не всі мають генетичні детермінанти, які дозволяють рослині проходити подальші етапи диференціації росту та розвитку до отримання насіння. В ідеалі рослини, вирощені з пилякової культури, можна розглядати як гаплоїди, оскільки вони виникли з гаплоїдних мікроспор. Однак фактичні рослини, отримані під час регенерації, можуть бути сумішшю гаплоїдів, диплоїдів або міксопloidів [14], виникнення яких обумовлено різними вадами розвитку мікроспор чи надалі калюсної тканини. Злиття або нерівний поділ ядер, ендомітоз всередині пилкового зерна, по-

рушення мейозу – все призводять до розвитку інших рослин, крім гаплоїдів.

Для злаків характерно спонтанне подвоєння хромосом у гаплоїдних клітинах калюсу, що призводить до утворення багаточисельних подвоєних гаплоїдів: у залежності від виду культури та умов культивування від 30 до 87 % [15]. У ході нашого дослідження андрогенезу озимої пшениці ми не використовували диплоїдизатори, тобто усі отримані 15 фертильних рослин – це результат спонтанної диплоїдизації. Частота останньої склала в середньому 29,41 %, що співвідноситься з подібними результатами 32,72 % у Lantos C, Pauk J, 2016 [2]. Значення спонтанної диплоїдизації коливалися від 9,76 до 54,24 % у залежності від генотипу. Середні значення спонтанної диплоїдизації склала 28,40 % [16].

Далі, отримані лінії оцінювали на стійкість до різних збудників хвороб у польових умовах штучного інфекційного розсадника (табл. 3).

Слід зазначити, що у інфекційному розсаднику були створені умови, які сприяли інтенсивному розвитку різних патогенів. Усі лінії одного генотипу не розрізнялися між собою за якісними та кількісними характеристиками стійкості до збудників хвороб, які вивчали. Тому в таблиці 3 наведено загальні дані стійкості ліній за окремими гібридними комбінаціями. Виявлено, що лише дигаплоїдні лінії генотипу 120/20 виявилися вразливими до борошнистої роси та жовтої іржі. Проте, усі одержані дигаплоїдні лінії проявили високу (8–9 балів) комплексну стійкість до бурої, стеблової, жовтої іржі та твердої сажки.

Таблиця 2. Дорощування регенерантів до отримання насіння дигаплоїдних ліній

Генотип	Зелені регенеранти, шт.	Рослини, що пережили етапи адаптації та яровизації		Фертильні рослини (ДН)		Число зерен кожної ДН лінії, шт
		шт.	%	шт.	%	
2/20	7	4	57,14	1	25,00	49
3/20	15	9	60,00	4	44,44	39, 59, 13, 36
10/20	9	0	0,00	-		
120/20	25	8	32,00	1	12,50	23
132/20	75	25	33,33	8	32,00	40, 77, 56, 32, 22, 48, 87, 50
352/20	8	5	62,50	3	60,00	6, 3, 1
385/20	3	0	0,00	-		
Всього/середнє	142	51	35,92	15	29,41	

Таблиця 3. Фітопатологічна оцінка стійкості дигаплоїдних ліній різних генотипів пшениці

№	Іржа						Борошниста роса		Тверда сажка	
	бура		стеблова		жовта		б а л	ступінь стійкості	б а л	ступінь стійкості
	б а л	ступінь стійкості	б а л	ступінь стійкості	б а л	ступінь стійкості				
DH 2/20	8	R	8	R	8	R	8	MR-MS	9	VR
DH 3/20	7	MR-MS	9	VR	8	R	8	MR-MS	8	R
DH 120/20	8	R	8	R	5	S	4	S	8	R
DH 132/20	8	R	8	R	8	R	8	R	8	R
DH 352/20	8	R	8	R	8	R	8	R	9	VR

Примітки: S – сприйнятливий (інтенсивність ураження – 40–65 %); MS – слабка сприйнятливість (інтенсивність ураження – до 25 %); MR – помірна стійкість (інтенсивність ураження – до 15 %); R – стійкий (інтенсивність ураження – до 10 %); VR – висока стійкість (інтенсивність ураження – від 0 до 5 %) (за Бабаянц, 2014 [9]).

Таким чином, у результаті дослідження отримано лінійний гомозиготний матеріал із комплексною стійкістю до різних типів іржі та твердої сажки, який є інноваційним вихідним матеріалом для селекції пшениці, а також може надалі залучатися до досліджень з вивчення генетичної основи цієї стійкості.

#### Висновки

Найвищими показниками гаплопродукції характеризувалися генотипи № 120/20 та

132/20: відсоток формування новоутворень 14,39 % і 16,26 %, відсоток формування зелених рослин 1,36 % і 3,05 % відповідно. У результаті дослідження методом культури пиляків *in vitro* отримано 15 гомозиготних дигаплоїдних ліній різних генотипів пшениці м'якої озимої із комплексною стійкістю до різних типів іржі та твердої сажки. Частота спонтанної диплоїдизації склала в середньому 29,41 % від регенерантів, що виколосилися.

#### References

1. 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.
2. 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.
3. Litvynenko M. A. Biotechnological methods in selection of agricultural crops. *Bulletin of Agrarian Science.* 2010. № 6. P. 11–14. [in Ukrainian]
4. 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.
5. 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: 10.7124/feeo.v26.1267. [in Ukrainian]
6. 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.
7. 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 : *abstracts of International Scientific Conference* (Odesa, May 5, 2021). Odesa : PBGI–NCSCI. P. 122. [in Ukrainian]
8. 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]
9. Babayants O. V., Babayants L. T. Basics of selection and methodology of assessments of wheat stability to pathogens of diseases. Odesa : VMV, 2014. 400 p. [in Russian]
10. Atramentova L. O., Utjevskaya O. M. Statistical methods in biology. Kharkiv : KhNU named V. N. Karazina, 2007. 288 p. [in Ukrainian]
11. 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.* Odesa : Astroprint. 2016. P. 139–148. [in Ukrainian]
12. Litvynenko M. A., Topal M. M., Shestopal O. L., Zambriborshch I. S., Galaev O. V. Udoskonalena tekhnolohiya selekciynogo procesu pshenyci myakoi ozymoi z vykoryctanniam biotekhnolohichnykh i moleculyarno-genetychnykh metodiv : *naukovo-metodychnyi posibnyk.* Odesa : Astroprint, 2015. 41 s. [in Ukrainian]

13. Tripathy S. K. Anther culture for double haploid breeding in rice - a way forward. *Rice Genomics Genet.* 2018. 9 (1). P. 1–6. doi: 10.5376/rgg.2018.09.0001.
14. Tripathy S. K., Swain D., Mohapatra P. M., Prusti A. M. et al. Exploring factors affecting anther culture in rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Applied Biology & Biotechnology.* 2019. 7 (02). P. 87–92. doi: 10.7324/JABB.2019.70216.
15. Mishra R., Rao G. J. N. *In vitro* androgenesis in rice: advantages, constraints and future prospects. *Rice Science.* 2016. 23 (2). P. 57–68. doi: 10.1016/j.rsci.2016.02.001.
16. 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.* 2019. 8. P. 436. doi: 10.3390/plants8100436.

**SHESTOPAL O. L., ZAMBRIBORSHCH I. S., TRASKOVETSKAYA V. A., VASILIEV O. A., BABAYANTS L. T., CHEKALOVA M. S., AFINOGENOV O. A.**

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

### **OBTAINING DIHAPLOID LINES OF SOFT WINTER WHEAT WITH COMPLEX RESISTANCE TO RUST AND HARD SMUT BY ANTHER CULTURE *IN VITRO***

**Aim.** Obtaining homozygous linear material of winter soft wheat of different genetic origin (complex hybrids), which are resistant to different types of rust by androgenesis *in vitro*. **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. Methods of phytopathological assessment of resistance to complex of various diseases. **Results.** The differences in the frequency of callus induction (from 0.99 to 16.26 % of planted anthers) and the ability to regenerate plants (from 0 to 3.05 % of planted anthers) in the process of androgenesis *in vitro* of winter soft wheat were detected. Fertile regenerants in the anthers culture 5 out of 9 studied hybrids have been obtained. The effectiveness of the last process was different: from 12.5 to 60.0 % (an average of 29.41 %) from the received regenerants. The high degree (8–9 points) of the resistance of the obtained dihaploids to a complex of diseases was shown. **Conclusions.** Genotype-specific of microspores morphogenetic reactions of soft winter wheat in the process of androgenesis *in vitro* were revealed. The highest level of callus formation were shown for samples 120/20 and 132/20. 15 dihaploid lines with complex rust resistance and hard smut were obtained.

**Keywords:** dihaploid, wheat, androgenesis *in vitro*, regeneration, resistant, rust.