

УДК: 633.111:57.085.2

Гаплопродукційна спроможність пшениці м'якої озимої за наявності в генотипі пшенично-житніх транслокацій О.Л. Шестопап, І.С. Замбріборщ, М.М. Топал

*Селекційно-генетичний інститут – Національний центр
насіннезнавства та сортовивчення (Одеса, Україна)
oksana_shestopal@mail.ru*

Проведено дослідження чутливості до андрогенезу 11 генотипів пшениці м'якої озимої, які різнилися за наявністю пшенично-житніх транслокацій 1BL/1RS, 1BL/1RS_m (модифікація) та 1AL/1RS. Виявлено відмінності між показниками андрогенезу (як «індукція новоутворень», так і «регенерація зелених рослин») у даних груп генотипів. Показано, що наявність транслокацій 1BL/1RS, 1BL/1RS_m в генотипі пшениці м'якої озимої підвищує гаплопродукційну здатність в культурі пиляків *in vitro*.

Ключові слова: пшениця, андрогенез *in vitro*, пшенично-житні транслокації.

Гаплопродукционная способность пшеницы мягкой озимой при наличии в генотипе пшенично-ржаных транслокаций О.Л. Шестопап, И.С. Замбриборщ, Н.Н. Топал

Проведено исследование чувствительности к андрогенезу 11 генотипов пшеницы мягкой озимой, отличающихся наличием пшенично-ржаных транслокаций 1BL/1RS, 1BL/1RS_m (модификация) та 1AL/1RS. Выявлены различия между показателями андрогенеза (как «индукция новообразований», так и «регенерация зеленых растений») у данных групп генотипов. Показано, что наличие транслокации 1BL/1RS, 1BL/1RS_m в генотипе пшеницы мягкой озимой повышает гаплопродукционную способность в культуре пыльников *in vitro*.

Ключевые слова: пшеница, андрогенез *in vitro*, пшенично-ржаные транслокации.

Haploproduction capacity of bread winter wheat genotypes in the presence of wheat-rye translocation in the genotype O.L. Shestopal, I.S. Zambriborsch, M.M. Topal

The ability of response to androgenesis of 11 genotypes of bread winter wheat, which differ by the presence of wheat-rye translocations 1BL/1RS, 1BL/1RS_m (modification) and 1AL/1RS were studied. Differences between the indices of androgenesis (as "induction of embryoides" and "regeneration of green plants") in these groups of genotypes were detected. It was shown that translocations 1BL/1RS, 1BL/1RS_m in genotype of bread winter wheat increase ability-to haploid production in anther culture *in vitro*.

Key words: wheat, androgenesis *in vitro*, wheat-rye translocation.

Вступ

В розвинених країнах світу використання біотехнологічних методів, зокрема, отримання лінії подвоєних гаплоїдів (DHL), вже стало невід'ємною частиною селекційного процесу. Таке інтенсивне впровадження пов'язане із швидкою гомозиготацією рослин, що зумовлює отримання вихідного матеріалу (як за внутрішньовидової, так і за віддаленої гібридизації), сорту в короткий термін (Літвиненко, 2012). Основним критерієм для отримання високого виходу DHL з гібридної комбінації F₁ є її висока гаплопродукційна здатність в культурі *in vitro*. Для цього вкрай необхідно тестування вихідного матеріалу на чутливість до андрогенезу та добір батьківських форм з високою гаплопродукційною здатністю (Ігнатова, 2008). Для селекціонерів та біотехнологів одним з об'єктів такого тестування на реакцію до андрогенезу є матеріал із пшенично-житніми транслокаціями (ПЖТ), оскільки в літературі є декілька повідомлень щодо підвищеного рівня гаплопродукції в культурі *in vitro* пиляків генотипів пшениці з ПЖТ (Henry, 1985, 1993; Першина, 2013).

Пшенично-житні транслокації широко використовується в багатьох селекційних програмах пшениці м'якої озимої і ярої та є прикладом успішного використання чужорідного ресурсу для поліпшення культури. Ці транслокації викликають найбільший інтерес у селекціонерів через позитивний

генетичний вплив на господарські та біологічні цінні ознаки і властивості, як то – продуктивність, стійкість до біотичних та абіотичних факторів.

Найбільш поширеною є житня транслокація 1BL/1RS – більше 300 сортів, значно менше 1AL/1RS транслокація – біля 100 сортів. Великий інтерес викликає модифікована пшенично-житня транслокація 1BL/1RS_m без локусу Sec-1, яка створена на базі мексиканського ярого сорту Pavon професором А. Лукашевським. А доктору біологічних наук Рибалко О.І. вдалося успішно перенести 1BL/1RS_m транслокацію в озимий генотип без її рекомбінації і без втрати генів стійкості до грибкових захворювань *Pm 8*, *Lr 26*, *Sr 31*, *Yr 9* (Рибалко, 2011). Форми, які несуть цю транслокацію мають поліпшенні хлібопекарські властивості борошна, але менш морозо- та зимостійкі та менш продуктивні на відміну від генотипів з транслокаціями 1BL/1RS, 1AL/1RS.

При отриманні DHL пшениці м'якої важливою проблемою є залежність ефективності гаплопродукції в культурі пиляків від генотипу. Одним з підходів до вирішення цієї проблеми є використання в схрещуваннях джерел і донорів високої гаплопродукції із чітко визначеними генетичними детермінантами. Тому визначення гаплопродукційної здатності генотипів пшениці м'якої озимої, які містять пшенично-житні транслокації є актуальним та важливим завданням.

Об'єкти та методи дослідження

За вихідний матеріал слугували F₁ гібриди дев'яти комбінацій прямих та зворотних схрещувань різних генетичних джерел з пшенично-житніми транслокаціями 1BL/1RS (Кавказ, Щедрість одеська), 1BL/1RS_m (Ер.3305/13) та 1AL/1RS (Житниця одеська, Ер.310/12) з місцевими сортами – Зміна, Мудрість одеська, Антонівка, Гарантія одеська (табл. 1).

Таблиця 1.

Наявність транслокацій у дослідному матеріалі

Сорт, лінія	транслокація
Зміна, Мудрість од., Гарантія од., Антонівка	-
Житниця од, Ер. 310/12	1AL/1RS
Ер. 3305/13	1BL/1RS _m
Кавказ, Щедрість	1BL/1RS

Беручи до уваги на відому локалізацію ПЖТ 1BL/1RS, 1BL/1RS_m і 1AL/1RS у батьківських форм гібридні комбінації F₁ було розподілено на групи:

- дві комбінації: 1BL/1RS (далі **B**) / 1BL/1RS_m (далі **B_m**) – Кавказ / Ер. 3305/13 (**BxB_m**), Ер. 3305/13 / Кавказ (**B_mxB**);
- дві комбінації: 1AL/1RS (далі **A**) - Житниця од. / Ер.310/12 (**AxA**) та Ер.310/12 / Житниця од. (**AxA**);
- дві комбінації: 1AL / 1RS(далі **A**) / Non 1RS (далі **0**) - Житниця од. / Мудрість од. (**Ax0**) та Житниця од. / Зміна (**Ax0**);
- по одній комбінації: - Житниця одеська / Ер.3305/13 (**AxB_m**), Щедрість од. / Мудрість од. (**Bx0**) і Гарантія од. / Антонівка (**0x0**).

Рослини вирощували на дослідному полі 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) впродовж 3–5 діб при 2–4 °С у темряві. Колосся поверхнево стерилізували насиченим розчином гіпохлориту кальцію за прийнятною методикою. Ізольовані пиляки висаджували на індукційне живильне середовище 190-2 (Wang, 1984) у модифікації (Лобанова, 2006). Висаджені пиляки культивували перші 3 доби у темряві за температури 30°С, далі – при 24°С до появи новоутворень. Сформовані макроструктури пересаджували на середовище MS у модифікації (Ігнатова, 2008) 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 – 8 тис. Люкс, температурі 24°C до формування рослин. Зелені рослини пересаджували на безгормональне живильне середовище MS та яровизували у високих широких пробірках (Ø20 мм x 200 мм) та скляних банках (200 мл) за температури 2–4°C, 16-годинному фотоперіоді, інтенсивності освітлення 500 – 1000 люкс.

Наразі отриманні рослини-регенеранти зростають в умовах штучного клімату. Також з кожної рослини-регенеранта буде взято рослинний матеріал для виявлення транслокації 1BL/1RS, 1BL/1RS_m та 1AL/1RS за допомогою молекулярних маркерів. Це дасть змогу дослідити частоту передачі ПЖТ при отриманні регенерантів в культурі *in vitro* пиляків гібридів першого покоління.

Результати та обговорення

Результати тестування гаплопродукційної здатності в культурі пиляків *in vitro* 9 гібридних популяцій F₁, сорту Житниця Одеська та модифікованої лінії Ер.3305/13 пшениці озимої м'якої наведені в табл. 2. Показано, що за даних умов експерименту усі досліджені генотипи виявились чутливими до першого етапу андрогенезу *in vitro* (формування новоутворень). Однак, зелені рослини-регенеранти отримали лише від дев'яти генотипів, крім двох: Житниця Одеська та F₁ Житниця Одеська / Мудрість одеська.

Таблиця 2.

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

Генотип	Висаджено пиляків, шт.	Ново-утворення, %	Регенерація			
			зелені		альбіно	
			шт.	%	шт.	%
Ер.3305/13 (B _m)	1902	21,19 ± 0,94	180	9,46 ± 0,67	49	2,58 ± 0,36
F ₁ Кавказ / Ер.3305/13 (BxB _m)	1563	38,84 ± 1,23	142	9,09 ± 0,73	57	3,65 ± 0,47
F ₁ Ер.3305/13 / Кавказ (B _m xB)	1985	35,11 ± 1,07	149	7,51 ± 0,59	33	1,66 ± 0,29
Житниця од. (A)	916	2,07 ± 0,47	0	-	0	-
F ₁ Житниця од. / Ер. 310/12 (AxA)	1200	3,25 ± 0,51	4	0,33 ± 0,17	4	0,33 ± 0,17
F ₁ Ер.310/12 / Житниця од. (AxA)	868	10,48 ± 1,04	27	3,11 ± 0,59	15	1,73 ± 0,44
F ₁ Житниця од. / Ер.3305/13 (AxB _m)	1326	9,95 ± 0,82	30	2,26 ± 0,41	5	0,38 ± 0,17
F ₁ Житниця од. / Мудрість од. (Ax0)	555	2,34 ± 0,64	0	-	1	0,18 ± 0,18
F ₁ Житниця од. / Зміна (Ax0)	2664	9,61 ± 0,57	43	1,61 ± 0,24	16	0,60 ± 0,15
F ₁ Щедрість / Мудрість од. (Bx0)	892	5,16 ± 0,74	18	2,02 ± 0,47	1	0,11 ± 0,11
F ₁ Гарантія од. / Антонівка (0x0)	793	1,64 ± 0,45	3	0,38 ± 0,22	0	-
HCP _{0,05}		1,49		0,82		0,48

Проведене дослідження чутливості до андрогенезу 2 сортозразків та 9 гібридних комбінацій пшениці м'якої озимої, виявило достовірні відмінності між показниками гаплопродукційної здатності (як за показником «індукція новоутворень», так і за показником «регенерація зелених рослин») між групами зразків із житніми транслокаціями в різні хромосоми пшениці: на 1AL чи на 1BL (табл. 2, рис. 1,2). Встановлено, що серед досліджених генотипів високими показниками гаплопродукційної здатності (формування новоутворень та зелених рослин-регенерантів) характеризувалися зразки, що несуть в геномі пшенично-житню транслокацію 1BL/1RS, 1BL/1RS_m. Найвищий рівень формування новоутворень

в культурі пиляків *in vitro* показали два реципрокних гібрида F₁ – Кавказ / Ер.3305/13 та Ер.3305/13 / Кавказ (38,84±1,23 і 35,11±1,07 відсотків відповідно), обидві батьківські форми цієї комбінації несуть житню транслокацію на довгому плечі 1В хромосоми. Значно нижчими показниками, які характеризують ефективність першого етапу андрогенезу, визначались гібриди, що не містили даної транслокації (від 1,64±0,45 до 10,48±1,04 новоутворень на 100 висаджених пиляків (табл. 2, рис. 1).

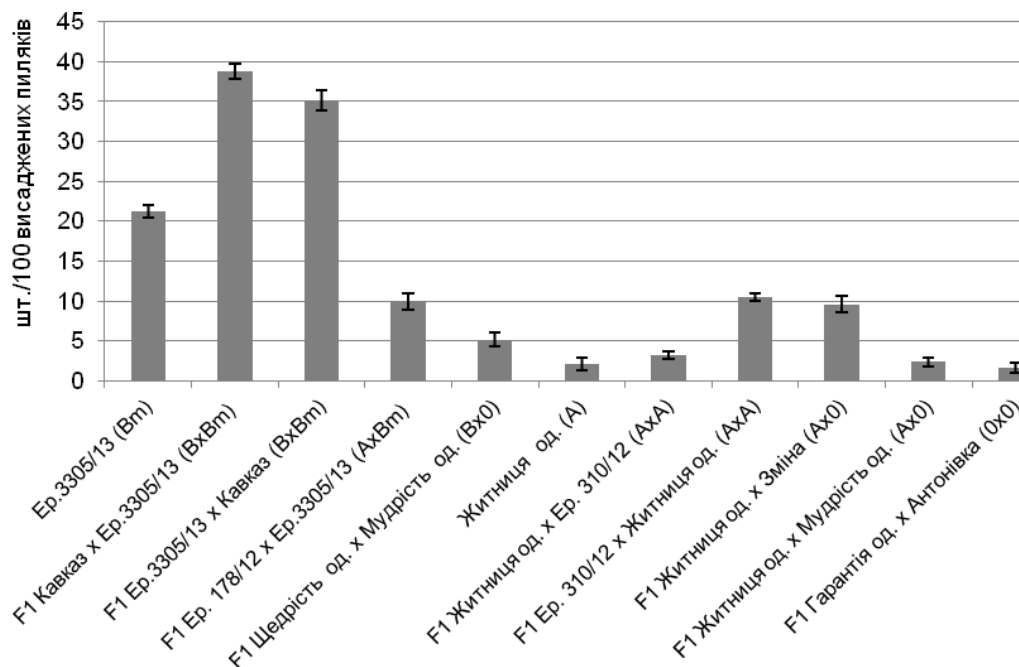


Рис. 1. Формування новоутворень в культурі пиляків генотипів пшениці м'якої озимої, що різняться за складом та наявністю пшенично-житніх транслокацій

В літературі є декілька повідомлень про позитивний вплив транслокації 1BL/1RS на регенерацію зелених рослин в культурі пиляків пшениці м'якої озимої (Hengy, 1985, 1993; Шестопал, 2013, 2014). Показано, що у сортів та гібридів, які містили транслокацію 1BL/1RS або 1BL/1RS_m, рівень індукції новоутворень та регенерації з них рослин був достовірно вищим, у порівнянні з такими, де мала місце транслокація 1AL/1RS (за виключенням двох комбінацій: Ер. 310/12 / Житниця одеська та Житниця одеська / Зміна, що можливо пов'язане з властивостями батьків, які не несли у геномі пшенично-житніх транслокацій). Так, індукційна здатність перших коливалась від 5,16±0,74 до 38,84±1,23 шт. новоутворень на 100 висаджених пиляків, а для генотипів з транслокацією 1AL/1RS – від 2,07±0,47 до 10,48±1,04.

Подібні ж результати були отримані і за показником «регенерація зелених рослин», що є відображенням другого етапу гаплопродукції. Від кожного зразка, що містив житню транслокацію на 1В хромосомі пшениці, отримали зелені рослини-регенеранти. Кількість їх для окремих генотипів різнилася, але була досить високою – від 2,02 до 9,46 рослин на 100 висаджених пиляків (табл. 1, рис. 2). Рослини альбіноси, що є небажаним «продуктом» андрогенезу *in vitro*, отримали від 10 з 11 досліджених генотипів. Частка хлорофіл-дефектних рослин серед усіх регенерантів для зразків з 1BL/1RS, 1BL/1RS_m транслокаціями коливалась від 5 до 30 %, а для генотипів із 1AL/1RS транслокацією – від 15 до 100% (табл. 2, рис. 2).

Щодо регенерації рослин на другому етапі андрогенезу з новоутворень, що одержані від сортів та гібридів пшениці з транслокацією на 1А хромосомі. Від двох гібридів Ер. 310/12 / Житниця од. та Житниця од. / Зміна отримано середню кількість зелених рослин (рис. 2), а від трьох інших – достовірно меншу (від 0 до 0,33 ± 0,17 відсотків), яка співпадала з даним показником у гібриду Гарантія од. / Антонівка, який не містив в геномі жодної транслокації. Слід зазначити, що за двома показниками, що вивчались, гібрид F₁ Житниця од. (А) / Ер.3305/13 (В_m), який містив обидві транслокації, показав проміжні результати – формування новоутворень 9,95±0,82 шт./100 пиляків та регенерантів 2,26±0,41 шт./100 пиляків відповідно.

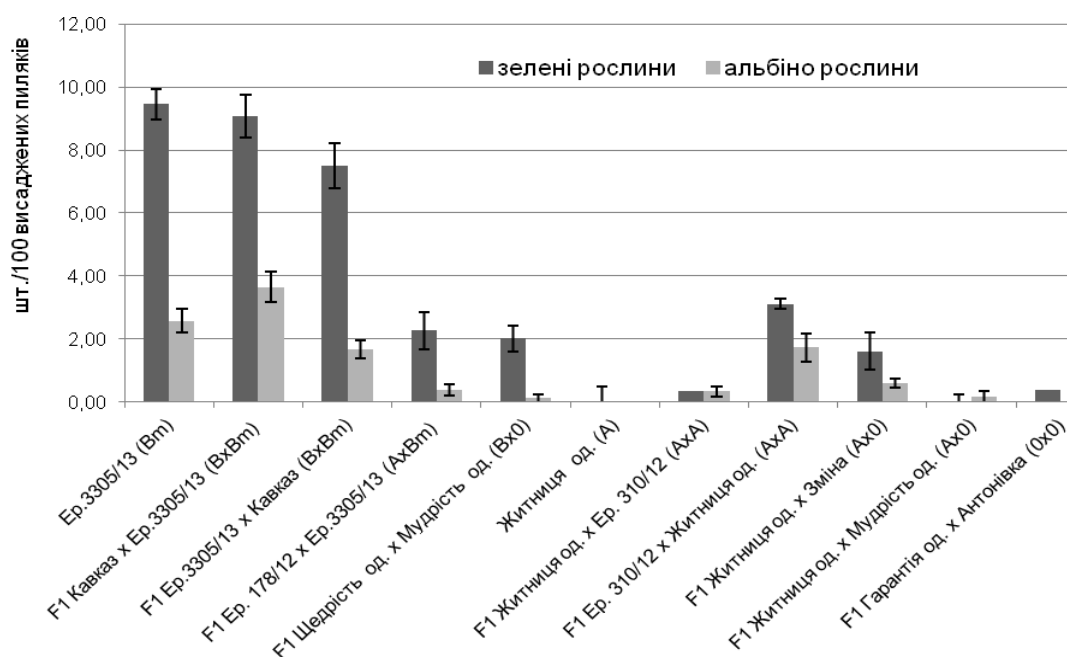


Рис. 2. Регенерація рослин в культурі пиляків генотипів пшениці м'якої озимої, що різняться за наявністю та складом пшенично-житніх транслокацій

Характерна особливість дослідження андрогенезу для цього року – велика частка (до 5-10 %) регенерації зелених рослин відбувалася шляхом утворення ембріодоподібних структур вже на індукційному середовищі. Новоутворення при пересадці з первинного на наступне живильне середовище мали форму сформованого зиготичного зародка, який дуже швидко проростав з формуванням типової зародкової структури – колеоптиля, листка та корінця, тоді як за звичай регенерація з новоутворень в культурі *in vitro* пиляків пшениці починається з органогенезу – утворення листків. Іноді ембріодоподібні структури формувались на поверхні калюсу (рис. 3).

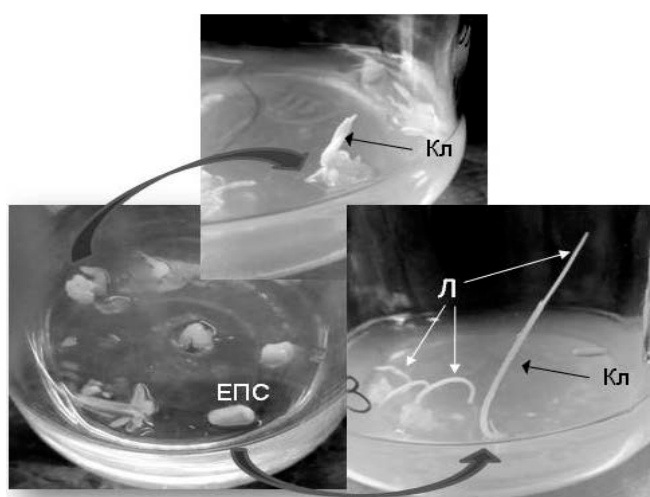


Рис. 3. Регенерація рослин в культурі *in vitro* пиляків пшениці м'якої озимої: ЕПС – ембріодоподібні структури, Кл – колеоптиль, Л – листки

Таким чином, в даних умовах експерименту, виявлено, що наявність транслокацій 1BL/1RS, 1BL/1RS_m в генотипі пшениці м'якої озимої підвищує гаплопродукційну здатність пиляків в культурі *in vitro*, що підтверджує дані літератури (Henry, 1985, 1993).

Висновки

1. В культурі *in vitro* пиляків пшениці озимої м'якої отримано 716 зелених регенерантів, які після яровизації, висаджено у ґрунт для адаптації та дорощування в умовах *ex vitro*.

2. Чутливість до андрогенезу *in vitro* генотипів пшениці м'якої озимої із транслокацією короткого плеча жита 1RS залежить від її локалізації в геномі пшениці. Наявність в генотипі пшенично-житньої транслокації 1BL/1RS підвищує гаплопродукційну здатність мікроспор в культурі *in vitro*, на відміну від транслокації 1AL/1RS.

Список літератури

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. / Ihnatova S.O., Zhosonar M.V., Lobanova K.I. ta in. Otrymannya podvovenykh haployidiv m'yakoyi pshenytsi v kul'turi pylyakiv: metodychni rekomendatsiyi. – Pivden. Biotekhnoloh. Tsentrv roslyn-vi UAAN. – Odesa, 2008. – 12 s.

Літвиненко М.А. Біотехнологічні методи у селекції сільсько-господарських культур // Вісник аграрної науки. – 2010. – № 6. С. 11-14. / Litvynenko M.A. Biotekhnolohichni metody u selektsiyi sil's'ko-hospodars'kykh kul'tur // Visnyk ahraryoi nauky. – 2010. – # 6. S. 11-14.

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. / Lobanova K.I., Zhosonar M.V., Ihnatova S.O. Shlyakhy realizatsiyi reheneratsiyonoho potentsialu v kul'turi pylyakiv u riznykh henotypiv ozymoyi m'yakoyi pshenytsi // Visnyk Ukrayins'koho tovarystva henetykiv i selektsioneriv. – 2006. – T. 4, # 1. – S. 52-57.

Першина Л.А., Осадчая Т.С., Бадаева Е.Д. и др. Изучение особенностей андрогенеза в культуре пыльников сортов и перспективной формы яровой мягкой пшеницы западносибирской селекции, различающихся наличием или отсутствием пшенично-чужеродных транслокаций // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2013. – Том 17, № 1. – С. 40-49. / Pershina L.A., Osadchaya T.S., Badaeva E.D., Belan I.A., Rosseeva L.P. Izuchenie osobennostey androgeneza v kulture pylnikov sortov i perspektivnoy formy yarovoy myagkoy pshenitsyi zapadnosibirskoy selektsii, razlichayuschihysya nalichiem ili otsutstviem pshenichno-chuzherodnykh translokatsiy // Vavilovskiy zhurnal genetyki i selektsii. – 2013. – Tom 17, # 1. – S. 40-49.

Рибалка О.І., Моргун В.В., Починок В.М. Центрична житньо-пшенична хромосомна транслокація 1RSm.1BL: генетична модифікація для використання в селекції на якість борошна // Физиология и биохимия культурных растений. – 2011. – Т. 43, № 5. – С. 371-377. / Rybalka O.I., Morhun V.V., Pochynok V.M. Tsentrychna zhytn'o-pshenychna khromosomna translokatsiya 1RSm.1BL: henetychna modyifikatsiya dlya vykorystannya v selektsiyi na yakist' boroshna // Fyziolohyya y byokhymyya kul'turnykh rastenyi. – 2011. – T. 43, # 5. – S. 371-377.

Шестопал О.Л., Замбріборщ І.С., Топал М.М. и др. Вивчення гаплопродукційної здатності м'якої пшениці з пшенично-житніми транслокаціями // VIII Міжнар. наук. конфер. «Фактори експериментальної еволюції організмів». – Алушта, 2013. – Т.12. – С.326-330. / Shestopal O.L., Zambriborshch I.S., Topal M.M., Litvynenko M.A., Ihnatova S.O. Vyvchennya haploproduktsiyanoi zdatnosti m'yakoyi pshenytsi z pshenichno-zhytnimy translokatsiyamy // VIII Mizhnar. nauk. konfer. «Faktory eksperymental'noyi evolyutsiyi orhanizmiv». – Alushta, 2013. – T.12. – S.326-330.

Шестопал О.Л., Замбріборщ І.С., Топал М.М. Гаплопродукційна спроможність пшениці м'якої озимої за наявності в генотипі транслокацій 1RS.1BL та 1RS.1AL // III Міжнар. наук. конфер. «Регуляція росту та розвитку рослин: фізіолого-біохімічні та генетичні аспекти», 11-12 листопада 2014р., м. Харків. – X. : ХНУ ім. В.Н. Каразіна, 2014. – С. 71-72. / Shestopal O.L., Zambriborshch I.S., Topal M.M. Haploproduktsiyina spromozhnist' pshenytsi m'yakoyi ozymoyi za nayavnosti v henotypi translokatsiy 1RS.1BL ta 1RS.1AL // III Mizhnar. nauk. konfer. «Rehulyatsiya rostu ta rozvytku roslyn: fiziolohe-biokhimichni ta henetychni aspekty», 11-12 lystopada 2014r., m. Kharkiv. – Kh. : KhNU im. V.N. Karazina, 2014. – S. 71-72.

Henry Y., De Buyser J. Effect of the 1B/1R translocation on anther culture ability in wheat (*Triticum aestivum* L.) // Plant Cell Reports. – 1985. – Vol. 4(6). – P. 307-310.

Henry Y., Bernard S., Bernard M. et al. Nuclear gametophytic genes from chromosome arm 1RS improve regeneration of wheat microspore-derived embryos // Genome. – 1993, 36(5). – P. 808-814.

Wang X., Hu H. The effect of potato ii medium for triticales anther culture // Plant Sci. Lett. – 1984. – Vol. 36. – P. 237 – 239.

Представлено: О.В. Білінська / Presented by: O.V. Bilynska

Рецензент: В.Ю. Джамсєв / Reviewer: V.Yu. Dzhameev

Подано до редакції / Received: 20.10.2014