

УДК 576:606:631.1

М. С. БОЙКО, інж.,
І. І. МОЦНИЙ, к. б. н., ст. наук. співроб.,
О. Л. ШЕСТОПАЛ, к. б. н., ст. наук. співроб.
СГІ-НЦНС, Одеса
e-mail: karadras2@yandex.ru

АНДРОГЕНЕЗ *IN VITRO* У ЛІНІЙ І ПОПУЛЯЦІЙ ПШЕНИЦІ М'ЯКОЇ ОЗИМОЇ З РІЗНИМИ СТРОКАМИ ДОСТИГАННЯ

*Аналізували гаплопродукційну здатність сортів, ранньостиглих аналогів і гібридів пшениці м'якої озимої. Вивчали вплив генотипу та генофону на здатність мікроспор до андрогенезу *in vitro*. Виявлено, що генотип та генофон достовірно впливають на показник «індукція новоутворень». Залежності показника «регенерація зелених рослин» від генофону та генотипу не виявлено. В результаті проведення матеріалу через культуру пиляків *in vitro* отримані форми, що становлять інтерес для подальшого дослідження.*

Ключові слова: пшениця м'яка озима, ранньостиглість, ген *Ppd-D1*, андрогенез *in vitro*.

Вступ. Пшениця м'яка озима — одна з найпоширеніших і найважливіших культур у сільськогосподарському виробництві України. Успіхи вітчизняної селекції з цієї культури багато в чому залежать від різноманіття сортів, що мають різні корисні ознаки. Створювати нові комбінації ознак — важливе завдання науковців. Результат досягається різними шляхами. Одним з біотехнологічних методів, що успішно застосовується у роботі з пшеницею, є отримання гомозиготного матеріалу на основі андрогенезу *in vitro*. Цей метод широко використовується, але багато питань досі потребують додаткового дослідження й обговорення. Зокрема, важливим завданням є вивчення особливостей процесу андрогенезу *in vitro* у м'якої пшениці залежно від наявності в генотипі рослини тих чи інших генів фотоперіодичної чутливості.

Ген *Ppd-D1* відповідає за реакцію рослин пшениці на фотоперіод. Його алель *Ppd-D1a* зумовлює фотоперіодичну нечутливість рослини, скорочуючи таким чином період до колосіння [1], що дає рослинам пшениці перевагу — можливість завершити період наливу зерна до настання високих температур і посухи [2]. Ранньостиглі сорти в посушливих умовах по суті встигають сформувати зерно до часу, коли даний процес уже неможливий через брак вологи.

Ще одна перевага ранньостиглих сортів пшениці — це їхня здатність уникати ураження при наростанні інфекційного навантаження. Ознаки

захворювання починають проявлятися у них тоді, коли процеси формування і наливу зерна в основному вже завершені, тому зниження фотосинтезуючої здатності листової та іншої поверхні рослини на цьому етапі не має вирішального значення. При цьому виграють показники якості зерна. Образно кажучи, ранньостиглі сорти «ухиляються» від хвороб [3]. Отже, ранньостиглість може, хоч і не прямо, а все ж позитивно впливати на продуктивність пшениці м'якої озимої, і створення ранньостиглих ліній такої культури за допомогою, зокрема, методу андрогенезу *in vitro* — актуальне завдання генетиків та селекціонерів.

Матеріали та методи. Досліджували три сорти пшениці м'якої озимої (Кооператорка, Одеська 3 і Степняк 1), три їхні ранньостиглі аналоги, в генотип яких вносився алель *Ppd-D1a* (табл. 1), а також три популяції F_1 — гібриди відповідних сортів і аналогів.

Таблиця 1

Схема схрещувань для внесення в генотип рослини алеля *Ppd-D1a* з метою створення ранньостиглого аналога

Генофон	Аналог*	Схема схрещування**
Кооператорка (К)	K_p	F_7 Кооператорка × Кооператорка К-90
Одеська 3 (Од.3)	$Од.3_p$	Одеська 3 × Одеська 3 К-75 self × Одеська 3 self ⁵
Степняк 1 (Ст. 1)	$Ст.1_p$	F_7 Степняк 1 × Степняк 2К

* K_p , $Од.3_p$, $Ст.1_p$ — ранньостиглі аналоги сортів Кооператорка, Одеська 3 і Степняк 1 відповідно.

** Кооператорка К-90, Одеська 3 К-75 та Степняк 2К — короткостеблові аналоги відповідних сортів, створені В. В. Хангільдіним [4].

Вивчали вплив генотипу рослини та генофону на здатність пиляків до андрогенезу *in vitro*. Підраховували кількість висаджених пиляків, кількість новоутворень та кількість зелених рослин-регенерантів. Здатність до гаплопродукції оцінювали, розраховуючи кількість новоутворень на 100 висаджених пиляків і кількість рослин-регенерантів на 100 отриманих новоутворень. Також для встановлення впливу названих вище факторів застосовували метод двофакторного дисперсійного аналізу в програмі Statistica.

Рослини вирощували в полі. Добирали колоски донорних рослин з пиляками, мікроспори яких знаходилися на вакуолізованій стадії розвитку. Попередньо обробляли матеріал і стерилізували його за загальноприйнятною методикою [5]. Ізольовані пиляки висаджували на середовище для індукції новоутворень — 190–2 [6] в модифікації [7]. Висаджені пиляки культивували 3 доби при температурі 30 °С, надалі — при 24 °С до появи новоутворень. Сформовані макроструктури культивували на модифікованому середовищі MS при 16-годинному фотоперіоді. Отримані зелені регенеранти пересаджували на безгормональне середовище MS і ривизували [5].

Результати та обговорення. На різних етапах андрогенезу *in vitro* вплив таких чинників, як генотип і генофон рослин, позначився по-різному (табл. 2).

Таблиця 2

Показники першого та другого етапів андрогенезу *in vitro*

Генотип	Кількість пиляків	Новоутворення		Зелені регенеранти	
		шт.	шт./100 пиляків	шт.	шт./100 новоутворень
Кооператорка (К)	1380	6	0,43 ± 0,18	1	16,67 ± 15,21
F ₁ К × К _p	1247	8	0,64 ± 0,23	0	0 ± 9,05
К _p (аналог)	1004	11	1,10 ± 0,33	0	0 ± 7,12
Одеська 3 (Од.3)	1972	0	0 ± 0,05	0	–
F ₁ Од.3 × Од.3 _p	1366	11	0,81 ± 0,24	3	27,27 ± 13,43
Од.3 _p (аналог)	1553	8	0,52 ± 0,18	1	12,50 ± 12
Степняк 1 (Ст.1)	1858	24	1,29 ± 0,26	3	12,50 ± 6,75
F ₁ Ст.1 × Ст.1 _p	1801	31	1,72 ± 0,31	2	2 ± 3
Ст.1 _p (аналог)	1470	28	1,90 ± 0,36	2	7,14 ± 4,87

На першому етапі роботи (індукція новоутворень) відмінності між різними лініями і популяціями проявлялися чітко (рис. 1).

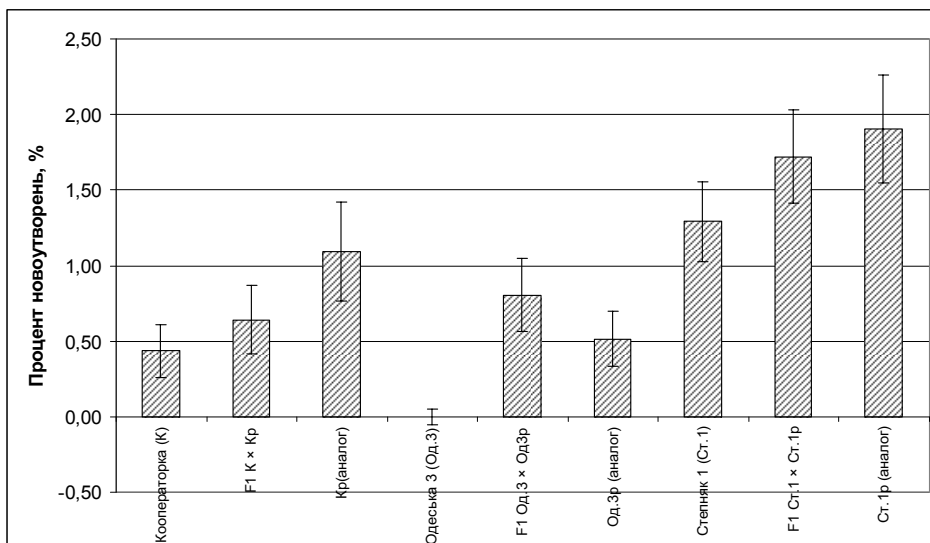


Рис. 1. Перший етап андрогенезу *in vitro* (індукція новоутворень на живильному середовищі 190–2) у досліджених сортів, аналогів та гібридів

Найвищі показники індукції новоутворень були отримані на пиляках рослин, створених на генофоні сорту Степняк 1. Відсоток новоутворень помітно перевищував показники всіх інших сортів, аналогів і гібридів за винятком аналога сорту Кооператорка.

Також можна помітити, що для сортів Кооператорка, Одеська 3 і Степняк 1, які містять алель *Ppd-D1b*, відсоток новоутворень достовірно нижчий, ніж для відповідних аналогів, що імовірно містили алель *Ppd-D1a*. Гібриди, які теоретично містили комбінацію цих алелів, за індукцією новоутворень займали проміжне положення між батьківськими формами.

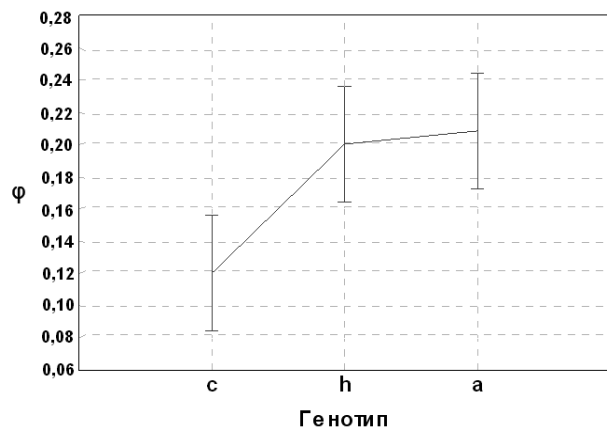


Рис. 2. Вплив генотипу на кількість новоутворень (с — сорти, h — гібриди, а — аналоги). Середнє значення \pm 95 % довірчий інтервал

ного аналізу. Підраховували відсотки новоутворень, після чого переводили їх у радіани (табл.3) із застосуванням кутового перетворення Фішера [8]. Було встановлено, що генофон (рис. 2) і генотип (рис. 3) достовірно впливають на індукцію. Аналоги та гібриди перевищують сорти за даним показником. З генофонів найбільш продуктивним виявився Степняк 1, дещо слабкішим — Кооператорка і найменш продуктивним — Одеська 3.

Вплив генотипу та генофону на кількість зелених регенерантів не був підтверджений. Можливо, це пов'язано з незначним відсотком виходу таких рослин (рис. 4).

Зелені рослини були отримані не для всіх форм. Так, із новоутворень аналога сорту Кооператорка, гібрида на генофоні сорту Кооператорка і сорту Одеська 3 регенеранти не сформувались. Найбільш значний відсоток

У всіх випадках відсоток новоутворень у гібридів перевищував даний показник у сортів, але був дещо нижчий, ніж у аналогів. Отже, можна припустити, що при внесенні в генотип рослини алеля *Ppd-D1a* відсоток новоутворень підвищується.

Цікавило і таке питання: чи підтвердиться вплив генофону і генотипу рослини на кількість новоутворень за допомогою двофакторного дисперсій-

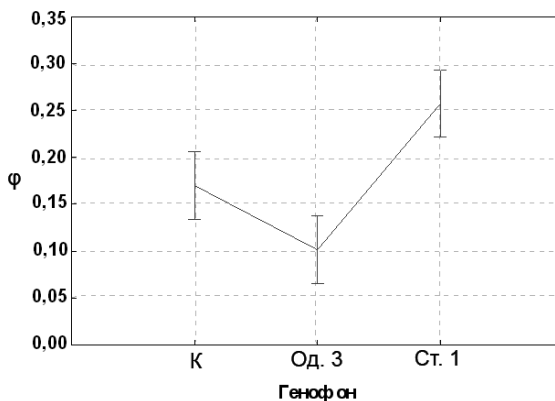


Рис. 3. Вплив генофону на кількість новоутворень (К — Кооператорка, Од. 3 — Одеська 3, Ст. 1 — Степняк 1).

Середнє значення \pm 95 % довірчий інтервал

Таблиця 3

Вплив генотипу і генофону на кількість новоутворень у культурі пиляків *in vitro*.
Результати двофакторного дисперсійного аналізу

Джерело варіації	df (ступінь свободи)	SS (сума квадратів)	MS (середній квадрат)	F (відношення (критерій) Фішера)	p (рівень значимості для обчисленого F)
Генотип	2	0,028478	0,014239	9,4599*	0,006130
Генофон	2	0,073545	0,036772	24,4299*	0,000231
Взаємодія генотип × генофон	4	0,012213	0,003053	2,0285	0,173799
Помилка	9	0,013547	0,001505		
Всього	17	0,127783			

* — вплив чинника достовірний.

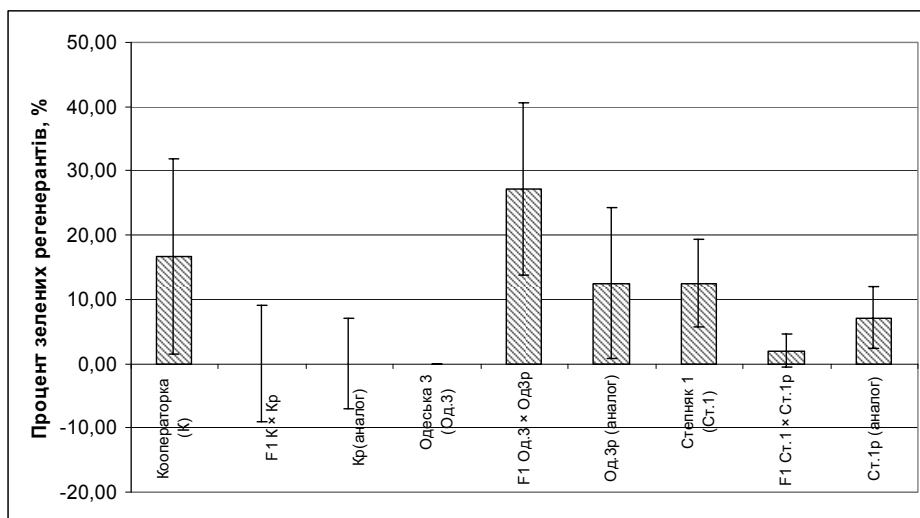


Рис. 4. Другий етап андрогенезу *in vitro* (одержання зелених рослин-регенерантів) у досліджених сортів, аналогів та гібридів

останніх був отриманий у гібрида на генофоні сорту Одеська 3. Проте помилка даного значення виявилась занадто великою, щоб назвати цю тенденцію чітко вираженою. В цілому, беручи до уваги також результати дисперсійного аналізу (оскільки достовірних відмінностей виявлено не було, дані не наводяться), можна зробити висновок, що чіткої залежності між генотипом та генофоном і кількістю рослин-регенерантів нема.

Отже, наявність у генотипі рослини алелів раннестиглості позитивно впливає на кількість новоутворень на першому етапі андрогенезу *in vitro*, але не сприяє подальшій регенерації.

В цілому отримані дані, в усякому разі стосовно рекурентних форм, співпадають з попередніми дослідженнями [9]. В обох випадках показ-

ник «індукція новоутворень» був найвищий у сорту Степняк 1 і дещо нижчий у Кооператорки; у сорту Одеська 3 новоутворень не отримано. Однак за показником «регенерація зелених рослин» відповідність не повна — у попередніх дослідженнях у сорту Кооператорка не було отримано зелених регенерантів, на відміну від чинного дослідження (отримано 0,07 % зелених регенерантів від кількості пиляків).

Висновки. 1. Ранньостиглі аналоги сортів Кооператорка, Одеська 3 і Степняк 1, які імовірно включають алель *Ppd-D1a*, перевершують відповідні сорти за кількістю новоутворень. Гібриди за цим показником займають проміжне положення між батьківськими формами. Найбільший відсоток новоутворень відзначено у генотипів, створених на генфоні сорту Степняк.

2. Генотип та генотип пшениці м'якої озимої (мається на увазі поділ на сорти, аналоги та гібриди) достовірно впливають на показник «кількість новоутворень», хоча такого впливу на показник «кількість зелених рослин-регенерантів» не виявлено.

3. У зв'язку з отриманими результатами доцільно провести точну ідентифікацію наявності алеля *Ppd-D1a* у вивчених лініях-аналогах методом ПЛР.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Чеботар Г. О., Чеботар С. В., Моцний І. І., Сиволап Ю. М. Уточнення ступеня зчеплення генів *Rht8* та *Ppd-D1* на хромосомі 2D озимої м'якої пшениці // Цитология и генетика. — 2013. — 47, № 2. — С. 12–17.
2. Чеботар Г. О., Моцний І. І., Чеботар С. В., Сиволап Ю. М. Вплив алелів короткостебловості та гена *Ppd-D1* на агрономічні ознаки м'якої пшениці // Збірник наукових праць Селекційно-генетичного інституту — Національного центру насіннезнавства та сортівивчення. — Одеса: СГІ–НЦНС, 2010. — С. 142–154.
3. Лихенко И. Е. Проблемы сортового разнообразия в современном растениеводстве (обзор) / И. Е. Лихенко // Зерновое хозяйство России. — 2010. — № 3. — С. 71–75.
4. Хангильдин В. В. Создание аналогов старых селекционных сортов как метод консервации генов адаптивности для использования в селекции // Мат. II совещания «Изогенные линии и генетические коллекции». — Новосибирск: ИЦИГ СО РАН, 1993. — 194 с.
5. Ігнатова С. О., Жосонар М. В., Шестопап О. Л. та інш. Отримання подвоєних гаплоїдів м'якої пшениці в культурі пиляків. Методичні рекомендації / Півден. біотехнолог. центр в рослин-ві УААН. — Одеса, 2008. — С. 12.
6. Zhuang J. J., Xu J. Increasing differentiation frequencies in wheat pollen callus // Cell and tissue culture techniques for cereal crop improvement. — 1983. — Science Press. — Beijing. — P. 431.
7. 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.

8. Лакин Г. Ф. Биометрия. — Москва: Высшая школа, 1973. — 343 с.
9. Замбриборщ И. С., Доброва А. А., Лобанова Е. И., Моцный И. И., Бойко М. С., Чеботарь Г. А. Отзывчивость линий гексаплоидной пшеницы с *Rht* генами к андрогенезу и влияние условий получения удвоенных гаплоидов на полевые характеристики регенерантов // Международная науч. конфер. «Интродукция, сохранение и использование биологического разнообразия мировой флоры». — Минск, 2012. — Ч. 2. — С. 303–307.

Надійшла 8.12.2014.

UDC 576:606:631.1

Boyko M. S., Motsnyi I. I., Shestopal O. L. Plant Breeding and Genetics Institute — National Center of Seed and Cultivar Investigations

IN VITRO ANDROGENESIS IN WINTER BREAD WHEAT LINES AND POPULATIONS OF VARIOUS RIPENING

The androgenesis *in vitro* ability of three soft winter wheat varieties, their early ripening analogues and the proper varieties' and analogues' hybrids was compared. The effect of genotype and genetics background was examined for the ability to androgenesis *in vitro*. At the first stage of work the most high percent of tumors was obtained for the lines and the hybrid population which were created on Stepniak 1 genetics background: 1,29; 1,72 and 1,90 %, respectively. It was proved by two-factor analysis of variance that the genotypes of the varieties' analogues significantly exceed the varieties by the index '»induction of tumors». Dependence of «green plants regeneration» index on the genetics background and genotype factors was not found. The forms interesting for further research were obtained as a result of conduction the material through *in vitro* anther culture.

УДК 576:606:631.1

Бойко М. С., Моцный И. И., Шестопал О. Л.

АНДРОГЕНЕЗ *IN VITRO* У ЛИНИЙ И ПОПУЛЯЦИЙ ПШЕНИЦЫ МЯГКОЙ ОЗИМОЙ С РАЗНЫМИ СРОКАМИ СОЗРЕВАНИЯ

Сравнивали способность к андрогенезу *in vitro* трех сортов пшеницы мягкой озимой, их раннеспелых аналогов и гибридов соответствующих сортов и аналогов. Рассматривали влияние генотипа и генофона на способность к андрогенезу *in vitro*. На первом этапе работы наиболее высокий процент новообразований был получен для линий и гибридной популяции, созданных на генофоне сорта Степняк 1: 1,29; 1,72 и 1,90 %

для сорта, гибрида и аналога соответственно. С помощью двухфакторного дисперсионного анализа доказано, что генотипы аналогов сортов достоверно превышают сорта по показателю «индукция новообразований». Зависимости показателя «регенерация зеленых растений» от таких факторов, как генофон и генотип, не обнаружено. В результате проведения материала через культуру пыльников *in vitro* получены формы, интересные для дальнейшего исследования.