

СТВОРЕННЯ ВИХІДНОГО МАТЕРІАЛУ ПШЕНИЦІ М'ЯКОЇ ОЗИМОЇ ЗА ВИКОРИСТАННЯ КУЛЬТУРИ ЗРІЛИХ ЗАРОДКІВ

Л. О. РЯБОВОЛ, доктор сільськогосподарських наук

Я. С. РЯБОВОЛ, доктор сільськогосподарських наук

С. В. ФЕДОРЕНКО, здобувач третього (освітньо-наукового) рівня вищої освіти (доктор філософії)

М. В. ФЕСЬКО, здобувач третього (освітньо-наукового) рівня вищої освіти (доктор філософії)

Уманський національний університет садівництва

У статті наведено результати схожості гібридного насіння пшениці м'якої озимої за різних умов нього пророщування. Доведено, що для проростання деформованого, дрібного насіння ефективно використовувати культуру *in vitro*. Застосування культури зрілих зародків забезпечує підвищення схожості та отримання проростків у середньому за генотипами на рівні 62,8%. Схожість насіння істотно залежить від генотипу вихідних батьківських компонентів. Встановлено, що гібридне насіння отримане в комбінаціях схрещування яких за материнську форму використовували зразки з пшенично-житньою транслокацією 1AL/1RS мають істотно вищі показники схожості, аніж з транслокацією 1BL/1RS.

Ключові слова: пшениця м'яка озима, генотип, схожість насіння, вихідні батьківські компоненти, культура зрілих зародків, пшенично-житні транслокації 1AL/1RS і 1BL/1RS.

Постановка проблеми. Основним питанням селекції сільськогосподарських культур, зокрема пшениці м'якої озимої, є створення високопродуктивних сортів стійких до низки абіотичних і біотичних чинників. Розширення генетичного різноманіття вихідного матеріалу можливе за використання внутрішньо- та міжвидової гібридизації, що дає змогу отримати спектр матеріалів з новими господарсько-цінними маркерними ознаками [1, 2]. За різних комбінацій схрещування не можна отримати чітко запрограмований генотип, адже за рекомбіногенезу і взаємодії алельних і неалельних генів формується низка зразків, що істотно відрізняється від вихідних батьківських форм. Комбінаційна мінливість, що базується на перекомбінації генів при заплідненні, зумовлює появу матеріалу з новими ознаками і властивостями та отримання потомства з індивідуальними характеристиками.

Аналіз останніх досліджень та публікацій. Пшениця м'яка озима – самозапильна культура, тому проведення гібридизації, за схрещування генетично різних форм, супроводжується високим бар'єром несумісності та не зав'язування насіння. Постгамну несумісність, що виникає після запліднення і за

природою, може бути генетичною та фізіологічною, можна частково усунути за використання біотехнологічних методів, що передбачають виділення гібридного зародка і його дорощування в ізольованій культур [3–5]. Ембріокультура, що передбачає вирощування зрілих і незрілих зародків *in vitro*, стає одним з дієвих способів збереження і розширення генетичного потенціалу рослин, які за типового селекційного процесу не сформуються.

За гібридизації пшениці м'якої озимої, зазвичай, в колосі формується незначна кількість насіння. Отримані зерна не виповнені, деформовані, низькожиттєздатні. За пророщування вони мають низьку енергію проростання і схожість. У польових умовах таке насіння може не прорости за відсутності необхідних поживних речовин в ендоспермі чи стерильності [2, 6]. У тканинах такого насіння можуть спостерігатись мутаційні процеси, зокрема, збільшення кількості хромосомних аберацій. Окремі серйозні порушення, що спостерігаються в меристемі проростків зі зміненим хромосомним балансом, призводять до відмирання тканини [7, 8]. Клітини з незначними змінами хромосом, зокрема генетичними у формі рецесивних мутацій, можуть зберегтись проте порушення проявляються пізніше. Типове проходження мейозу за формування насіння є запорукою формування життєздатних гамет і нащадків без порушення спадковості.

Найефективнішим способом індукції розвитку гібридної рослини з насіння, отриманого за внутрішньо- чи міжвидової гібридизації, є дорощування, утвореного в гібридній зернівці зародка, який виділяється в конкретний термін після запилення та вводиться в культуру *in vitro*. Від періоду розвитку зародка на материнській рослині залежить рівень диференціації гібридного проростку, що визначає життєздатність матеріалу в умовах ізольованої культури. Результативність ембріокультури істотно залежить від умов зав'язування і формування гібридного зародку, періоду його розвитку та рівня його диференціювання [1, 2, 9].

Метою досліджень було вдосконалення технології збереження насіннєвого матеріалу отриманого за внутрішньовидової гібридизації для розширення генетичного різноманіття зразків пшениці м'якої озимої за використання в селекційній схемі культури зрілих зародків.

Методика досліджень. Дослідження проводили впродовж 2022–2024 років у навчально-науковій лабораторії біотехнології і на дослідних ділянках кафедри генетики, селекції рослин та біотехнології Уманського національного університету садівництва. Вихідним матеріалом для введення в культуру *in vitro* слугувало насіння пшениці м'якої озимої, отримане за внутрішньовидової гібридизації. У схемі діалельних схрещувань використовували сорти географічно віддалених форм, зокрема, Щедрість одеська, Золотоколоса, Фаворитка, Крижинка, Зорепад, Патрас, Матрікс, Дагмар, Фронтерас.

Перед введенням у ізольовану культуру експланти стерилізували 0,1 % розчином сулеми протягом 30 хв і тричі промивали стерильною дистильованою водою. Звільнене від грибово-бактеріальної інфекції насіння висаджували на модифіковане живильне середовище Мурасіге–Скуга та до отримання

проростків культивували за 16-ти годинного фотоперіоду з інтенсивністю освітлення 1–2 кЛк та відносною вологістю повітря 75 %. Проростки пересаджували на ростове середовище для клонування змінюючи фізичні параметри вирощування біоматеріалу, зокрема, інтенсивність освітлення 3 кЛк за температури 20–22°C.

Результати досліджень. У процесі досліджень встановлено, що за гібридизації пшениці м'якої озимої в переважній більшості комбінацій схрещування, у колосі утворюється незначна кількість насіння. За фенологією отримане насіння було дрібне, деформоване, не виповнене. Воно мало низьку енергію проростання та схожість. За аналізу цих параметрів у лабораторних умовах (за пророщування насіння в чашках Петрі у термостатах) вихід проростків сягав 54,5 %. За висіву насіння на ділянка апробації, де впливали умови навколишнього природного середовища, отримано незначну кількість рослин. У середньому за генотипами схожість насіння зафіксовано на рівні 42,7 % (табл. 1).

Табл. 1. Вплив умов вирощування на схожість насіння, отриманого за гібридизації рослин пшениці м'якої озимої *

Умови пророщування насіння	Схожість насіння	
	%	± до контролю, %
Польові (<i>контроль</i>)	42,7	–
Лабораторні (термостат)	54,5	+ 27,6
Культура <i>in vitro</i>	69,5	+ 62,8
<i>НІР</i> ₀₅	2,1	–

Примітка: *у середньому за генотипами

За пророщування насіння в ізолюваній культурі частка отриманих проростків істотно збільшувалась. Кількість схожого насіння сягала 69,5 %. Складові живильного середовища, замінивши зародку поживні речовини ендосперму, стимулювали проростання насіння та підвищили частку схожості гібридного, морфологічно неповноцінного насіння. У порівнянні з польовими дослідженнями схожість насіння за його проростання в ізолюваних умовах *in vitro* зросла на 62,8 %. Це можна пояснити тим, що генетичний потенціал матеріалу визначається внутрішньою структурою ДНК рослини й залежить від технологій селекції та/або біотехнології. Генетична експресія, як фізіологічний прояв генетичного потенціалу рослини, визначається тиском зовнішніх чинників. Комбінація генетичного потенціалу і генетичної експресії сприяє росту та розвитку рослин, покращенню якісних і кількісних характеристик біоматеріалу. Елемент живлення, якого рослина отримує найменше від норми, обмежує генетичну експресію. Разом з тим, відповідне поєднання компонентів живлення забезпечує послідовну і відповідну реакцію на них рослин під час росту і розвитку. Використання регуляторів росту в поєднанні з живильними речовинами та іншими ключовими чинниками в ізолюваній культурі дозволяє рослині вибирати і використовувати необхідний компонент [3–5, 10].

Першочерговим питанням залишається пошук способу ініціації клітин зародку до диференційованого поділу. Вибір базового живильного середовища та його модифікація істотно впливає на проходження фізіологічних процесів у клітинах експланту. Особливого підбору субстрату потребують зародки, що сформувались за штучного процесу примусової гібридизації. Індукція розвитку біоматеріалу досягається за створення оптимальних умов вирощування, що прирівнювалися б до природних. На розвиток зародку також впливає генотип та комбінація вихідних батьківських форм. Не залежно від умов проростання, істотно вищий відсоток схожості гібридного насіння фіксували за використання в комбінації схрещування материнською формою матеріалів, що мали в геномі пшенично-житньою транслокацією *1AL/1RS* (табл. 2).

Табл. 2. Вплив генотипу на схожість насіння зразків пшениці м'якої озимої за різних умов його пророщування

Комбінація схрещування	Номер зразка	Схожість насіння, %		
		Польові умови	Лабораторні умови (термостат)	Культура <i>in vitro</i>
Золотоколоса (<i>1AL/1RS</i>) × Дагмар	311-5	44,8	54,3	70,5
Золотоколоса (<i>1AL/1RS</i>) × Матрікс	320-2	47,3	58,9	75,1
Золотоколоса (<i>1AL/1RS</i>) × Патрас	352-1	48,5	59,4	77,4
Золотоколоса (<i>1AL/1RS</i>) × Самурай	381-3	45,3	56,6	74,4
Золотоколоса (<i>1AL/1RS</i>) × Фронтерас	394-4	43,1	53,8	72,2
<i>Середнє за материнською формою</i>	–	45,8	56,6	73,9
Щедрість одеська (<i>1AL/1RS</i>) × Дагмар	210-6	42,2	53,4	71,6
Щедрість одеська (<i>1AL/1RS</i>) × Матрікс	231-10	45,7	56,3	68,7
Щедрість одеська (<i>1AL/1RS</i>) × Патрас	265-18	47,8	57,9	75,9
Щедрість одеська (<i>1AL/1RS</i>) × Самурай	283-16	44,7	56,0	69,8
Щедрість одеська (<i>1AL/1RS</i>) × Фронтерас	291-1	40,6	52,2	73,4
<i>Середнє за материнською формою</i>	–	44,2	55,1	71,9
Крижинка (<i>1BL/1RS</i>) × Дагмар	54-6	37,7	50,4	62,4
Крижинка (<i>1BL/1RS</i>) × Матрікс	76-4	40,5	53,2	63,5
Крижинка (<i>1BL/1RS</i>) × Патрас	77-5	43,8	54,1	70,0
Крижинка (<i>1BL/1RS</i>) × Самурай	88-12	39,4	53,0	64,4
Крижинка (<i>1BL/1RS</i>) × Фронтерас	99-1	37,0	50,4	65,3
<i>Середнє за материнською формою</i>	–	39,7	52,2	65,1
Фаворитка (<i>1BL/1RS</i>) × Дагмар	400-11	39,4	50,6	65,3
Фаворитка (<i>1BL/1RS</i>) × Матрікс	401-4	43,1	54,6	65,2
Фаворитка (<i>1BL/1RS</i>) × Патрас	442-16	45,6	54,8	70,8
Фаворитка (<i>1BL/1RS</i>) × Самурай	473-12	41,5	53,1	68,9
Фаворитка (<i>1BL/1RS</i>) × Фронтерас	487-1	38,4	53,0	65,4
<i>Середнє за материнською формою</i>	–	41,6	53,2	67,1
<i>HIP 05</i>	–	1,3	1,2	1,5

Генотипи з транслокацією *1BL/1RS* формували насіння нищої схожості. За пророщування найвищу частку біоматеріалу отримано з гібридного насіння комбінації схрещування Золотоколоса (*1AL/1RS*) × Патрас. У польових умовах фіксували 48,5 % пророслого насіння, у термостаті, з контрольованими умовами температури та вологості, – 59,4 %, в культурі *in vitro*, на штучному живильному середовищі, – 77,4 %. Найнижчі покази спостерігали з насіння комбінації схрещування Крижинка (*1BL/1RS*) × Дагмар, відповідно, 37,7 %, 50,4 і 62,4 %. Схожість насіння істотно залежала не лише від добору материнського компонента, а й батьківського. Найвищий показник схожості мало насіння отримане в комбінаціях схрещування де використовували запилювачем рослини сорту Патрас.

Висновки. Доведено, що для проростання деформованого, дрібного, невиповненого насіння пшениці м'якої озимої, отриманого за внутрішньовидової гібридизації географічно віддалених форм, ефективно використовувати культуру *in vitro*. Застосування ізольованої культури зрілих зародків забезпечує підвищення схожості насіння та отримання проростків у середньому за генотипами на рівні 62,8 %.

Схожість насіння істотно залежить від генотипу вихідних батьківських компонентів. Встановлено, що гібридне насіння отримане в комбінаціях схрещування яких за материнську форму використовували зразки з пшенично-житньою транслокацією *1AL/1RS* мають істотно вищі показники схожості, аніж з транслокацією *1BL/1RS*.

Література:

1. Рябовол Я. С., Рябовол Л. О. Використання культури зрілих зародків для розмноження цінних зразків жита озимого. Матеріали VI науково-практичної конференції з міжнародною участю *Біотехнологія: звернення та надії*. Київ, 2017. С. 81–82.
2. Шестопал О. Л., Ігнатова С. О., Замбріборщ І. С. Методи культури *in vitro* для сучасної селекції пшениці м'якої (*Triticum aestivum* L.) та ячменю (*Hordeum vulgare* L.). *Збірник наукових праць Селекційно-генетичного інституту*. 2015. С. 145–151.
3. Дубровна О. В., Моргун Б. В., Бавол А. В. Біотехнології пшениці: клітинна селекція та генетична інженерія. К.: Логос, 2014. 375 с.
4. 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. № 4 (1). С. 52–57.
5. Mokhtari A., Alizadeh H., Samadi B. Y., Omidi M., Otroshy M., Moeini Z. Effect of plant growth regulator on direct shoot regeneration of wheat immature embryonic explants. *Eng. Biotech.* 2013. V. 1(3). P. 77–80.
6. Рябовол Я. С., Рябовол Л. О., Кертон М., Урадник О. І. Використання ембріокультури за гібридизації пшениці м'якої озимої. Матеріали X Міжнародної наукової конференції «Селекційно-генетична наука і освіта» (Парієві читання). (19 березня 2021). Умань: ВПЦ «Візаві». 2021. С. 212–214.

7. Barro F., Martin A., Lazzeri P. A. and Barcelo P. Medium optimization for efficient somatic embryogenesis and plant regeneration from immature inflorescences and immature scutella of elite cultivars of wheat, barley and tritordeum. *Euphytica*. 1999. 108. C. 161–167.
8. Kigel Ed. Jaime, Dalili Gad Seed development and germination. New York, 1995. P. 232–262.
9. Anders S., Cowling W., Pareek A., Gupta K. J., Singla-Pareek S. L., Foyer C. H. Gaining Acceptance of Novel Plant Breeding Technologies. *Trends in Plant Science*. 2021. V. 26(6). P. 575–587.
10. Zheng M. Y., Weng Y., Liu W., Konzak F. The effect of ovary conditioned medium on microspore embryogenesis in common wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Cell Reports*. 2002. № 20. C. 802–807.

References:

1. Riabovol, I. S., Riabovol, L. O. (2017). Use of culture of mature embryos for propagation of valuable samples of winter rye. Materials of the VI Scientific and Practical Conference with International Participation Biotechnology: Achievements and Hopes. Kyiv. P. 81–82. [in Ukrainian].
2. Shestopal, O. L., Ignatova, S. O., Zambriborshch, I. S. (2015). In vitro culture methods for modern selection of common wheat (*Triticum aestivum* L.) and barley (*Hordeum vulgare* L.). Collection of scientific works of the Breeding and Genetics Institute. P. 145–151. [in Ukrainian].
3. Dubrovna, O. V., Morgun, B. V., Bovol, A. V. (2014). Wheat biotechnology: cell selection and genetic engineering. K.: Logos. 375 p. [in Ukrainian].
4. Lobanova, K. I., Zhosonar, M. V., Ignatova, S. O. (2006). Ways of realization of regeneration potential in the culture of anthers in different genotypes of winter soft wheat. *Bulletin of the Ukrainian Society of Geneticists and Breeders*, no. 4 (1), pp. 52–57. [in Ukrainian].
5. Mokhtari, A., Alizadeh, H., Samadi, B. Y., Omid, M., Otrshy, M., Moeini, Z. (2013). Effect of plant growth regulators on direct shoot regeneration of wheat immature embryonic explants. *Eng. Biotech.* V. 1(3). P. 77–80.
6. Riabovol, I. S., Riabovol, L. O., Kerton, M., Uradnyk, O. I. (2021). Use of embryo culture for hybridization of soft winter wheat. Proceedings of the 10th International Scientific Conference "Selection and Genetic Science and Education" (Pariah readings). (March 19, 2021). Uman: VOC "Vizavi". Pp. 212–214. [in Ukrainian].
7. Barro, F., Martin, A., Lazzeri, P. A. and Barcelo, P. (1999). Medium optimization for efficient somatic embryogenesis and plant regeneration from immature inflorescences and immature scutella of elite cultivars of wheat, barley and tritordeum. *Euphytica*, no. 108, pp. 161–167.
8. Kigel, Ed. Jaime, Dalily, Gad (1995). Seed development and germination. New York. P. 232–262.
9. Anders, S., Cowling, W., Pareek, A., Gupta, K. J., Singla-Pareek, S. L., Foyer, C. H. (2021). Gaining Acceptance of Novel Plant Breeding Technologies. *Trends in Plant Science*, v. 26(6), pp. 575–587.
10. Zheng, M. Y., Weng, Y., Liu, W., Konzak, F. (2002). The effect of ovary conditioned medium on microspore embryogenesis in common wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Cell Reports*, no. 20, pp. 802–807.

Annotation

Riabovol L. O., Riabovol I. S., Fedorenko S. V., Fesko M. V.

Creation of raw material of soft winter wheat using the culture of mature embryos

Soft winter wheat is a self-pollinated crop, so its hybridization is accompanied by high barriers of incompatibility and non-settling of seeds. Postgamous incompatibility, which occurs after fertilization and by nature, can be genetic and physiological, can be partially eliminated by the use of biotechnological methods involving the cultivation of a hybrid embryo in isolated cultures. During the hybridization of soft winter wheat, a small amount of seeds is usually formed in the ear. The obtained grains are incomplete, deformed, low viability. During germination, they have low germination energy and germination. In the field, such seeds may not germinate in the absence of necessary nutrients in the endosperm or sterility.

The purpose of the research was to improve the technology of preservation of seed material obtained by intraspecific hybridization for the expansion of the genetic diversity of soft winter wheat samples for use in the selection scheme of isolated embryo culture.

The research was conducted during 2022–2024 in the educational and scientific laboratory of biotechnology and at the experimental sites of the Department of Genetics, Plant Breeding and Biotechnology of the Uman National University of Horticulture. In the scheme of diallel crossings, the varieties Shchedrist Odeska, Zolotokolosa, Favoritka, Kryzhinka, Zorepad, Patras, Matrix, Dagmar, Fronteras were used. In the course of research, it was found that during the hybridization of soft winter wheat in the vast majority of crossing combinations, an insignificant amount of seeds is formed in the ear.

It has been confirmed that for the germination of deformed, small seeds obtained by intraspecific hybridization of geographically distant forms, it is effective to use in vitro culture. The use of an isolated culture of mature embryos ensures an increase in seed germination and the production of seedlings on average by genotypes at the level of 62.8 %. The similarity of the seeds depends significantly on the genotype of the original parental components. It was established that the hybrid seeds obtained in combinations of crossings in which samples with the wheat-rye translocation 1AL/1RS were used as the mother form have significantly higher germination rates than those with the 1BL/1RS translocation.

Key words: *soft winter wheat, genotype, seed germination, initial parental components, culture of mature embryos, wheat-rye translocations 1AL/1RS and 1BL/1RS.*