

ОТРИМАННЯ ВИХІДНОГО МАТЕРІАЛУ ПШЕНИЦІ М'ЯКОЇ ОЗИМОЇ ЗА ВИКОРИСТАННЯ КУЛЬТУРИ НЕЗРІЛИХ ЗАРОДКІВ

Л. О. РЯБОВОЛ, доктор сільськогосподарських наук

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

Уманський національний університет

*Наведено результати отримання вихідного матеріалу пшениці м'якої озимої за використання в селекційній схемі внутрішньовидової гібридизації зразків з пшенично-житніми транслокаціями і культури незрілих зародків. Показано, що для підвищення частки життєздатного гібридного матеріалу та подолання постгамної несумісності ефективно використовувати ізольовану культуру. Встановлено, що вихід макроструктур з незрілих зародків залежить від генотипу вихідного матеріалу та віку ізольованих зародків, введених у культуру *in vitro*. Найвищий вихід проростків (35,5–70,4 %) отримано з дванадцятидобових зародків за обробки зав'язі розчином гіберелінової кислоти.*

Ключові слова: пшениця м'яка озима, генотип, культура *in vitro*, незрілі зародки, проростки, калюс, пшенично-житні транслокації 1AL/1RS і 1BL/1RS.

Постановка проблеми. Вдалий добір вихідного матеріалу в селекційному процесі є запорукою створення високопродуктивних сортів та гібридів сільськогосподарських культур. Розширити генетичне різноманіття вихідних форм, отримавши зразки з новими ознаками, можна за використання внутрішнь- та міжвидової гібридизації [1–3]. За рекомбіногенезу різних геномів отримують строкату популяцію генотипів, які формуються за взаємодії алельних і неалельних генів і різняться низкою ознак. Поєднання генетичної інформації вихідних батьківських форм при злитті гамет дає змогу створити матеріал з новими індивідуальними характеристиками, що контролюються генами ядра і плазмогенами. Від сумісності геномів залежить здатність зав'язування насіння, його життєздатність і в цілому насіннева продуктивність рослини.

Аналіз основних досліджень і публікацій. Пшениця м'яка озима – самозапильна культура. Проведення її гібридизації, особливо віддаленої, супроводжується високими бар'єрами несумісності та низьким відсотком зав'язування насіння. Подолати несумісність, зокрема постгамну, що виникає після запліднення, можливо за використання біотехнологічних методів. Культура незрілих зародків передбачає виділення гібридного незрілого зародка з суцвіття, ведення його в ізольовану культуру і культивуванням в умовах *in vitro* до формування необхідної кількості рослинного матеріалу [2, 3–7]. Ембріокультура є дієвим способом збереження і розширення генетичного різноманіття за внутрішньовидової і міжвидової гібридизації злакових культур, зокрема, пшениці м'якої озимої [8–10]. Спосіб базується на дорощуванні,

утвореного в гібридній зернівці зародка, що вичленовується у визначений термін після кастрації і запилення квіток суцвіття та вводиться в ізолювану культуру.

Технологія отримання селекційного матеріалу за використання культури незрілих зародків передбачає проведення окремих послідовних етапів роботи:

- обґрунтування програми досліджень, визначення методу отримання нового вихідного матеріалу і програмованих ознак сформованих генотипів;
- добір вихідних батьківських компонентів для гібридизації;
- проведення ізоляції, кастрації і запилення в оптиманий період онтогенетичного розвитку рослинного матеріалу;
- підбір і створення комплексу фізикохімічних умов для введення та культивування тканин в ізолюваній культурі;
- виділення незрілих гібридних зародків і введення їх в культуру *in vitro*;
- активація розвитку експланту та формування проростку в ізолюваній культурі;
- розмноження рослинного матеріалу, укорінення, адаптація і переведення в природні умови вирощування;
- ідентифікація матеріалу морфобіологічна, цитологічна, біохімічна тощо;
- отримання насіннєвого матеріалу та аналіз маркерних ознак нащадків першого–третього покоління;
- жорсткий добір створеного селекційного гібридного матеріалу за низкою цінних господарських ознак.

Результативність технології ембріокультури істотно залежить від добору вихідних компонентів гібридизації, їх біологічної сумісності, умов запилення, зав'язування і формування гібридною зародку, періоду його розвитку та рівня диференціювання до виокремлення і введення в ізолювану культуру, адже від періоду розвитку зародка на материнській рослині залежить життєздатність матеріалу в умовах культури *in vitro* [1, 11, 12]. За використання цієї технології залишається низка проблемних питання, що є актуальними та потребують вирішення, адже кожен генотип індивідуально реагує на штучні умови вирощування, зокрема, оптимальний вік розвитку зародка за введення в ізолювану культуру, склад живильного середовища для активації морфогенезу і культивування незрілих зародків, вплив регуляторів росту на процеси органогенезу і диференціації клітин тощо.

Метою досліджень було вдосконалення технології отримання генетичного різноманіття зразків пшениці м'якої озимої за використання в селекційній схемі біотехнологічної ланки. Основним питанням поставленим на вирішення було визначення реакції селекційного матеріалу отриманого за використання зразків з пшенично-житніми транслокаціями на активацію розвитку незрілих зародків і формування макроструктур в культурі *in vitro*.

Методика досліджень. Дослідження проводили впродовж 2023–2025 років у навчально-науковій лабораторії біотехнології і дослідних ділянках кафедри генетики, селекції рослин та біотехнології Уманського національного університету. У схемі внутрішньовидової гібридизації використовували сорти географічно віддалених форм, зокрема, Щедрість одеська, Золотоколоса,

Фаворитка, Фрея, Патрас, Дагмар. Вихідним експлантом для введення в культуру *in vitro* слугували незрілі гібридні зародки пшениці м'якої озимої, виділені із суцвіття на 12–16 добу після запилення кастрованих квіток під органопластиковими ізоляторами. Для підвищення інтенсивності формування і розвитку зародка кастровані суцвіття на третю добу обробляли розчином гіберелінової кислоти за концентрації 30 мг/л. Перед введенням в ізольовану культуру *in vitro* експланти стерилізували 0,1 % розчином сулеми протягом 20 хв і п'ять разів промивали стерильною дистильованою водою за експозиції 15 хв (двічі), 10 хв (двічі) і 5 хв. Незрілі зародки висаджували на модифіковане живильне середовище Мурасіге–Скуга та до отримання проростків культивували за температури 22–25 °С в темнових термостатах. Отримані проростки пересаджували на ростове середовище для клонування. Вирощували біоматеріал за 16-ти годинного фотоперіоду з інтенсивністю освітлення 3–4 кЛк, температури 20–22 °С і відносній вологості повітря 75 %.

Результати досліджень. У процесі досліджень встановлено, що вихід макроструктур з незрілих зародків залежить від генотипу вихідного матеріалу, віку незрілих зародків введених в ізольовану культуру і обробки суцвіття розчином гіберелінової кислоти (табл.). Найвищий рівень формування макроструктур отримано за культивування незрілих зародків виділених з комбінації схрещування Щедрість одеська (1AL/1RS) × Патрас (66,1–84,1 %), а найнижчий – з комбінації Фрея (1BL/1RS) × Дагмар (24,2–36,6 %). За вичленування насінневих зачатків на 12 і 16 добу після запилення, кількість отриманих проростків з експлантів переважної більшості комбінацій схрещування перевищувало показник зав'язування насіння в природних умовах вирощування. З'ясовано, що 87,5 % апробованих матеріалів формувало вищий відсоток проростків за використання біотехнологічної ланки в селекційних схемах гібридизації, аніж зав'язувало насіння в умовах природного навколишнього середовища. Найвищий відсоток проростків (35,5–70,4 %) і калюсної біомаси (0,6–15,7 %) незалежно від генотипу формувався з незрілих зародків виділених з оброблених гібереліновою кислотою суцвіть на дванадцять добу після запилення кастрованих квіток (рис.).

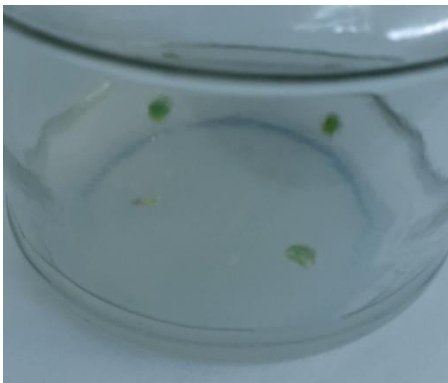


Рис. Дванадцятидобові незрілі зародки пшениці м'якої озимої, отримані за гібридизації Щедрість одеська (1AL/1RS) × Патрас, і введені на живильне середовище в культуру *in vitro*.

Дещо нижчі показники отримано за культивування чотирнадцятидобових зародків, зокрема, проростки – 32,2–69,2 %, калюс – 0,4–13,8 %. За культивування експлантів виділених на шістнадцять добу після запилення

істотно на 15,3 % знижувалась частка сформованих макроструктур.

Табл. Вплив віку незрілих зародків та обробки зав'язі регулятором росту на вихід макроструктур пшениці м'якої озимої в культурі *in vitro*

Комбінація схрещування	Рівень зав'язування насіння, %	Вік незрілих зародків ¹ , діб	Сформовані макроструктури з незрілих зародків, %			
			без обробки зав'язі ГК ²		з обробкою зав'язі ГК ²	
			проростки	калюс	проростки	калюс
Золотоколоса (1AL/1RS) × Дагмар	48,7	12	51,8±1,5	8,7±1,4	52,5±0,9	10,2±1,1
		14	50,0±1,4	7,3±1,3	52,9±1,0	8,4±1,3
		16	48,4±1,1	4,4±1,1	49,6±1,8	5,9±1,4
Золотоколоса (1AL/1RS) × Патрас	53,5	12	55,7±1,0	7,7±1,0	57,5±0,6	13,7±1,2
		14	55,3±1,2	8,3±1,2	58,7±1,0	11,8±1,1
		16	53,9±0,4	6,5±1,2	54,6±1,3	8,8±1,4
Щедрість одеська (1AL/1RS) × Дагмар	58,2	12	62,5±0,6	13,7±2,2	64,5±0,6	15,7±1,2
		14	61,7±1,0	11,8±1,1	63,2±1,0	13,8±1,1
		16	58,9±1,3	8,8±1,4	60,6±1,2	12,8±1,4
Щедрість одеська (1AL/1RS) × Патрас	55,5	12	64,5±0,6	10,7±1,3	70,4±0,8	13,7±1,3
		14	63,2±1,0	9,8±1,1	69,2±1,1	13,2±0,9
		16	57,6±0,9	8,5±1,2	60,4±0,9	10,8±1,1
Фаворитка (1BL/1RS) × Дагмар	43,3	12	46,8±0,9	1,7±0,4	46,5±1,1	1,2±0,3
		14	45,0±1,2	1,3±0,3	45,2±0,6	1,0±0,4
		16	44,4±1,0	0,8±0,5	44,6±0,8	0,9±0,2
Фаворитка (1BL/1RS) × Патрас	48,7	12	49,8±0,5	3,6±0,5	51,5±1,2	4,2±0,8
		14	48,5±0,9	2,2±0,4	49,7±0,8	3,0±0,5
		16	47,3±1,0	1,5±0,3	48,6±0,7	1,9±0,5
Фрея (1BL/1RS) × Дагмар	46,6	12	35,5±0,8	0,6±0,3	35,9±1,4	0,7±0,2
		14	32,0±0,5	0,3±0,1	32,2±0,9	0,4±0,1
		16	24,4±1,0	0,0±0,0	25,0±0,6	0,0±0,0
Фрея (1BL/1RS) × Патрас	51,3	12	52,3±0,6	2,4±0,4	53,5±1,1	2,8±0,9
		14	51,5±0,5	1,2±0,3	51,7±0,5	2,0±0,4
		16	50,3±1,0	1,2±0,3	50,6±0,7	1,5±0,2
<i>HIP</i> ₀₁	—	—	—	1,0	0,9	1,1

Примітка. ¹Кількість діб після запилення. ² Гіберелінова кислота 30 мг/л.

Доведено, що за обробки кастрованого суцвіття розчином гіберелінової кислоти в окремих генотипів істотно (до 6 %) підвищувався вихід проростків, порівняно з варіантами без впливу рістрегулюючої речовини. Це пов'язано з морфофізіологічними процесами, що відбуваються за формування проростків. Ендогенні гібереліни стимулюють синтез гідролітичних ферментів, що

розчиняють полісахариди до простих цукрів, які йдуть на ріст і розвиток зародку. Екзогенний вплив гіберелінової кислоти на кастроване суцвіття стимулює процеси формування зародку, тому за його впливу отримують вищий відсоток зав'язування насіння на ділянках гібридизації, та, відповідно, розвиток макроструктур з незрілих зародків у ізолюваній культурі.

Встановлено, що експланти виділені із зразків носіїв пшенично-житньої транслокації *1AL/1RS* формували істотно вищий відсоток макроструктур, аніж з транслокацією *1BL/1RS*. З'ясовано, що незрілі зародки отримані в комбінації схрещування Фрея (*1BL/1RS*) × Дагмар мали найнижчу регенераційну здатність за формування макроструктур. Окрім того, матеріали з транслокацією *1BL/1RS* характеризувались низьким рівнем індукції калюсної біомаси. В середньому за генотипами лише 0,4–4,2 % експлантів формували калюс. Інтенсивність розвитку отриманих в ізолюваній культурі макроструктур залежала від генотипу вихідного матеріалу та складу модифікованого живильного середовища.

Висновки. Підтверджено, що для подолання постгамної несумісності за створення гібридних форм пшениці м'якої озимої, доцільно використовувати ембріокультуру. Встановлено, що вихід макроструктур з незрілих зародків залежить від генотипу вихідного матеріалу та віку ізолюваних зародків, введених у культуру *in vitro*. Найвищий вихід проростків (35,5–70,4 %) і калюсної біомаси (0,6–15,7 %) отримано з дванадцятидобових зародків за обробки зав'язі розчином гіберелінової кислоти (30 мг/л). Доведено, що експланти виділені із зразків носіїв пшенично-житньої транслокації *1AL/1RS* формують істотно вищий відсоток макроструктур, аніж з транслокацією *1BL/1RS*.

Література:

1. Дубровна О. В., Моргун Б. В., Бавол А. В. Біотехнології пшениці: клітинна селекція та генетична інженерія. Київ: Логос, 2014. 375 с.
2. 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.
3. Рябовол Я. С., Рябовол Л. О. Залежність показника зав'язування насіння пшениці м'якої озимої від періоду запилення. Матеріали Міжнародної науково-практичної конференції. *Стан і перспективи розробки та впровадження ресурсоощадних, енергозберігаючих технологій вирощування сільськогосподарських культур*. Дніпро, 2016. С. 162–164.
4. Волощук С. І. Індукований андрогенез у селекції тритикале озимого. *Вісник аграрної науки*. 2014. № 3. С. 36–40.
5. Моргун В. В., Дубровна О. В., Моргун Б. В. Сучасні біотехнології отримання стійких до стресів рослин пшениці. *Фізіологія рослин і генетика*. 2016. Т. 48. № 3. С. 196–214.
6. Шестопад 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.

7. 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: звершення та надії*. Київ, 2017. С. 81–82.
8. Дубровна О. В., Моргун Б. В. Клітинна селекція пшениці на стійкість до стресових чинників довкілля. *Фізіологія і біохімія культурних рослин*. 2009. Т. 41. № 6. С. 463–475.
9. 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, 2021. С. 212–214.
10. Zheng M. Y., Weng Y., Liu W. and Konzak F. The effect of ovary conditioned medium on microspore embryogenesis in common wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Cell Reports*. 2002. № 20. С. 802–807.
11. Бавол А. В., Дубровна О. В., Лялько І. І. Регенерація рослин із експлантів верхівки пагона проростків пшениці. *Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів*. 2007. Т. 5. № 1/2. С. 3–10.
12. Cushman J. C., Bohnert H. J. Genomic approaches to plant stress tolerance. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2000. № 3. Р. 117–124.

References:

1. Dubrovna, O. V., Morgun, B. V., Baval, A. V. (2014). *Biotechnology of wheat: Cell breeding and genetic engineering*. Kyiv: Logos. 375 p. [in Ukrainian].
2. Lobanova, K. I., Josonar, M. V., Ignatova, S. O. (2006). Ways to realize the regenerative potential in the culture of anthers in different genotypes of winter soft wheat. *Bulletin of the Ukrainian Society of Genetics and Breeders*, no. 4(1), pp. 52–57. [in Ukrainian].
3. Riabovol, Ia. S., Riabovol, L. O. (2016). Dependence of pollination index of soft winter wheat seeds on the pollination period. In *The State and Prospects for the Development and Introduction of Resource-Saving, Energy-Efficient Technologies for Cultivation of Crops: International Scientific and Practical Conference Proceedings* (pp. 162–164). Dnipro. [in Ukrainian].
4. Voloshchuk, S. I. (2014). Induced androgenesis in breeding of winter triticale. *Bulletin of Agrarian Science*, no. 3, pp. 36–40. [in Ukrainian].
5. Morgun, V. V., Dubrovna, O. V., Morgun, B. V. (2016). Modern biotechnologies of producing wheat plants resistant to stress. *Fiziolohiia i biokhimiia kulturnykh roslyn – Physiology and Biochemistry of Cultivated Plants*, no. 48(3), pp. 196–214. [in Ukrainian].
6. Shestopal, O. L., Ignatova, S. O., Zambiborshch, I. S. (2015). In vitro culture methods for modern breeding of soft wheat (*Triticum aestivum* L.) and barley (*Hordeum vulgare* L.). *Collection of Scientific Works of the Breeding and Genetic Institute*, no. 25, pp. 145–151. [in Ukrainian].
7. Riabovol, Ia. S., Riabovol, L. O. (2017). Use of mature embryo culture for reproduction of valuable winter rye samples. In *Biotechnology: Accomplishment and Hope: Materials of the VI Scientific and Practical Conference with International Participation* (pp. 81–82). Kyiv. [in Ukrainian].

8. Dubrovna, O. V., Morgun, B. V. (2009). Cell breeding of wheat for resistance to stress factors. *Physiology and Biochemistry of Cultivated Plants*, no. 41(6), pp. 463–475. [in Ukrainian].
9. Riabovol, Ia. S., Riabovol, L. O., Kerton, M., & Uradnik, O. I. (2021). Use of embryo culture for hybridization of soft winter wheat. In *Breeding and Genetic Science and Education (Parium Readings): Proceedings of the X International Scientific Conference (March 19, 2021)* (pp. 212–214). Uman. [in Ukrainian].
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.
11. Bovol, A. V., Dubrovna, O. V., Lial'ko, I. I. (2007). Regeneration of plants from explants of wheat seedling shoot apex. *Bulletin of the Ukrainian Society of Genetics and Breeders*, no. 5(1–2), pp. 3–10. [in Ukrainian].
12. Cushman, J. C., Bohnert, H. J. (2000). Genomic approaches to plant stress tolerance. *Current Opinion in Plant Biology*, no. 3, pp. 117–124.

Annotation

Riabovol L. O., Fesko M. V.

Obtaining the source material of a soft winter wheat for the use of immature embryos culture

Embryoculture is an effective way of preserving and expanding genetic diversity under intraspecific and interspecific hybridization of cereals, in particular, soft winter wheat. The effectiveness of the technology of embryoculture depends significantly on the selection of the original components of hybridization, their biological compatibility, the conditions of pollination, tying and formation of hybrid embryo, the period of its development and the level of differentiation to the separation and introduction into isolated culture, because the period of development of the embryo in the material.

The purpose of the research was to improve the technology of obtaining genetic variety of samples of soft winter wheat for use biotechnological link in the breeding scheme. The research was conducted during 2023–2025 in the educational and scientific laboratory of biotechnology and experimental areas of the department of genetics, plant breeding and biotechnology of Uman National University. The research process that it is advisable to use embryoculture to overcome post-grade incompatibility for creating hybrid soft winter wheat has confirmed. The exit of macro structures from immature embryos depends on the genotype of the source material and the age of isolated embryos introduced in the in vitro culture is established. The highest yield of seedlings (35,5–70,4 %) and callus biomass (0,6–15,7 %) from twelve-day embryos for treatment with a solution of gibberellic acid was obtained. It is established, that explants, that have been identified from the samples of wheat-rye translocations of 1AL/1RS form a significantly higher percentage of macrostructures than with translocation of 1BL/1RS. The intensity of development of the macrostructures which is obtained in an isolated culture depended on the genotype of the source material and the composition of the modified nutrient medium.

Key words: soft winter wheat, genotype, culture in vitro, immature embryos, seedlings, kalus, wheat-rye translocations 1AL/1RS and 1BL/1RS.