

ШЕСТОПАЛ О. Л., ЗАМБРІБОРЩ І. С.[✉], АФІНОГЕНОВ О. А., ЧЕКАЛОВА М. С.,
ВАСИЛЬСВ О. А., ТРАСКОВЕЦЬКА В.А., САУЛЯК Н.І.

Селекційно-генетичний інститут – Національний центр насіннєзнавства та сортівивчення,
Україна, 65036, м. Одеса, Овідіопольська дорога, 3, ORCID: 0000-0002-2987-9712, 0000-0003-2430-
3690, 0009-0000-9392-0233, 0000-0001-7505-8459

[✉] izambriborsh@gmail.com, 0679224802

ВПЛИВ ДЖЕРЕЛА ЗАЛІЗА В ІНДУКЦІЙНОМУ СЕРЕДОВИЩІ НА ГАПЛОПРОДУКЦІЙНУ ЗДАТНІСТЬ ПШЕНИЦІ М'ЯКОЇ В КУЛЬТУРІ ПИЛЯКІВ *IN VITRO*

Мета. Вивчення ефективності андрогенезу *in vitro* пшениці м'якої за використання різних джерел заліза в індукційному середовищі для культивування пиляків. **Методи.** Культура *in vitro* ізольованих пиляків. Визначали: відсоток калюсів, що сформувалися, та відсоток зелених рослин від висаджених пиляків; відсоток акліматизованих рослин від зелених регенерантів; відсоток фертильних рослин від акліматизованих рослин та від висаджених пиляків. **Результати.** Вивчено андрогенез *in vitro* в культурі пиляків 11 генотипів пшениці м'якої озимої. Частота індукції калюсу: від 0,65 до 18,46 %, у середньому 6,68% – на середовищі з ферріленом та від 0,53 до 35,58 %, у середньому 10,85 % – на середовищі з Fe-хелат. Здатність до регенерації зелених рослин: від 0 до 4,03 %, у середньому 6,68 % – на середовищі з ферріленом та від 0 до 4,11 %, у середньому 10,85 % – на середовищі з Fe-хелат. Отримано 35 дигаплоїдних ліній в культурі пиляків восьми генотипів. Спонтанна диплоїдизація у середньому 30,7 %. **Висновки.** Виявлені генотипоспецифічні морфогенетичні реакції мікроспор пшениці м'якої озимої у процесі андрогенезу *in vitro*. Показано, що більш ефективним для отримання дигаплоїдів шляхом за андрогенезу *in vitro* є використання Fe-хелат ($\text{Na}_2\text{EDTA} + \text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) як джерела заліза в індукційному живильному середовищі.

Ключові слова: дигаплоїди, пшениця, андрогенез, калюс, регенерація.

Метод культивування пиляків є результативним і широко використовуваним підходом, що забезпечує швидке отримання стабільного, генетично однорідного селекційного матеріалу. Андрогенез *in vitro* є одним із найпродуктивніших біотехнологічних способів створення подвоєних гаплоїдів у сільському господарстві, що дозволяє за короткий період без значного використання посівних площ розробляти нові форми

пшениці, стійкі до різноманітних несприятливих умов [1–6]. Успіх селекційної діяльності значною мірою залежить від доступності вихідного матеріалу, спектр якого можна розширити завдяки застосуванню біотехнологічних підходів [7–11]. Ефективність методу культивування пиляків визначається здатністю отримувати велику кількість ембріоноподібних структур, зелених рослин і, згодом, фертильних ліній подвоєних гаплоїдів. Проте низька андрогенетична здатність багатьох генотипів залишається суттєвим обмеженням, що ускладнює широке впровадження цього методу в селекцію пшениці. Таким чином, удосконалення сучасних біотехнологічних методів для створення гомозиготних ліній озимої пшениці є перспективним напрямом досліджень, що має як теоретичну, так і практичну значущість.

Залізо є одним із ключових компонентів живильних середовищ, оскільки відіграє важливу роль в окисно-відновних процесах, що відбуваються у хлоропластах, мітохондріях і пероксисомах. Воно входить до складу амінолевулінової кислоти та протопорфіриногену, які є попередниками хлорофілу. Крім того, залізо є складовою частиною ферредоксину – білка, що забезпечує перенесення електронів під час фотосинтезу. Сучасні живильні середовища в основному містять залізо у вигляді хелату з етилендіамінтетраацетатом (ЕДТА). Сьогодні на ринку також є багато комерційних препаратів, що містять залізовмісні хелатні комплекси. Метою дослідження було визначити вплив різних джерел заліза в індукційному живильному середовищі на проходження окремих етапів андрогенезу *in vitro*.

Матеріали і методи

Дослідний матеріал відбирали з польових ділянок відділу фітопатології та ентомології СГП-НЦНС. В роботу залучили 11 селекційних

© ШЕСТОПАЛ О. Л., ЗАМБРІБОРЩ І. С., АФІНОГЕНОВ О. А., ЧЕКАЛОВА М. С.,
ВАСИЛЬСВ О. А., ТРАСКОВЕЦЬКА В.А., САУЛЯК Н.І.

зразків, серед яких п'ять гібридів F_1 і шість популяцій F_{4-6} . Відібраний матеріал мав різне походження та відзначався стійкістю до бурої та стеблової іржі. Пагони з пиляками зрізали з донорних рослин, коли мікроспори знаходились на вакуолізованій фазі розвитку (від ранньої до пізньої вакуолізації).

Для отримання подвоєних гаплоїдів (DH) пшениці використовували метод культури *in vitro* ізольованих пиляків. Зрізане колосся пшениці з пиляками на стадії сильно вакуолізованої мікроспори попередньої піддавали трип'яти добової холодової обробки (+2...4 °C) у водному розчині абсцизової кислоти (АБК) з концентрацією 0,5 мг/л. Після чого пилякі асептично виділяли в умовах ламінар-боксу та висаджували на індукційне живильне середовище 190-2 у двох модифікаціях, які відрізнялися джерелом заліза:

- I варіант – Fe-хелат ($\text{Na}_2\text{EDTA} + \text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) [4];
- II варіант – комерційний препарат «Ferrilene» (склад: Залізо (Fe) EDDHA (у формі ORTO-ORTO) – 4,8 та Залізо (Fe) EDDHA – 6).

Подальше культивування проводили у темряві при температурі +30 °C протягом трьох діб, після чого переносили в термостат за температури +24 °C до моменту формування калюсу на поверхні пиляків.

Сформовані макроструктури переносили на модифіковане середовище MS [2] і культивували у темряві протягом 10–14 діб. Після цього їх пересаджували на живильне середовище MS, доповнене 0,5 мг/л гібберелової кислоти (ГК) та 25 мг/л яблуневої кислоти. Перші 3–5 діб культури утримували в термостаті, а надалі – 2–3 тижні за умов освітлення до появи центрів регенерації. Культивування здійснювали за 16-годинного фотоперіоду, освітленості 5 тис. люкс і температури +24 °C до моменту формування рослин. Далі їх переносили на безгормональне середовище MS з половинною концентрацією макро- та мікроелементів.

Відсоток калюсів і зелених рослин-регенератів для кожного генотипу визначали відносно загальної кількості висаджених пиляків. Після етапу адаптації до ґрунтових умов регенеранти подвоєних гаплоїдів пшениці піддавали яровизації та подальшому дорощуванню в умовах штучного клімату. Оцінювали частку рослин, що вижили після етапів адаптації та яровизації, відносно загальної кількості зелених регенератів, а також відсоток фертильних рослин серед тих, що виколосилися.

Аналіз отриманих даних здійснювали за допомогою статистичних методів [11], використовуючи пакет програм Excel.

Результати та обговорення

Ефективність гаплопродукції в культурі пиляків озимої м'якої пшениці значно варіює залежно від генотипу та багатьох інших чинників, що ускладнює прогнозування результатів роботи з різним селекційним матеріалом. Це спонукає дослідників шукати шляхи підвищення морфогенетичної компетентності в умовах *in vitro*. Одним із ключових факторів, що визначає рівень прояву морфогенетичних процесів під час культивування пиляків, зокрема частоту утворення нових структур (калюсу) та подальшу регенерацію рослин, є індукційне живильне середовище [1, 6, 9].

Проводили вивчення морфогенетичного та гаплопродукційного потенціалу пшениці м'якої озимої в культурі пиляків *in vitro* за використання різних джерел заліза в живильному середовищі. Використовували в дослідженні два джерела заліза: хелатний комплекс Fe-хелат (10 мг/л), який є стандартним для багатьох дослідницьких живильних середовищ, та комерційний препарат «Ferrilene» (70 мг/л), який останні 7 років [2, 4, 10, 12] застосовується у лабораторії у якості джерела заліза для живильних середовищ для клонального розмноження. Ferrilene – це сучасний препарат хелата заліза, що зберігає свою стабільність всіх значень pH який використовується у промисловості як міндобриво (джерело заліза) при вирощуванні розсади. Порівнювали показники гаплопродукції 11 генотипів (рис. 1, 2).

Показано, що за використання класичного Fe-хелатного комплексу в живильному середовищі морфогенетичні процеси в культурі пиляків озимої пшениці проходять достовірно більш ефективно, ніж за використання феррілену. Так, індукція калюсу була достовірно кращою для 8 генотипів, причому в деяких випадках відсоток формування новоутворень був у 1,5–2 рази вищим (КП 186, F_1 за № 35, 115, 205). Два генотипи були не чутливими до джерела заліза і один генотип (КП 147) краще відреагував на феррілен в індукційному середовищі. Найбільший відсоток формування калюсу спостерігали в культурі пиляків гібриду F_1 №115 – $32,4 \pm 1,4$ на середовищі з хелатом. У середньому формування калюсу з мікроспор пиляків на середовищі з Fe-хелат ($\text{Na}_2\text{EDTA} + \text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), було достовірно вищим порівняно з даним показником, отриманим

на живильному середовищі з хелантим комплексом «Ferrilene»: $10,85 \pm 0,29$ та $6,68 \pm 0,15$ відповідно.

Вплив джерела заліза, що застосовували в індукційному середовищі, на проходження другого етапу андрогенезу *in vitro* – регенерації зелених рослин з новоутворень – був не таким однозначним. Так, для 7 з 11 досліджених зразків (КП 30, 82, 142, 147, 186 та гібриди F₁ № 210, 230) відсоток зелених регенерантів не залежав від джерела заліза в середовищі, за виключенням трьох гібридів F₁ озимої м'якої пшениці (№35, 115, 205), де він був майже на порядок більшим за присутності Fe-хелату; а селекційна лінія КП 207, навпаки, мав більший показник при використанні в середовищі феррілену. Загалом у першому варіанті дослідження (середовище з ферріленом) відсоток зелених рослин в середньому складав $0,58 \pm 0,05$, а в другому варіанті (середовище з Fe-хелат) – $0,88 \pm 0,09$.

За результатами, отриманими на обидвох етапах андрогенезу *in vitro*, в культурі пиляків

пшениці із комплексною стійкістю до іржі, можна виділити два генотипи, для яких даний процес утворення ДН ліній був найбільш ефективним: селекційна лінія КП 142 та гібриди F₁ № 35, № 205.

Отже, регенерація рослин – це складний процес, який залежить від багатьох факторів, однак основним із них є генотип [6]. Так, двофакторний дисперсійний аналіз (табл. 1) показав, що на прояв показника «регенерація зелених рослин» достовірно залежить саме від фактору «генотип» і не залежить від фактору «середовище» та їх взаємодії. Тоді як ознака «індукція калусу» достовірно залежить від обох факторів (середовище й генотип) та їхньої взаємодії.

У нашому дослідженні відсоток зелених регенерантів від пиляків, що висадили, коливався від 0 до 4,11 %, у середньому – $0,73 \pm 0,03$ %. Всього було отримано 265 зелених рослин-регенерантів (табл. 2), яких після адаптації до ґрунту та 45 добової яровизації в умовах штучного клімату вижило лише 114 (43 %).

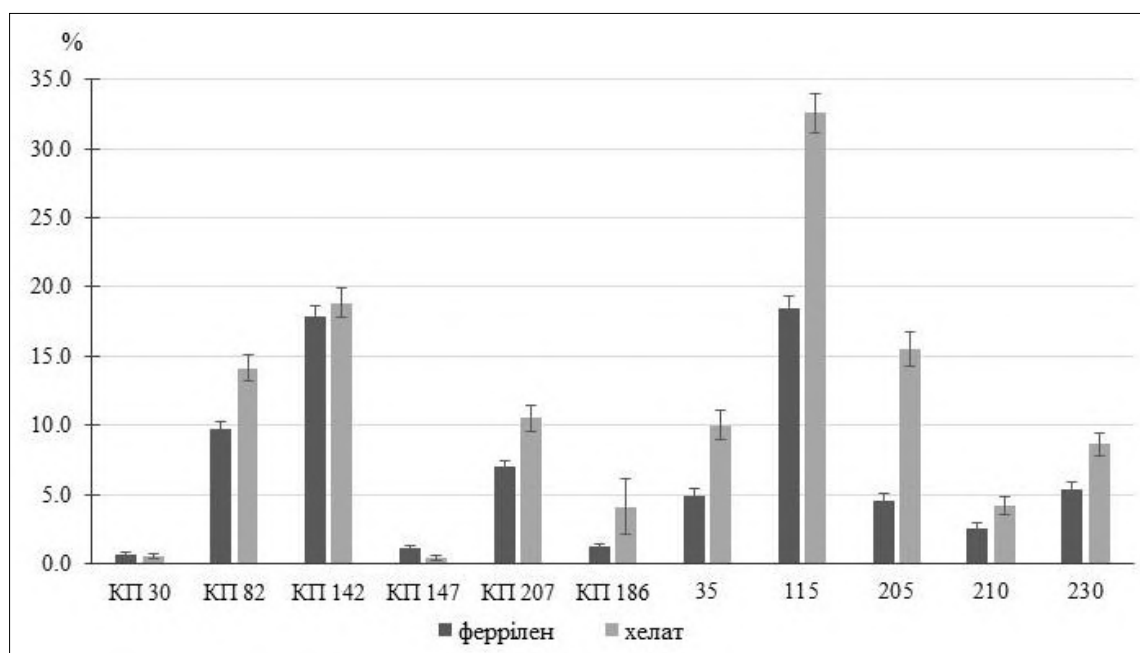


Рис. 1. Індукція калусу в культурі пиляків пшениці озимої м'якої за різних джерел заліза в індукційному поживному середовищі (К/100 пиляків).

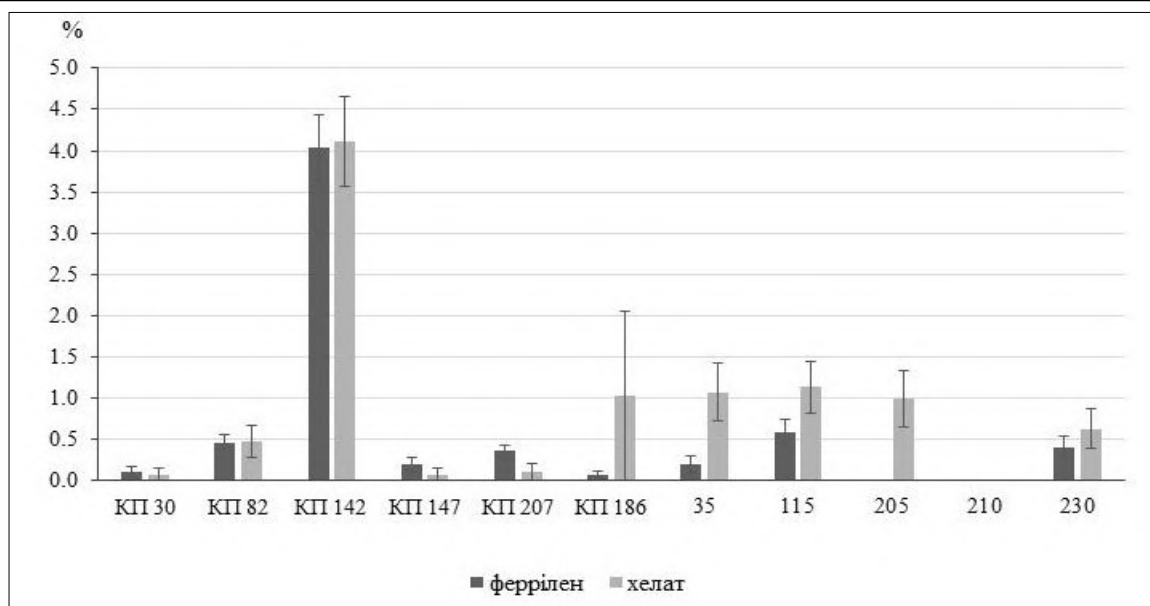


Рис. 2. Регенерація зелених рослин в культурі пиляків пшениці озимої м'якої за різних джерел заліза в індукційному поживному середовищі (ЗР/100 пиляків).

Таблиця 1. Статистичний аналіз параметрів андрогенезу *in vitro* для одинадцяти генотипів пшениці (метод двофакторного дисперсійного аналізу)

Джерело варіації	df	Середній квадрат	
		ELS/100A	GR/100A
Середовище	1	288,03***	1,48
Генотип	10	352,30***	7,76**
Взаємодія	10	31,13**	0,32
Випадкове	44	0,72	0,09

Примітки: *** значення істотно відрізняються при $p < 0,001$; ** Значення істотно відрізняються при $p < 0,01$; ELS/100A – калюсів/100 пиляків; GR/100A – зелених регенерантів/100 пиляків.

Таблиця 2. Ефективність гаплопродукційного процесу в культурі пиляків *in vitro* пшениці озимої м'якої за використання в індукційному середовищі різних джерел заліза

Генотип	ЕА, шт.	GP, шт.	AP, шт.	Фертильні рослини (DH)			ЕА, шт.	GP, шт.	AP, шт.	фертильні рослини (DH)		
				шт.	% від AP	% від ЕА				шт.	% від AP	% від ЕА
			феррілен						Fe-хелат			
КП 30	2909	2	0				1309	1	1		0	0,00
КП 82	3559	18	3	0	0,0	0,00	1272	5	2	1	50,0	0,08
КП 142	2458	96	41	14	34,1	0,57	1339	54	26	8	30,8	0,60
КП 147	3026	8	3		0,0	0,00	1356	1	0			
КП 207	3350	12	5	2	40,0	0,06	998	1	0			
КП 186	4060	3	2	2	100	0,05	97	1	0			
35	1963	3	1	0	0,0	0,00	839	15	7	4	57,1	0,48
115	2069	13	8	1	12,5	0,05	1148	10	5		0,0	0,00
205	1728	0	0				807	8	4	1	25,0	0,12
210	1142	0	0				892	0	0			
230	1790	7	2	1	50,0	0,06	1110	7	4	1	25,0	0,09
Сума/ середнє	28054	162	65	20	30,8	0,07 ± 0,02	11167	103	49	15	30,6	0,13 ± 0,03

Дорошування отриманих рослин регенерантів протягом всього періоду вегетації (від яровізації до отримання насіння) проходило в умовах періодичної відсутності електричного живлення та неконтрольованості фізіологічних параметрів: температури, вологості, освітлення. Частково саме цим можна пояснити такі занижені результати адаптації рослин-регенерантів (у середньому – 50 %). Відсоток спонтанної диплоїдизації (у середньому на рівні 30 %) подібний до того, який отримують інші дослідники [1, 12, 13]. Всього було отримано 20 (варіант індукційного середовища з ферріленом) та 15 (варіант індукційного середовища з Fe-хелат) ДН ліній (табл. 2). Аналіз отриманих результатів показав, що більш ефективно за андрогенезу *in vitro* використовувати як джерело заліза в індукційному живильному середовищі Fe-хелат. Так, відсоток отриманих дигаплоїдних ліній від кількості пиляків, що експлантували, достовірно вище ніж

даний за використання індукційного середовища з ферріленом – $0,13 \pm 0,03$ проти $0,07 \pm 0,02$.

Висновки

Протестована здатність до андрогенезу *in vitro* в культурі пиляків 11 генотипів пшениці м'якої озимої. Відсоток сформованих новоутворень від висаджених пиляків в середньому на середовищі з ферріленом – 6,68, а на середовищі з Fe-хелат – 10,85. Виявлено, що показник «індукція калюсу» достовірно залежить як від генотипу, так і від складу індукційного середовища, а «регенерація зелених рослин» – лише від генотипу. Отримано шляхом андрогенезу *in vitro* 35 ДН ліній пшениці м'якої озимої. Показано, що більш ефективним джерелом заліза в індукційному живильному середовищі для отримання дигаплоїдів пшениці м'якої шляхом андрогенезу *in vitro* є Fe-хелат ($\text{Na}_2\text{EDTA} + \text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$).

References

1. Lantos C., Weyen J., Orsini J. M., et al. Efficient application of *in vitro* anther culture for different European winter wheat (*Triticum aestivum* L.) breeding programs. *Plant Breed.* 2013. Vol. 132. P. 149–154. <https://doi.org/10.1111/pbr.12032>.
2. Lytvynenko M. A., Topal M. M., Shestopal O. L., Zambriborshch I. S., Galaev O. V. Udoskonalena tekhnolohiya selekciynogo procesu pshenyци myakoi ozymoi z vykorystanniam biotekhnolohichnykh i molecularno-genetychnykh metodiv. *Naukovo-metodychnyi posibnyk*. Odesa : Astroprint, 2015. 41 s. [in Ukrainian]
3. Weigt D., Kiel A., Nawracała J., Tomkowiak A., Kurasiak-Popowska D., Siatkowski I., Ługowska B. Obtaining Doubled Haploid Lines of the *Lr19* Gene Using Anther Cultures of Winter Wheat Genotypes. *BioTechnologia*. 2016. Vol. 97 (4). P. 285–293. <https://doi.org/10.5114/bta.2016.64545>.
4. 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. <https://doi.org/10.7124/feeo.v26.1267>. [in Ukrainian]
5. Testillano P. S. Microspore embryogenesis: targeting the determinant factors of stress-induced cell reprogramming for crop improvement. *Journal of Experimental Botany*. Vol. 70 (11). P. 2965–2978. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery464>.
6. Upadhyay Richa. Anther culture for haploid plant production, Editor(s): Avinash Chandra Rai, Ajay Kumar, Arpan Modi, Major Singh, *Advances in Plant Tissue Culture*. Academic Press. 2022. Chapter 7. P. 157–174. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90795-8.00004-7>.
7. Kanbar O. Z., Lantos C., Chege P. K., Kiss E., Pauk J. Generation of doubled haploid lines from winter wheat (*Triticum aestivum* L.) breeding material using *in vitro* anther culture. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, 2020. Vol. 56 (4). P. 150–158. <https://doi.org/10.17221/113/2019-CJGPB>.
8. Weigt D., Kiel A., Siatkowski I., Zyprych-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. <https://doi.org/10.3390/plants9010049>.
9. Broughton S., Castello M., Liu L., Killen J., Hepworth A., O'Leary R. The effect of caffeine and trifluralin on chromosome doubling in wheat anther culture. *Plants*. 2020. № 9 (1). P. 105. <https://doi.org/10.3390/plants9010105>.
10. Zambriborshch I., Shestopal O., Traskovetskaya V., Vasiliev O., Halaiev O., Halaieva M., Afinogenov O., Chekalova M. Obtaining dihaploid lines of winter bread wheat with complex resistance. *Cereal Research Communications*. 2024-01-18. <https://doi.org/10.1007/s42976-023-00466-3>.
11. Atramentova L. O., Utjevskaya O. M. Statistical methods in biology. Kharkiv : KhNU named V. N. Karazina, 2007. 288 p. [in Ukrainian]
12. Zambriborshch I. S., Shestopal O. L., Chekalova M. S., Afinogenov O. A., Lytvynenko M. A., Vasiliev O. A. Androgenesis *in vitro* in anther culture of bread winter wheat. *Faktori eksperimental'noi evolucii organizmiv*. 2024. Vol. 34. P. 149–153. <https://doi.org/10.7124/FEEO.v34.1632>. [in Ukrainian]
13. 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. 436. <https://doi.org/10.3390/plants8100436>.

SHESTOPAL O. L., ZAMBRIBORSHCH I. S., AFINOGENOV O. A., CHEKALOVA M. S., VASYLIEV O. A., TRASKOVETSKA V. A., SAULIAK N. I.

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

INFLUENCE OF IRON SOURCE IN INDUCTION MEDIUM ON HAPLOPREDUCTIVE CAPACITY OF BREAD WHEAT IN *IN VITRO* ANTHER CULTURE

Aim. Study of the efficiency of *in vitro* androgenesis of bread wheat using different sources of iron in the induction medium for anther cultivation. **Methods.** *In vitro* culture of isolated anthers. The following were determined: the percentage of callus formed and the percentage of green plants from planted anthers; the percentage of acclimatized plants from green regenerants; the percentage of fertile plants from acclimatized plants and from planted anthers. **Results.** Androgenesis *in vitro* was studied in anther culture of 11 genotypes of bread winter wheat. Callus induction frequency: from 0.65 to 18.46 %, on average 6.68 % – on a medium with ferylene and from 0.53 to 35.58 %, on average 10.85 % – on a medium with Fe-chelate. The ability to regenerate green plants: from 0 to 4.03 %, on average 6.68 % – on a medium with ferylene and from 0 to 4.11 %, on average 10.85 % – on a medium with Fe-chelate. 35 dihaploid lines were obtained in anther culture of eight genotypes. Spontaneous diploidization on average 30.7 %. **Conclusions.** Genotype-specific morphogenetic reactions of bread winter wheat microspores during *in vitro* androgenesis have been revealed. It has been shown that the use of Fe-chelates ($\text{Na}_2\text{EDTA} + \text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) as an iron source in the induction nutrient medium is more effective for obtaining dihaploids by *in vitro* androgenesis.

Keywords: dihaploids, wheat, androgenesis, callus, regeneration.