

УДК 633.854.78:631.527

В.П. Коломацька*, Л.І. Реліна, В.І. Сивенко, Н.В. Леонова

Чи можливо створити холодостійкі гібриди соняшника шляхом схрещування холодостійких батьківських ліній?

UDC 633.854.78:631.527

V.P. Kolomatska*, L.I. Relina, V.I. Syvenko, N.V. Leonova

Can Cold-Tolerant Hybrids Be Created by Crossing Cold-Tolerant Parental Lines?

Ключові слова: соняшник, холодостійкість, лінії, гібриди, регресійний аналіз.

Key words: sunflower, cold tolerance, lines, hybrids, regression analysis.

Соняшник (*Helianthus annuus L.*) — це олійна культура, яка найбільш популярна у Європі та Північній Америці, а також є стратегічно важливою в Україні. У лівобережному лісостепу України соняшник зазвичай сіють наприкінці квітня або на початку травня. Мітоз у рослин відбувається при $T > 7^{\circ}\text{C}$, отже для хорошого росту та розвитку проростків оптимальна температура є ключовим фактором. Однак в останні роки наприкінці квітня та на початку травня часто спостерігається похолодання до 0°C на поверхні ґрунту, що негативно впливає на проростання та початковий розвиток рослин соняшника. Ця проблема також привертає увагу селекціонерів соняшника і в інших країнах [6]. Таким чином, покращення холодостійкості (ХС) соняшника на ранніх етапах росту та розвитку для забезпечення успішних ранніх посів є актуальною задачею.

На сьогодні переважна більшість вирощеного аграріями соняшника є гібридами, оскільки вони, як правило, демонструють вищу пристосованість (гетерозис). Отже, важливо мати холодостійкі гібриди.

Чи можливо створити такі гібриди шляхом схрещування холодостійких ліній? Холодостійкість — це комплексна ознака, яка визначається численними факторами. У вищих рослин ідентифіковано понад 1000 генів, що індують холодом [9]. Однак у кукурудзи результатом

Sunflower (*Helianthus annuus L.*) is an oilseed crop, which is the most popular in Europe and North America and strategically important in Ukraine. In the Left-Bank Forest-Steppe of Ukraine, *H. annuus* is usually sown in late April or in early May. Mitosis in plants occurs at $T > 7^{\circ}\text{C}$, therefore, for good growth and development of seedlings, optimal temperature is a key factor. However, recently surface soil temperature has often dropped to 0°C in late April and early May, negatively affecting the germination and initial growth of sunflower plants. This problem also comes into notice of sunflower breeders in other countries [1]. Thus, it is vital to improve cold tolerance (CT) in early stages of sunflower growth and development, so as to enable successful early sowing.

Nowadays, vast majority of sunflowers grown by farmers are hybrids, as they generally have a higher fitness (heterosis). Therefore, it is vital to have cold-tolerant hybrids.

Is it possible to create such hybrids by crossing cold-tolerant lines? Cold tolerance is a complex feature determined by numerous factors. In higher plants, there are more than 1,000 cold-induced genes [9]. However, in corn, crossing with a cold-tolerant line resulted in a cold-tolerant hybrid with a high probability [4].

The study goal was to evaluate sunflower lines as donors of the CT trait (*i. e.* to verify their ability to confer this trait to their offspring) and to assess

Інститут рослинництва імені В.Я. Юр'єва НААН України

Yuriev Plant Production Institute of NAAS of Ukraine

*Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:

Пр. Героїв Харкова, 142, м. Харків, Україна 61060;
тел.: (+38 098) 949-45-24
електронна пошта: yuriev1908nauka@gmail.com

*To whom correspondence should be addressed:

142, Heroiv Kharkova Ave., Kharkiv, Ukraine 61060;
tel.: +380 98 949 4524
e-mail: yuriev1908nauka@gmail.com

Надійшла 13.04.2023
Прийнята до друку 18.09.2023

Received 13, April, 2023
Accepted 18, September, 2023

© Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, 2023
© Publisher Publishing House 'Akademperiodyka' of the National Academy of Sciences of Ukraine, 2023

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

схрещування з холодостійкою лінією з високою вірогідністю був холодостійкий гібрид [3].

Мета роботи — оцінка ліній соняшника як донорів ознаки холодостійкості (тобто перевірка їх на здатність передавати цю ознаку потомкам) та шанси створення холодостійких гібридів соняшника шляхом схрещування холодостійких ліній.

Соняшник вирощували відповідно до стандартних агротехнологій [1]. Жіночими формами були лінії Mx845A, Cx1002A, Cx1006A, Cx1010A, Cx1012A, Cx146A, Cx51A, Cx777A, Cx808A, Cx908A, Cx93A. Лінії X15107B, X15113B, X5713B, X15146B, X1580B, X1575B, X15157B, X06134B, X06135B, X114B, X276B, X4413B, X4713B, X4913B, X526B, X5613B, X720B, X785B слугували чоловічими формами. У цілому отримано 192 F1 гібридних комбінацій. Скринінг ліній та F1 гібридів на стійкість до низьких позитивних температур проводився за допомогою тесту холодного пророщування, який запропонував А. П. Лаханов [4]. Насіння поміщали на зволожений фільтрувальний папір, який згортали в рулони (25 насінин на рулон, 4 рулони на кожну лінію або гібрид). Зразки інкубували при 5°C. Контрольне насіння пророщували за температури 25°C, оскільки вона вважається оптимальною. Період пророщування складав 10 діб. На 10-ту добу проводили облік проростків. Насінина вважалась схожою, якщо реєстрували нормально розвинутий проросток (рис. 1) згідно з рекомендаціями І.Г. Леурди та Л.В. Бельських [5].

Холодостійкість розраховували як схожість при 5°C відносно схожості при 25°C у відсотках. Зв'язок між ХС F1 та їхніх батьківських ліній оцінювали методом лінійного регресійного аналізу.

chances of creating cold-tolerant sunflower hybrids by crossing cold-tolerant lines.

Sunflower was grown in compliance with standard farming techniques [5]. Lines Mkh845A, Skh1002A, Skh1006A, Skh1010A, Skh1012A, Skh146A, Skh51A, Skh777A, Skh808A, Skh908A, and Skh93A were taken as female forms. Lines Kh15107V, Kh15113V, Kh5713V, Kh15146V, Kh1580V, Kh1575V, Kh15157V, Kh06134V, Kh06135V, Kh114V, Kh276V, Kh4413V, Kh4713V, Kh4913V, Kh526V, Kh5613V, Kh720V, and Kh785V were taken as male forms. In total, 192 F1 hybrid combinations were obtained. The lines and F1 hybrids were screened for tolerance to low positive temperature by A.P. Lakhonov's cold germination test [6]. Seeds were placed on wetted filter paper, which was rolled up (25 seeds per roll, 4 rolls for each line/hybrid). The samples were incubated at 5°C. The control seeds were germinated at 25°C, which is considered to be the optimal temperature. The germination period was 10 days. On day 10, seedlings were counted. The seed was considered germinable if a normally developed seedling (Fig. 1) was recorded in compliance with I.G. Leurda and L.V. Belskikh's recommendations [7].

Cold tolerance was computed as germinability at 5°C related to germinability at 25°C in percent. Relationship between CT of F1 and their parents was assessed by linear regression analysis.

Three female lines, (Skh93A, Skh1006A and Skh777A) were found to be cold-tolerant (their cold tolerance amounted to 88.8%, 79.3%, 76.4%, respectively). As to the male lines, Kh720V (93.6%), Kh4913V (77.9%), and Kh06134V (96.0%) showed high germinability at 5°C [3]. It was expected that they might become donors of the CT trait for the offspring. However, only some hybrid



Рис. 1. Нормально (+) і ненормально (-) пророслі насінини соняшника (відтворено за [5]).

Fig. 1. Normally (+) and abnormally (-) germinated sunflower seeds (reproduced from [7]).



Було встановлено, що три жіночі лінії (Сх93А, Сх1006А та Сх777А) є холодостійкими (88,8, 79,3, 76,4% відповідно). Чоловічі лінії Х720В (93,6%), Х4913В (77,9%) і Х06134В (96,0%) продемонстрували високу схожість при 5°C [2]. Очікувалося, що вони можуть стати донорами ознаки ХС для свого потомства. Однак тільки деякі гібридні комбінації (3–6 з 11–18 варіантів), отримані від цих ліній, мали ХС на рівні 85,1–100%. Комбінація Сх1012А / Х06134В була єдиним холодостійким гібридом, який походив від лінії Х06134В. Автори також отримали декілька холодостійких гібридів від жіночих ліній Сх146А, Сх1002А, Сх808А і Сх1012А та від чоловічих ліній Х4713В, Х1575В, Х1580В, Х5613В, Х15113В, Х06135В, Х15157В, Х5713В і Х785В, хоча ці батьківські лінії не відзначалися високою схожістю при 5°C. Чотири гібридних комбінації з ХС близько 100% заслуговують на особливу увагу: Сх1002А / Х785В (стійкість батьківських ліній 13,6 і 0% відповідно), Сх1010А / Х785В, Сх1012А / Х785В і Сх1012А / Х5613В (стійкість обох батьківських ліній близько 0%).

У результаті експериментів було побудовано 29 ліній регресії. Типові графіки представлено на рис. 2. Коефіцієнти кореляції $\leq 0,25$ та значення $P \geq 0,10$ вказують на відсутність статистично значущого зв'язку між ХС F1 та їхніх батьківських ліній. Наприклад, спостерігалась практично нульова кореляція між ХС гібридів, отриманих у результаті схрещування жіночої лінії Сх1006А з різними чоловічими лініями та ХС цих чоловічих ліній. Коефіцієнт детермінації R^2 0,02994 означає, що лише 3% варіабельності ХС цих гібридів пояснюється стійкістю до низьких позитивних температур їхніх чоловічих ліній. Коефіцієнт кореляції R 0,173 вказує на дуже слабкий (незначущий) прямий зв'язок між ХС цих гібридів та їхніх чоловічих ліній. Схил $b_1 = 0,511$ означає, що коли ХС чоловічої лінії підвищувалася на 1%, ХС її гібридів зростала тільки на 0,1511% (рис. 2, А). Спостерігався слабкий зв'язок між ХС гібридів, отриманих у результаті схрещування чоловічої лінії Х06134В з різними жіночими лініями, і ХС цих жіночих ліній. Коефіцієнт детермінації R^2 0,01827 означає, що тільки 1,8% варіабельності Y-значень (F1) пояснювалось X-значеннями (ліній). Коефіцієнт кореляції R -0,1352 показує, що був дуже слабкий (незначущий) зворотній зв'язок між X та Y. Схил $b_1 = -0,02266$ означає, що коли X-значення підвищувалось на 1%, то Y-значення навіть знижувалось на 0,02266% (рис. 2, В).

combinations (3–6 out of 11–18 variants) derived from these lines showed CT of 85.1–100%. Skh1012A / Kh06134V was the only cold-tolerant hybrid originated from Kh06134V. The authors also obtained several cold-tolerant hybrids from female lines Skh146A, Skh1002A, Skh808A, and Skh1012A and from male lines Kh4713V, Kh1575V, Kh1580V, Kh5613V, Kh15113V, Kh06135V, Kh15157V, Kh5713V, and Kh785V, though these parental lines did not excel in germinability at 5°C. Four hybrid combinations with about 100% CT are worth of special mention: Skh1002Ф / Kh785V (tolerance of the parental lines was 13.6% and 0%, respectively), Skh1010A / Kh785V, Skh1012A / Kh785V, and Skh1012A / Kh5613V (cold tolerance of both parents was around 0%).

As a result of the experiments, twenty-nine regression lines were constructed. Typical graphs are presented in Fig. 2. The correlation coefficients of ≤ 0.25 and P-values of ≥ 0.10 indicate that there is no statistically significant relationship between F1 CT and CT of their parental lines. For example, there was next to zero correlation between CT of the hybrids derived from crossing Skh1006A female line with different male lines and CT of these male lines. The determination coefficient (R^2) of 0.02994 meant that 3% of the variability in the hybrids' CT was explained by tolerance of their male lines to low positive temperature. The correlation coefficient R of 0.173 meant that there was a very weak (insignificant) direct relationship between the hybrids' CT and male lines' CT. The slope $b_1 = 0.511$ meant that, when CT of a male line was increased by 1%, CT of its hybrids only increased by 0.1511% (Fig. 2A). There was a weak relationship between CT of the hybrids derived from crossing Kh06134V male line with different female lines and CT of these female lines. The determination coefficient of 0.01827 meant that 1.8% of the variability of Y (hybrids) was explained by X (lines). The correlation coefficient of -0.1352 meant that there was a very weak (insignificant) inverse relationship between X and Y. The slope $b_1 = -0.02266$ meant that, when the X value was increased by 1%, the Y value even decreased by 0.02266% (Fig. 2B).

Relatively low values of R^2 (below 0.06 in vast majority of the regressions), big scattering of the individual values and wide prediction intervals mean that there is a great deal of uncertainty associated with generating cold-tolerant sunflower hybrids from cold-tolerant lines.

To check these results, the authors applied a multiple linear regression to determine the re-



Відносно низькі значення R^2 (нижче 0,06 у переважній більшості регресій), великий розкид індивідуальних значень і широкі інтервали прогнозування означають, що присутня значна частка невизначеності, пов'язана зі створенням холодостійких гібридів соняшника з холодостійких ліній.

relative contributions of each independent variable (parental lines' CT) in the total variance (F1 CT). The equation of the fitted model was as follows: $Y = 65.80781 + 0.01727X_1 + 0.10534X_2$, where Y – F1 CT, X_1 – CT of female lines, and X_2 – CT of male lines. The constant represents the value (65.80781) that would be predicted for the hybrids'

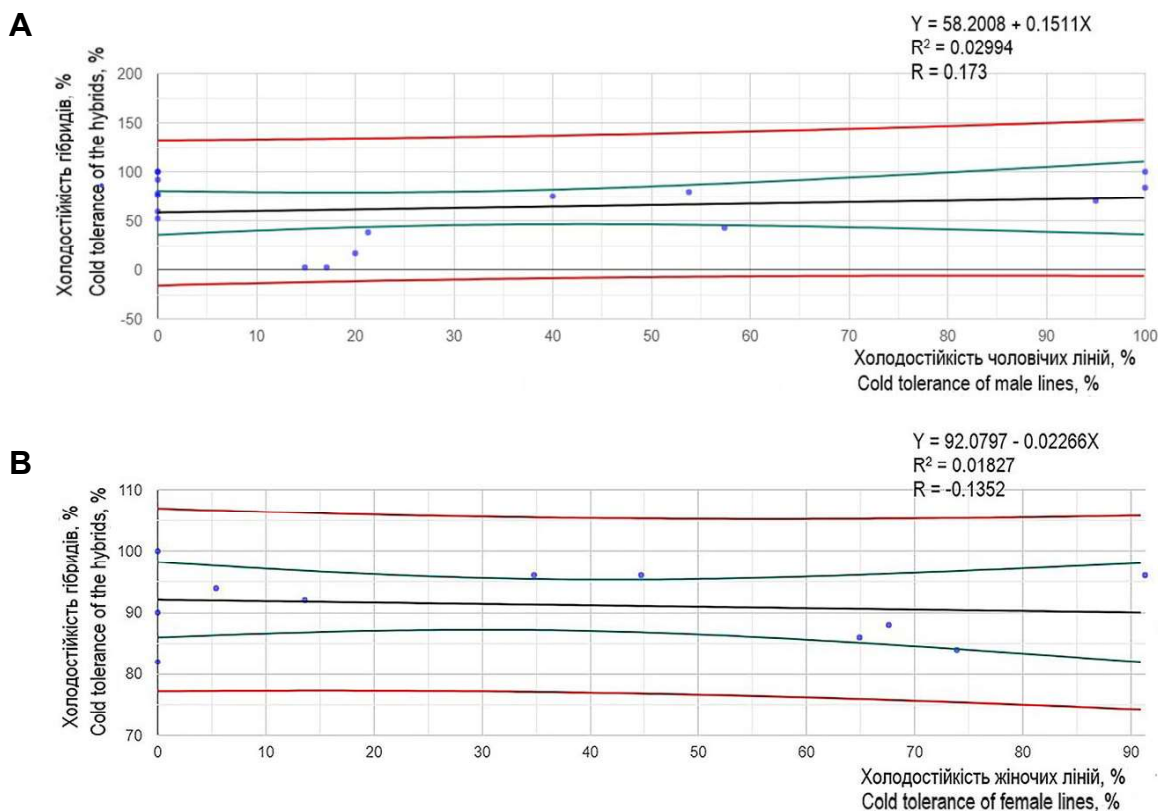


Рис. 2. Лінійна регресія ХС F1 залежно від холодостійкості батьківських ліній: **А** — холодостійкість гібридів, отриманих від жіночої лінії Sx1006A; **В** — холодостійкість гібридів, отриманих від чоловічої лінії X06134B: ● — холодостійкість окремих гібридів; чорна лінія — регресія; зелена лінія — довірчий інтервал 95%; червона лінія — інтервал прогнозування 95%.

Fig. 2. Linear regression of F1 CT on their parental lines' CT: **A** – cold tolerance of the hybrids originated from female line Skh1006A; **B** – cold tolerance of the hybrids originated from male line Kh06134V; ● – cold tolerance of individual hybrids; black line – regression; green line – 95% confidence interval; red line – 95% prediction interval.

Одержані результати перевіряли множинною лінійною регресією для визначення відносних внесків кожної незалежної змінної (ХС батьківських ліній) у загальну варіансу (ХС F1). Рівняння підбраної моделі було наступним: $Y = 65,80781 + 0,01727X_1 + 0,10534X_2$, де Y — ХС F1, X_1 — ХС жіночих ліній, а X_2 — ХС чоловічих ліній. Константа представляє значення (65,80781), що було б спрогнозоване для ХС F1, якби всі незалежні змінні (ХС батьківських ліній) одночасно дорівнювали нулю. Схил b_1 0,01727 показує, що спрогнозоване значення Y буде збільшуватися лише на 0,01727% з кожним збільшенням X_1 на 1%, при не зміненому X_2 . Схил b_2 0,10534 означає, що спрогнозоване зна-

CT if all the independent variables (parental lines' CT) were simultaneously equal to zero. b_1 of 0.01727 meant that the estimated value of Y would increase by 0.01727% for each increment of 1% in X_1 , provided unchanged X_2 . Similarly, b_2 of 0.10534 meant that the estimated value of Y would only increase by 0.10534% for each increment of 1% in X_2 , provided unchanged X_1 . R^2 of 0.0166599 meant that the predictors (X_i) only explained 1.7% of the variance of Y . Coefficient of multiple correlation was 0.129073. It meant that there was a very weak correlation between the predicted and observed Y values. Thus, this approach confirmed previous calculations by simple linear regression.

чення Y буде збільшуватись на 0,10534% з кожним збільшенням X_2 на 1%, при не зміненому X_1 . R^2 0,0166599 означає, що прогностичні змінні (X_i) пояснюють тільки 1,7% варіанси Y . Коефіцієнт множинної кореляції становив 0,129073. Це означає, що між спрогнозованими та фактичними значеннями Y існувала дуже слабка кореляція. Отже, цей підхід підтвердив попередні розрахунки, отримані за допомогою простої лінійної регресії.

Таким чином, отриманий результат можна віднести на рахунок багатфакторної природи ХС, навіть якщо враховується тільки стійкість до позитивних субоптимальних температур [7]. Очевидно, що важко поєднати всі (чи основні) компоненти ХС в одному генотипі. Холодостійкість батьківських ліній соняшника не гарантує, що їхні гібриди будуть холодостійкими, тобто такі лінії можуть виявитися неспроможними стати донорами цієї ознаки своєму потомству. Н. Tetreault та співавт. [8] вивчали три природні популяції виду багаторічного соняшника *Helianthus maximiliani*. Популяції «Texas» і «Kansas» були холодочутливими, а популяція «Manitoba» демонструвала стійкість до низьких температур. Проте ХС F1 гібридів «Manitoba» / «Texas» статистично не відрізнялась від ХС популяції «Texas».

Отже, для підвищення шансів створення холодостійких гібридів соняшника може знадобитися молекулярний скринінг батьківських ліній на предмет генів, що відповідають за ХС і всебічні дослідження закономірностей їх успадкування.

Література

1. Кириченко ВВ, Коломацька ВП. Перспективи гетерозисної селекції соняшнику, орієнтованої на екологічні умови Лісо-степу України. Селекція і насінництво. 2006; (92): 20–31.
2. Коломацька ВП, Сивенко ВІ, Кириченко ВВ та ін. Диференціація ліній соняшнику за холодостійкістю. Селекція і насінництво. 2020; (118): 35–44.
3. Красновський СА. Характер успадкування ознаки «холодостійкість» у кукурудзи. Наукові доповіді Національного університету біоресурсів і природокористування України. [Інтернет] 2017 22 березня [Цитовано 16.04.2023]; (2): 9. Доступно на: http://nbuv.gov.ua/UJRN/Nd_2017_2_9
4. Лакханов АП. Оценка холодостойкости полевых культур. В: Удовенко ГВ, редактор. Диагностика устойчивости растений к стрессовым воздействиям. Ленинград: ВИР; 1988. с. 62–75.
5. Леурда ИГ, Бельских ЛВ. Определение качества семян. Альбом. Москва: Колос. 1974. С. 34.

Hence, this may be attributed to multi-factor nature of CT even if we consider tolerance to suboptimal positive temperatures only [2]. It is obvious that it is difficult to combine all (or major) components of CT in one genotype. Cold tolerance of parental sunflower lines does not guarantee that their hybrids will be cold-tolerant, *i. e.* cold-tolerant lines may be incapable of becoming donors of this trait for their offspring. Н. Tetreault *et al.* [8] examined three natural populations of the perennial sunflower species *Helianthus maximiliani*. ‘Texas’ and ‘Kansas’ populations were cold-susceptible, while ‘Manitoba’ population showed tolerance. However, CT of ‘Manitoba’ / ‘Texas’ F1 hybrids did not statistically differ from that of the ‘Texas’ population.

Thus, molecular screening of parental lines for genes responsible for CT and comprehensive investigation of inheritance patterns for such genes may be required in order to enhance chances of creating cold-tolerant sunflower hybrids.

References

1. Debaeke P, Casadebaig P, Langlade N. New challenges for sunflower ideotyping in changing environments and more ecological cropping systems. OCL. [Internet] 2021 May 3 [Cited May 16 2023]. 2021; 28: 1–23. Available from: https://www.ocl-journal.org/articles/oclj/full_html/2021/01/oclj200125/oclj200125.html.
2. Espevig T, Xu C, Aamlid TS, et al. Proteomic responses during cold acclimation in association with freezing tolerance of velvet bentgrass. J Amer Soc Hort Sci. 2012; 137(6): 391–9.
3. Kolomatska VP, Suvenko VI, Kyrychenko VV, et al. [Differentiation of sunflower lines by cold tolerance]. Seleksiia i Nasinnytstvo. 2020; (118): 35–44. Ukrainian
4. Krasnovskiy SA. [Inheritance of cold tolerance in corn]. Naukovi Dopovidi Natsionalnoho Universytetu Bioresursiv i Pryrodokorystuvannia Ukrainy. [Internet] 2017 Mar 22 [Cited Apr 16 2023]; (2): 9. Ukrainian. Available from: http://nbuv.gov.ua/UJRN/Nd_2017_2_9
5. Kyrychenko VV, Kolomatska VP. [Prospects of heterosis sunflower breeding oriented at the environmental conditions of the Forest-Steppe of Ukraine]. Seleksiia i Nasinnytstvo. 2006; (92): 20–31. Ukrainian
6. Lakhonov AP. [Evaluation of cold tolerance in field crops]. In: Udovenko GV, editor. [Diagnostics of plant tolerance to stressors]. Leningrad: VIR; 1988. p. 62–75. Russian.
7. Leurda IG, Belskikh LV. [Determination of seed quality.] Album. Moscow: Kolos. 1974. P. 34. Russian.
8. Tetreault H, Kawakami T, Ungerer M, et al Low temperature tolerance in the perennial sunflower *Helianthus maximiliani*. Am Midl Nat. 2016; 175: 91–102.



6. Debaeke P, Casadebaig P, Langlade N. New challenges for sunflower ideotyping in changing environments and more ecological cropping systems. OCL. [Internet] 2021 May 3 [Cited May 16 2023]. 2021; 28: 1–23. Available from:https://www.ocl-journal.org/articles/ocl/full_html/2021/01/ocl200125/ocl200125.html
7. Espevig T, Xu C, Aamlid TS, et al. Proteomic responses during cold acclimation in association with freezing tolerance of velvet bentgrass. J Amer Soc Hort Sci. 2012; 137(6): 391–9.
8. Tetreault H, Kawakami T, Ungerer M, et al. Low temperature tolerance in the perennial sunflower *Helianthus maximiliani*. Am Midl Nat. 2016; 175: 91–102.
9. Thomashow MF. Molecular basis of plant cold acclimation: insights gained from studying the CBF cold response pathway. Plant Physiol. 2010; 154(2): 571–7.