СОЗДАНИЕ ГАПЛОИДОВ В КУЛЬТУРЕ ПЫЛЬНИКОВ ОЗИМОЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ

Калинина Н.В., младший научный сотрудник лаборатории клеточной селекции,
ORCID ID: 0000-0002-2305-4189
ФГБНУ «Аграрный научный центр «Донской»,
347740, Ростовская обл., г. Зерноград, Научный городок, 3; e-mail: vniizk30@mail.ru

В современном мире применение технологии культивирования изолированных пыльников в настоящее время является неотъемлемой частью процесса селекции пшеницы. Создание гаплоидов в культуре пыльников озимой мягкой пшеницы позволит получить новые формы пшеницы в кратчайшие сроки и без привлечения больших площадей. Цель исследований – дать оценку гибридам F_3 озимой мягкой пшеницы по отзывчивости пыльников и регенерации в культуре *in vitro*, выявить факторы, влияющие на выход гаплопродукции. Изучена способность к андрогенезу *in vitro* в культуре пыльников четырех гибридных комбинаций озимой мягкой пшеницы селекции ФГБНУ «АНЦ «Донской» интенсивного и полунинтенсивного типа. Проведена оценка роли минерального состава трех индукционных питательных средах N6, W14, NPB-99. Установлена связь основных этапов создания гаплоидных растений с генотипом. Наибольшая частота регенерации зеленых растений получена у образца F_3 623 интенсивного типа (3,3%). Наиболее подходящей средой для андрогенеза пыльников озимой мягкой пшеницы *in vitro* является NPB-99. Поскольку генотип F_3 623 интенсивного типа продемонстрировал высокие показатели гаплопродукционной способности, то он может быть успешно использован в селекционных программах для быстрого получения гомозиготных линий пшеницы в культуре пыльников *in vitro*. Используя двухфакторный дисперсионный анализ, была установлена взаимосвязь между эффектами генотипа, питательной среды и их взаимодействием с основными параметрами гаплообразования озимой пшеницы. Формирование эмбриогенных структур в основном связано с влиянием генотипа (46,52%). Доля питательного состава среды была низкой (1,82%), а фактор взаимодействия составил 2,1%. Наибольшее влияние на показатель количества регенерантов оказал генотип. Питательная среда мало повлияла. Что касается регенерации зеленых растений, которая является основным показателем гаплопродукционного процесса, доля влияния генотипа была наибольшей (47,32%). Вклад среды и взаимодействия факторов были менее важными, но статистически значимыми.

Ключевые слова: озимая мягкая пшеница, генотип, культура пыльников, искусственная питательная среда, каллус, растение-регенерант.

Для цитирования: Калинина Н.В. Создание гаплоидов в культуре пыльников озимой мягкой пшеницы // Зерновое хозяйство России. 2021. № 6(78). С. 21–26. DOI: 10.31367/2079-8725-2021-78-6-21-26.

DEVELOPMENT OF HAPLOIDS IN THE WINTER BREAD WHEAT ANTHERS

N.V. Kalinina, junior researcher of the laboratory for cell breeding, ORCID ID: 0000-0002-2305-4189
Agricultural Research Center "Donskoy",
347740, Rostov region, Zernograd, Nauchny Gorodok, 3; e-mail: vniizk30@mail.ru

In the modern world, the use of isolated anther cultivation technology is currently an integral part of the wheat breeding process. The development of haploids in the winter bread wheat anthers will allow obtaining new forms of wheat in the shortest possible time and without large areas. The purpose of the current study was to estimate the F_3 winter bread wheat hybrids according to the anthers' sensitivity to androgenesis and plant regeneration *in vitro* and to identify the factors affecting the yield of haploid production. There has been studied the ability to androgenesis *in vitro* in the anthers of four winter bread wheat hybrids of intensive and semi-intensive type of the FSBSI "ARC "Donskoy". There has been assessed the role of the mineral composition of three induction nutrient media N6, W14 and NPB-99. There has been established a correlation between the main stages of development of haploids and a genotype. The highest regeneration rate of green plants was obtained in the sample F_3 623 of intensive type (3.3%). The most suitable medium for androgenesis of the winter bread wheat anthers *in vitro* is NPB-99. Since the genotype F_3 623 of intensive type demonstrated high values of haploid production capacity, it could be successfully used in breeding programs for the rapid production of homozygous wheat anther lines *in vitro*. Using two-way analysis of variance, there has been identified a correlation between the effects of a genotype, nutrient medium and their interaction with the main parameters of haploid formation in winter wheat. The formation of embryogenic structures is mainly associated with the effect of a genotype (46.52%). The proportion of the nutrient composition of the medium was low (1.82%), and the correlation factor was 2.1%. The genotype had the greatest effect on the indicator of the regenerants' number. The nutrient medium had little effect. Regarding the regeneration of green plants, which is the main indicator of the haploid production, the share of a genotype effect was the largest (47.32%). The contribution of the medium and the correlation of factors were less important, but statistically significant.

Keywords: winter bread wheat, genotype, anthers, artificial nutrient medium, callus, regenerant plant.

Введение. Современные биотехнологические исследования позволяют решать серьезные проблемы в области селекции сельскохозяйственных культур, в том числе внедрение

новых клеточных технологий с классической генетикой и методами селекции открывает множество возможностей для практического применения (Testillano, 2019).

Вышесказанное больше подходит для метода выращивания изолированных пыльников, основанного на использовании андрогенеза *in vitro*. Этот метод повышает эффективность получения новых форм пшеницы в кратчайшие сроки и без привлечения больших площадей. В настоящее время в мире технология культивирования изолированных пыльников является неотъемлемой частью процесса селекции пшеницы (Dwivedi et al., 2015). Однако, несмотря на положительные результаты, многие проблемные вопросы все еще остаются нерешенными.

Культура пыльников является одним из наиболее эффективных методов получения гаплоидов и гомозиготных дигаплоидов. Потенциал андрогенеза *in vitro* в получении дигаплоидных растений высок, поскольку один пыльник содержит более тысячи микроспор, и из каждой из них может развиться новое растение. Однако пшеница известна как непокорный вид в отношении методов андрогенеза, таких как культура изолированных пыльников микроспор. В целом многие генотипы пшеницы, особенно при случайном отборе, плохо отзываются на культивирование *in vitro*. В частности наблюдается низкая регенерация зеленых растений, связанная либо с альбинизмом, либо с полным ее отсутствием (Грауда и др., 2015, Grauda et al., 2014).

Трудно разработать эффективный метод регенерации растений в культуре пыльников, поскольку существует множество факторов, влияющих на эффективность андрогенетической индукции. Успех в регенерации дигаплоидов в основном зависит от генотипа растений-доноров. Это также определяется условиями их выращивания, типом и длительностью воздействия стресса, условиями культивирования – особенно видом индукционной среды – содержанием в ней гормонов и взаимодействием между всеми этими факторами (Weigt et al., 2020).

Было проведено много исследований, касающихся технологии культивирования пыльников пшеницы *in vitro*. Используя комбинацию этой технологии с общепринятыми методами селекции, в некоторых странах уже разработаны и внедрены в производство сорта пшеницы, созданные с использованием дигаплоидных линий (Круглова и Сельдиминова, 2015).

Цель исследований – дать оценку гибридам F_3 озимой мягкой пшеницы по отзывчивости пыльников и регенерации в культуре *in vitro*, выявить факторы, влияющие на выход гаплопродукции.

Материалы и методы исследований. В качестве объекта исследований были случайно выбраны 4 гибридные комбинации озимой мягкой пшеницы селекции ФГБНУ «АНЦ «Донской» интенсивного и полунинтенсивного типа: F_3 532 п/инт., F_3 623 инт., F_3 630 п/инт., F_3 540 п/инт. Материал получен на опытных полях отдела селекции и семеноводства озимой пшеницы.

Донорные растения были отобраны в поле. Колосья были взяты на средней или поздней одностерной стадии микроспорогенеза, которая считается оптимальной для выделения. Стадию развития микроспор определяли с по-

мощью препаратов, изготовленных из измельченных пыльников, собранных с центральной части колоса, которые окрашивали ацетокармином. Стебли с колосьями на соответствующей стадии хранили в колбах Эрленмейера с водой в темноте при температуре 4 °C в течение семи дней. После низкотемпературной предварительной обработки материала проводили стерилизацию в 5% растворе гипохлорита натрия 10 мин. Затем колосья трижды промывали в стерильной дистиллированной воде в течение 5 минут. Далее пыльники выделяли из колосов и помещали в культуральные пробирки по 30 шт. на индукционную среду.

Всего было высажено на искусственные питательные среды 1939 шт. пыльников. Ежедневно наблюдали за процессом роста культуры, удаляли инфицированные пробирки.

Культивирование проводили на трех модифицированных питательных средах, из которых три – индукционные и одна для регенерации. Индукционные среды N6 (Головки и др., 2019), W14 (Barnabas, 2003), NPB-99 (Zheng et al., 2015), регенерационная – 190-2 (Barnabas, 2003). Среда W14 по содержанию макроэлементов была близка к среде N6, а среда NPB-99 содержала по прописи почти в два раза меньше макроэлементов по сравнению с N6. Среда W14 была схожа со средой NPB-99 по количеству микроэлементов, кроме того в обеих средах содержались такие микроэлементы, как молибден, медь и кобальт, в отличие от среды N6. В питательной среде NPB-99 находилась глютаминовая кислота (500 мг/л), а в средах N6 и W14 – глицин (2 мг/л). В среде NPB-99 – максимальное содержание тиамина (5 мг/л), в отличие от других сред. Кроме того в данной среде содержалось два ауксина: 2,4-Д (0,2 мг/л) и 3-ИУК (1 мг/л). В среде N6 и W14 присутствовал один ауксин – 2,4-Д (2 мг/л). Содержание цитокининов во всех трех средах было одинаковое – кетинина – 0,5, зеатина – 0,05 мг/л.

Пробирки с пыльниками инкубировали в термостате без доступа света при температуре +28 °C в течение 5–6 недель после посадки на индукционную среду. Во время этого периода пробирки осматривали под микроскопом, записывали время, дату, место образования и количество каллусов. Новообразования пересаживали на среду регенерации и инкубировали при температуре 25 °C в помещении с естественным освещением. Затем пробирки с эксплантами отправили в освещенную ростовую комнату, где они культивировались при освещенности 3000 люкс, 16ч/8ч фотопериод. Ежедневно наблюдали за регенерацией растений (появление зеленых побегов). Растения с хорошо развитой корневой системой в пробирках помещали на яровизацию в холодильник на 40 дней при температуре 4 °C (Головки и др., 2019, Grauda et al., 2014).

В ходе исследования были проанализированы следующие признаки:

- выход эмбриогенных структур;
- частота зеленых регенерантов;

• вклад факторов генотипа, состава питательных сред и их взаимодействия в основные параметры гаплопродукции.

Результаты и их обсуждение. В процессе анализа любого генотипа озимой пшеницы невозможно предсказать эффективность гаплопродукции в культуре пыльников. Поэтому при работе с неизученным (со стороны отзывчивости на андрогенез *in vitro*) генетическим материалом обязательной является оценка его гаплопродукционной способности. Результаты данного исследования показывают, что формирование эмбриогенных структур началось на 35–38 день от момента инокуляции пыльников на индукционную питательную среду.

Установлено, что при данных условиях эксперимента все изучаемые генотипы оказались чувствительными к первому этапу андрогенеза. По числу новообразований выделился генотип озимой мягкой пшеницы интенсивного типа F₃ 623 (табл. 1). Процент формирования эмбриогенных структур варьировал по генотипам в зависимости от варианта питательной среды от 6,84 до 22,4% по N6, от 5,78 до 40,38% по W14, от 0,97 до 31,58% по NPB-99. При этом генотип полуинтенсивного типа F₃ 532 характеризовался высокими значениями признака на средах W14 (40,38%) и NPB-99 (31,58%), а генотип пшеницы интенсивного типа F₃ 623 – на среде W14 (29,45%).

1. Эффективность андрогенеза *in vitro* в культуре пыльников различных генотипов озимой мягкой пшеницы (2021 г.)

1. Efficiency of androgenesis *in vitro* in the winter bread wheat anthers of various genotypes (2021)

Генотип	Индукционная среда	Количество высаженных пыльников, шт.	Эмбриогенных структур	
			шт.	частота индукции, %
F ₃ 532 п/инт.	N6	117	8	6,84
	W14	104	42	40,38
	NPB-99	95	30	31,58
F ₃ 623 инт.	N6	214	34	15,89
	W14	163	48	29,45
	NPB-99	183	21	11,48
F ₃ 630 п/инт.	N6	183	41	22,40
	W14	173	25	14,45
	NPB-99	140	6	4,29
F ₃ 540 п/инт.	N6	136	12	8,82
	W14	225	13	5,78
	NPB-99	206	2	0,97

Из данных генотипов, все были способны к формированию регенерантов. Развитие регенерантов *in vitro* происходило сходным обра-

зом и в сходные сроки с прорастанием пшеницы в обычных условиях (рис. 1).

1 – отбор донорных растений, 2 – инокуляция пыльников на среду индукции, 3 – новообразования на пыльнике, 4 – инокуляция новообразований на среду индукции, 5 – начало прорастания, 6 – фенофаза всходов, 7 – зеленые растения и растения-альбиносы, 8 – регенеранты в теплице

Рис. 1. Технология получения гаплоидов в культуре пыльников озимой мягкой пшеницы (2021 г.)

Fig. 1. Technology for obtaining haploids in the winter bread wheat anthers (2021)

Пыльники изучаемых гибридов характеризовались различными показателями частоты образования растений-регенерантов. Высокая частота регенерации среди альбиносных растений наблюдалась у генотипа F_3 532 – 8,4% по-

сле индукции пыльников на питательной среде NPB-99. Среди зеленых регенерантов высокую частоту регенерации показал генотип F_3 623 (3,3%) также на питательной среде NPB-99 (рис. 2).

Рис. 2. Частота регенерации растений-регенерантов в зависимости от питательной среды и генотипа (2021 г.)
Fig. 2. Regeneration frequency of regenerant plants depending on the nutrient medium and genotype (2021)

Для выявления доли влияния генотипа, питательной среды и их взаимодействия был проведен двухфакторный дисперсионный анализ, который позволил выявить вклад факторов в формирование эмбриогенных структур озимой мягкой пшеницы (Дьячук и др., 2017). Вклад генотипа при возникновении новообразований был значительным (46,52%). Доля влияния состава питательной среды была незначительной 1,82%, взаимодействие факторов составило 2,1%.

На показатель «число регенерантов» наибольшее влияние оказал генотип (48,11%). Доля вклада генотипа в величину регенерации зеленых растений была наибольшей (47,32%). Влияние питательной среды и взаимодействия факторов было менее значимым, но статистически достоверным (табл. 2). На эти процессы более 50% влияния оказывают прочие факторы: возраст пыльника, длительность холодной предобработки, условия культивирования, что является допустимым в подобных исследованиях.

2. Влияние состава питательных сред, генотипа и их взаимодействия на основные параметры гаплопродукции озимой мягкой пшеницы (2021 г.)

2. Effect of nutrient media composition, genotype and their correlation on the main parameters of winter haploid wheat production (2021)

Фактор	Эмбриогенных структур, шт.			Число регенерантов			Число регенерантов зеленых		
	Доля влияния, %	$F_{\text{факт}}$	$F_{\text{теор}}$	Доля влияния, %	$F_{\text{факт}}$	$F_{\text{теор}}$	Доля влияния, %	$F_{\text{факт}}$	$F_{\text{теор}}$
Генотип	46,52	156,3	3,59	48,11	648,8	3,59	47,32	213,3	3,59
Питательная среда	1,82	9,2	3,98	-0,89	21,15	3,98	0,77	7,2	3,98
Взаимодействие генотип × питательная среда	2,1	3,59	3,09	1,67	13,02	3,09	1,64	10,5	3,09
Прочие факторы	49,56	–	–	51,11	–	–	50,27	–	–

Выводы. Наибольшая частота регенерации зеленых растений получена у образца F_3 623 интенсивного типа (3,3%). В данных исследованиях установлено, что оптимальной средой для андрогенеза пыльников *in vitro* озимой мягкой пшеницы является среда NPB-99. В ходе двухфакторного дисперсионного анализа вы-

явлена доля влияния генотипа, питательной среды и их взаимодействия на гаплопродукционную способность озимой мягкой пшеницы. Формирование эмбриогенных структур зависит в большей степени от генотипа (46,52%). Вклад состава питательной среды был незначительным 1,82%, взаимодействие факторов со-

ставило 2,1%. Отмечено, что на значение числа регенерантов наибольшее влияние оказывал генотип 48,11%, влияние питательной среды было незначительным. Количество зеленых

растений-регенерантов зависело от генотипа (47,32%). Вклад питательной среды и взаимодействия генотип × среда были менее значимы, но статистически достоверными.

Библиографические ссылки

1. Головкин С.Г., Калинина Н.В., Яцына А.А., Вожжова Н.Н., Ионова Е.В. Изучение способности к андрогенезу в культуре пыльников озимой мягкой пшеницы // Зерновое хозяйство России. 2019. № 6(66). С. 41-45.
2. Грауда Д., Жагата К., Ланка Г., Страздиня В., Фетере В., Лисина Н., Красневска Н., Фокина О., Микельсоне А., Орницанс Р., Белогрудова И., Рашаль И. Генетическое разнообразие растений-регенерантов пшеницы (*Triticum aestivum* L.), созданных методом культуры пыльников // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016. № 20(4). С. 537-544. DOI 10.18699/VJ16.176
3. Дьячук Т.И., Акинина В.Н., Хомякова О.В., Кибкало И.А., Поминов А.В. Эффективность метода культуры пыльников для ускоренного создания гомозиготных линий тритикале // Успехи современного естествознания. № 11. 2017. С. 24-29. DOI: 10.17513/use.36576
4. Круглова Н.Н., Сельдиминова О.А. Сравнительная оценка частоты образования андроклиных эмбрионидов у родительских сортов, гибридов F_1 и ди гаплоидных линий гибридов F_1 яровой мягкой пшеницы // Пермский аграрный вестник. 2015. № 2(10). С. 66-71.
5. Barnabas B. Protocol for producing doubled haploid plants from anther culture of wheat (*Triticum aestivum* L.) // M. Maluszynski et al. (eds.). Doubled Haploid Production in Crop Plants. 2002. P. 65-70.
6. Dwivedi S.L., Britt A.B., Tripathi L., Sharma S., Upadhyaya H.D., Ortiz R. Haploids: Constraints and opportunities in plant breeding // Biotechnology Advances. Vol. 33. Issue 6. Part 1. 2015. 33. P. 812-829. DOI 10.1016/j.biotechadv.2015.07.001
7. Grauda D., Mikel'sone A., Lisina N., Žagata K., Ornican's R., Fokina O., Lapina L., Rashal I. Anther culture effectiveness in producing doubled haploids of cereals // Proceedings of the latvian academy of sciences. Section B. Vol. 68 (2014). No.3/4 (690/691). P. 142-147. DOI:10.2478/prolas-2014-0016.
8. Testillano P.S. Microspore embryogenesis: Targeting the determinant factors of stress-induced cell reprogramming for crop improvement. Journal of Experimental Botany. 2019. Vol. 70. 11 pp. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery464>.
9. 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. 2020. 9(1). 49 pp. <https://doi.org/10.3390/plants9010049>
10. Zheng M.Y., Bieren K., Griggs R. Developmental Dynamics of Wheat (*Triticum aestivum* L.) Microspores under Culture // Advances in Bioscience and Biotechnology. 2015. 6. P. 693-701. <http://dx.doi.org/10.4236/abb.2015.612072>.

References

1. Golovko S.G., Kalinina N.V., YAcyna A.A., Vozhzhova N.N., Ionova E.V. Izuchenie sposobnosti k androgenezu v kul'ture pyl'nikov ozimoy myagkoj pshenicy [Study of the ability to androgenesis of winter bread wheat anthers] // Zernovoe hozyajstvo Rossii. 2019. № 6(66). S. 41-45.
2. Grauda D., ŽHagata K., Lanka G., Strazdinya V., Fetere V., Lisina N., Krasnev'ska N., Fokina O., Mikel'sone A., Ornican's R., Belogrudova I., Rashal' I. Geneticheskoe raznoobrazie rastenij-regenerantov pshenicy (*Triticum aestivum* L.), sozdannyh metodom kul'tury pyl'nikov [Genetic diversity of wheat regenerant plants (*Triticum aestivum* L.) developed by the anther method] // Vavilovskij zhurnal genetiki i selekcii. 2016. № 20(4). S. 537-544. DOI 10.18699/VJ16.176
3. D'yachuk T.I., Akinina V.N., Homyakova O.V., Kibkalo I.A., Pominov A.V. Effektivnost' metoda kul'tury pyl'nikov dlya uskoren'nogo sozdaniya gomozygotnyh linij tritikale [The efficiency of the anther method for the accelerated development of homozygous triticale lines] // Uspekhi sovremennogo estestvoznaniya. № 11. 2017. S. 24-29. DOI: 10.17513/use.36576.
4. Kругlova N.N., Sel'dimirova O.A. Sravnitel'naya ocenka chastoty obrazovaniya androklinnyh embrioidov u roditel'skih sortov, gibridov F_1 i digaploidnyh linij gibridov F_1 yarovoj myagkoj pshenicy [Comparative estimation of the frequency of androclinal embryoid formation in parental varieties, F_1 hybrids and dihaploid lines of F_1 hybrids of spring bread wheat] // Permskij agrarnyj vestnik. 2015. № 2(10). S. 66-71.
5. Barnabas B. Protocol for producing doubled haploid plants from anther culture of wheat (*Triticum aestivum* L.) // M. Maluszynski et al. (eds.). Doubled Haploid Production in Crop Plants. 2002. R. 65-70.
6. Dwivedi S.L., Britt A.B., Tripathi L., Sharma S., Upadhyaya H.D., Ortiz R. Haploids: Constraints and opportunities in plant breeding // Biotechnology Advances. Vol. 33. Issue 6. Part 1. 2015. 33. R. 812-829. DOI 10.1016/j.biotechadv.2015.07.001.
7. Grauda D., Mikel'sone A., Lisina N., Žagata K., Ornican's R., Fokina O., Lapina L., Rashal I. Anther culture effectiveness in producing doubled haploids of cereals // Rroceedings of the latvian academy of sciences. Section B. Vol. 68 (2014). No.3/4 (690/691).R. 142-147. DOI:10.2478/prolas-2014-0016.
8. Testillano P.S. Microspore embryogenesis: Targeting the determinant factors of stress-induced cell reprogramming for crop improvement. Journal of Experimental Botany. 2019. Vol. 70. 11 pp. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery464>.
9. 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. 2020. 9(1). 49 rr. <https://doi.org/10.3390/plants9010049>.

10. Zheng M.Y., Bieren K., Griggs R. Developmental Dynamics of Wheat (*Triticum aestivum* L.) Microspores under Culture // Advances in Bioscience and Biotechnology. 2015. 6. R. 693-701. <http://dx.doi.org/10.4236/abb.2015.612072>.

Поступила: 5.10.21; принята к публикации: 10.11.21.

Критерии авторства. Авторы статьи подтверждают, что имеют на статью равные права и несут равную ответственность за плагиат.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Авторский вклад. Калинина Н.В. – концептуализация проблемы, сбор, подготовка и обработка информации, подготовка рукописи.

Автор прочитал и одобрил окончательный вариант рукописи.