

ИЗУЧЕНИЕ СПОСОБНОСТИ К АНДРОГЕНЕЗУ В КУЛЬТУРЕ ПЫЛЬНИКОВ ОЗИМОЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ

С. Г. Головкин, младший научный сотрудник лаборатории клеточной селекции,
ORCID ID: 0000-0002-2857-7210;

Н. В. Калинина, младший научный сотрудник лаборатории клеточной селекции,
ORCID ID: 0000-0002-2305-4189;

А. А. Яцына, кандидат биологических наук, младший научный сотрудник лаборатории клеточной селекции;

Н. Н. Вожжова, кандидат сельскохозяйственных наук, старший научный сотрудник,
зав. лабораторией клеточной селекции, ORCID ID: 0000-0002-2046-4000;

Е. В. Ионова, доктор сельскохозяйственных наук, руководитель центра
фундаментальных научных исследований, ORCID ID: 0000-0002-2840-6219

ФГБНУ «Аграрный научный центр «Донской»,

347740, Ростовская обл., г. Зерноград, Научный городок, 3; e-mail: vniizk30@mail.ru

Увеличение генетического разнообразия и ускорение селекционного процесса являются важнейшими задачами в селекции пшеницы. Практический интерес для селекции представляют биотехнологические методы *in vitro*. В статье рассмотрены вопросы влияния генотипов и питательных сред на образование регенерантов. Целью исследований являлись изучение способности к андрогенезу в культуре пыльников и выявление перспективных генотипов озимой мягкой пшеницы. Оценку способности к андрогенезу проводили на десяти образцах озимой пшеницы. Было высажено 8711 пыльников на среды индукции N6 и P2, для регенерации использовали среду 190-2. В результате проведенных исследований выявлено, что процесс возникновения новообразований зависит как от варианта используемой питательной среды, так и от выбранного генотипа. Доказано, что наиболее благоприятной средой для культивирования пыльников озимой мягкой пшеницы является среда N6. Установлено, что максимальный процент новообразований (5,21%) из пыльников озимой мягкой пшеницы зафиксирован у образца 595/13. Выяснено, что образцы 595/13 (9 растений) и Нива Дона (6 растений) селекции ФГБНУ «АНЦ «Донской» показали самую высокую отзывчивость на образование каллусов и растений-регенерантов. Получено 6 зеленых растений-регенерантов и 3 альбиносные формы из пыльцевого каллуса образца 595/13 и 4 зеленых растения-регенеранта и 2 альбиноса у образца Нива Дона.

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

Для цитирования: 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. DOI: 10.31367/2079-8725-2019-66-6-41-45.



THE STUDY OF THE ABILITY TO ANDROGENESIS IN THE WINTER SOFT WHEAT ANTHERS

S. G. Golovko, junior researcher of the laboratory of cell breeding, ORCID ID: 0000-0002-2857-7210;

N. V. Kalinina, junior researcher of the laboratory of cell breeding, ORCID ID: 0000-0002-2305-4189;

A. A. Yatsyna, Candidate of Biological Sciences, junior researcher of the laboratory of cell breeding;

N. N. Vozzhova, Candidate of Agricultural Sciences, senior researcher, head of the laboratory of cell breeding,
ORCID ID: 0000-0002-2046-4000;

E. V. Ionova, Doctor of Agricultural Sciences, head of the center of fundamental researches,
ORCID ID: 0000-0002-2840-6219

Agricultural Research Center "Donskoy",

347740, Rostov region, Zernograd, Nauchny Gorodok, 3; e-mail: vniizk30@mail.ru

The improvement of genetic diversity and acceleration of breeding process are the most important tasks in wheat breeding. *In vitro* biotechnological methods are of practical interest for breeding process. The current paper has considered the effects of genotypes and nutritive medium on the formation of regenerants. The purpose of the research was to study the ability to androgenesis in winter soft wheat anthers and to identify promising winter soft wheat genotypes. The estimation of the ability to androgenesis was carried out among ten winter wheat samples. 8711 anthers were planted on medium of N6 and PII induction; the 190-2 medium was used for regeneration. As a result of the study, it was found that the process of neoplasms occurrence depends both on the variant of the nutrient medium and on the chosen genotype. It has been proven that the most favorable medium for the cultivation of winter soft wheat anthers is medium N6. It was found that the maximum percentage of neoplasms (5.21%) from winter soft wheat anthers was recorded in the sample "595/13". It was found that the samples "595/13" (9 plants) and "Niva Dona" (6 plants) developed by the FSBSI "Agricultural Research Center "Donskoy" showed the highest responsiveness to the formation of calluses and plants-regenerants. There were obtained 6 green regenerants and 3 albino forms from the pollen callus of the sample "595/13" and 4 green regenerants and 2 albino regenerants from the sample "Niva Dona".

Keywords: winter soft wheat, genotype, androgenesis, anther culture, artificial nutritive medium, callus, moss-capsule, plant-regenerant.

Введение. Пшеница – одна из важнейших зерновых культур в мире, пригодная для многоцелевого использования. Для увеличения генетического раз-

нообразия и ускорения селекционного процесса в селекции пшеницы в настоящее время применяют методы культивирования *in vitro*. Практический интерес

для селекции представляет получение гаплоидов. Путем диплоидизации гаплоидов можно достигнуть гомозиготности по всем признакам. В случае удачной комбинации хромосом полученные константные формы у самоопылителей могут стать родоначальниками новых сортов (А. с. SU 1036306 А).

Для получения дигаплоидных линий в работе с озимой мягкой пшеницей и ее гибридами наиболее часто используют методы культуры пыльников и микроспор, предусматривающие создание условий для андрогенеза (Першина и др., 2013). Андрогенез – однополое размножение, при котором растение возникает из микроспоры или пыльцевого зерна без участия яйцеклетки (Картель и др., 1999). Принцип андрогенеза *in vitro* заключается в том, что репродуктивные клетки изолированных пыльников могут делиться и давать эмбриониды (зародышеподобные структуры). В некоторых случаях эмбриониды развиваются в гаплоидные растения (Nitch, 1969). Для многих видов характерен другой процесс: репродуктивные клетки образуют каллусную ткань, в которой индуцируется органогенез и формируются растения. Однако каллусная ткань, возникшая из пыльников, не всегда способна к морфогенезу (Шамина, 1981).

Согласно результатам исследований, проведенных с привлечением большого числа сортов и гибридов мягкой пшеницы, порядка 45–70% изученных генотипов способны к регенерации зеленых растений с частотой 0,4–3,6%. Успех андрогенеза зависит от многих факторов, таких как условия выращивания исходных растений, методы предобработки и культивирования пыльников, состав культуральной среды (Голованова, 2014). Однако определяющим является влияние генотипа на способность пыльников к андрогенезу (Першина, 2013).

Цель исследований состояла в изучении способности к андрогенезу в культуре пыльников и выявлении перспективных образцов озимой мягкой пшеницы.

Материалы и методы исследований. В качестве объекта исследований были взяты восемь образцов озимой мягкой пшеницы селекции ФГБНУ «АНЦ «Донской» (Зерноградка 11, Шеф, Нива Дона, Вольный Дон, Полина, Донской маяк, Краса Дона и 595/13) и два сорта селекции ФГБНУ «НЦЗ им. П. П. Лукьяненко» (Гром и Курс). Всего было высажено на искусственные питательные среды 8711 пыльников.

Растения-доноры были отобраны в поле из селекционных питомников ФГБНУ «АНЦ «Донской». Основной отбор побегов с колосьями проводили в утренние часы. Побеги, у которых влагище предпоследнего листа (последний лист флаговый) находились на уровне центральной части колоса (± 1 см), срезали на уровне почвы без повреждения последующих побегов. Местоположение колоса в листовой обертке определяли вручную. В колосьях, срезанных по указанному морфологическому признаку, микроспоры находились в одноядерной стадии развития. Отобранные побеги этикетировали и хранили в сосудах с водой при температуре +1–3 °С (Суханов, 1983).

Перед стерилизацией колос вынимали из листовой обертки, удаляли верхние и нижние цветки, а затем помещали в марлевый мешок, который затягивали синтетической ниткой. Таким образом колосья подготавливали для стерилизации. Стерилизовали объект в течение 20 минут в 0,1% растворе диацита. После удаления стерилизующего агента мешок с колосьями промывали 3–4 раза в стерильной воде. После промывки с помощью пинцета открывали затянутый ниткой мешок, вынимали колос и помещали в чашку Петри на стерильную фильтровальную бумагу для дальнейших манипуляций (Гончарова, 2012).

Для посадки использовали два нижних цветка из 14 колосков средней части колоса, самые нижние (1–4) и верхние (начиная с 15) удаляли (Суханов, 1983). При помощи пинцета и скальпеля колосья разделялись на отдельные цветки. Обрезали их нижние части и извлекали пыльники, которые с помощью металлического крючка переносили на поверхность питательной среды, по 30 пыльников в каждую пробирку. Извлечение пыльников из цветков и их посадку на питательную среду осуществляли в условиях бокса микробиологической безопасности.

Культивирование проводили на трех модифицированных питательных средах, из которых две – для индукции и одна – для регенерации. Все три среды были твердые агаризованные (7 г/л). Индукционные среды N6 (Ziand Hai-man, 1978) и Potato-2 (Chuang, 1978) содержали тиамин 3,0; пиридоксин – 1,0; 2,4-Д – 2; кинетин – 0,5 мг/л. В качестве источника углеводов использовали сахарозу (90 г/л). Отличие питательных сред индукции заключалось в том, что в среде P2 отсутствовали микроэлементы и мезо-инозит. Для регенерации использовали питательную среду 190-2 (Chuang and Jia, 1980), содержащую тиамин – 0,4; пиридоксин – 0,5; никотиновую кислоту – 0,5; глицин – 2; кинетин – 0,5; НУК – 0,5 мг/л и сахарозу – 30 г/л.

Пробирки с пыльниками помещали в термостат и инкубировали в темноте при температуре 25 ± 1 °С. Через 7 дней пробирки начинали просматривать под микроскопом и фиксировать время, количество и место образования каллусов (Лаврова, 2006). Через 25–43 дня после посадки пыльников на индукционную среду образовавшиеся каллусы пересаживали на среду регенерации, размер каллусов не превышал 2 мм. Пробирки с пересаженными каллусами инкубировали при температуре 25 °С в помещении с естественным освещением (Лукьянюк и Игнатова, 1980).

Особенности андрогенеза оценивали по количеству отозвавшихся пыльников, частоте образования каллусов и количеству полученных растений-регенерантов.

Результаты и их обсуждение. Способность пыльников озимой мягкой пшеницы к андрогенезу в значительной степени определяется влиянием генотипа и питательной среды. Образование каллусов у образцов происходило из расстреснувших пыльников, которые в процессе культивирования меняли цвет со светло-зеленого до желтовато-коричневого. Каллусообразование происходило в пределах одной теки пыльника. Редко встречались пыльники, у которых каллус образовывался сразу на двух теках (рис. 1).

Вначале образовывались шаровидные полупрозрачные молочного цвета каллусы, которые затем разрастались и приобретали белую или бледно-желтую окраску. Самое раннее появление новообразований зафиксировано через 25 дней у образцов 595/13 и Краса Дона, самое позднее – через 43 дня у сортов Нива Дона, Вольный Дон и Курс.

Изучение эффективности андрогенеза в культуре пыльников выявило статистически значимые различия всех параметров в сравнении со стандартным сортом Гром, который оказался неотзывчивым в условиях культивирования. Число отозвавшихся пыльников по всем изучаемым генотипам варьировало от 0 (Гром) до 22 (595/13) шт. (табл. 1).

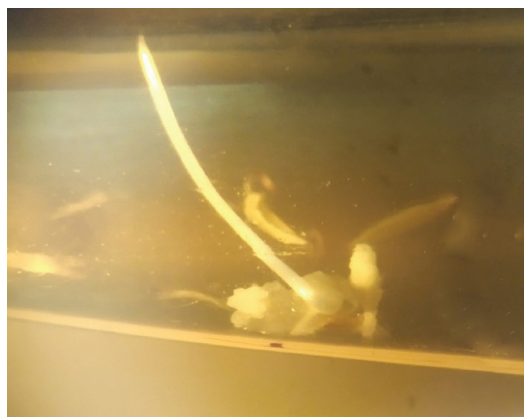
Сравнение средних значений частоты продуктивных пыльников показало, что лучшая реакция на условия культивирования на питательной среде N6 среди генотипов пшеницы установлена у образцов 595/13 (3,7%) и Нива Дона (0,98%). Различия в сравнении со

стандартом были достоверны для всех сортообразцов, причем выход новообразований у образца 595/13 составил 5,21% и был максимальным по сравнению с анализируемыми образцами озимой мягкой пшени-

цы. Соответствующий показатель у сорта Нива Дона был равен 1,57%. У остальных генотипов частота новообразований не превышала 1%.



а



б

Рис. 1. Каллусо- и эмбриогенез озимой мягкой пшеницы: а – каллусы; б – эмбрионд

Fig. 1. Callus and embryogenesis of winter soft wheat: a – calli; b – embryo

1. Влияние среды N6 на андрогенез генотипов озимой мягкой пшеницы 1. Effect of medium N6 on the androgenesis of winter soft wheat genotypes

№ п/п	Генотип	Число высаженных пыльников, шт.	Пыльники с каллусом		Новообразования	
			число, шт.	частота, %	число, шт.	частота, %
1	Гром, ст.	523	0	–	0	–
2	Зерноградка 11	423	2	0,47	2	0,47
3	Шеф	642	2	0,31	2	0,31
4	Нива Дона	508	5	0,98	8	1,57
5	Вольный Дон	525	4	0,76	4	0,76
6	Полина	534	1	0,19	1	0,19
7	595/13	595	22	3,70	31	5,21
8	Донской Маяк	525	1	0,19	1	0,19
9	Курс	790	3	0,38	3	0,38
10	Краса Дона	475	4	0,84	4	0,84
НСП ₀₅	–	1,86	–	1,14	–	–

Оценка андрогенеза пыльников изучаемых образцов озимой мягкой пшеницы на питательной среде Р2 показала неодинаковую реакцию на условия культивирования (табл. 2).

Так, из десяти изучаемых генотипов озимой пшеницы отзывчивыми оказались Нива Дона, Вольный

Дон и Курс. Причем максимальное число пыльников с новообразованиями наблюдалось у сорта Нива Дона (4 шт.) с частотой 1,63%, который превысил другие образцы и по выходу новообразований – 2,04% (5 шт.).

2. Влияние среды Potato 2 на андрогенез генотипов озимой мягкой пшеницы 2. Effect of medium Potato II on androgenesis of winter soft wheat genotypes

№ п/п	Генотип	Число высаженных пыльников, шт.	Пыльники с каллусом		Новообразования	
			число, шт.	частота, %	число, шт.	частота, %
1	Гром, ст.	269	0	–	0	–
2	Зерноградка 11	389	0	–	0	–
3	Шеф	759	0	–	0	–
4	Нива Дона	245	4	1,63	5	2,04
5	Вольный Дон	288	1	0,35	1	0,35
6	Полина	266	0	–	0	–
7	595/13	215	0	–	0	–
8	Донской Маяк	218	0	–	0	–
9	Курс	259	2	0,77	2	0,77
10	Краса Дона	213	0	–	0	–
НСП ₀₅	–	0,62	–	1,13	–	–

При культивировании 64 новообразований на регенерационной среде не все образцы проявили способность к регенерации проростков. Через 30 дней культивирования пыльцевого каллуса было зарегистрировано 15 растений-регенерантов у образцов 595/13 (9 растений) и Нива Дона (6 растений),

10 из которых были зелеными. Отмечалось появление у одного каллуса одновременно как зеленых, так и хлорофиллдефектных (альбиносных) регенерантов. Наибольшее количество зеленых растений было получено у образца 595/13 – 6 шт. при частоте регенерации зеленых растений 66,7% (рис. 2).

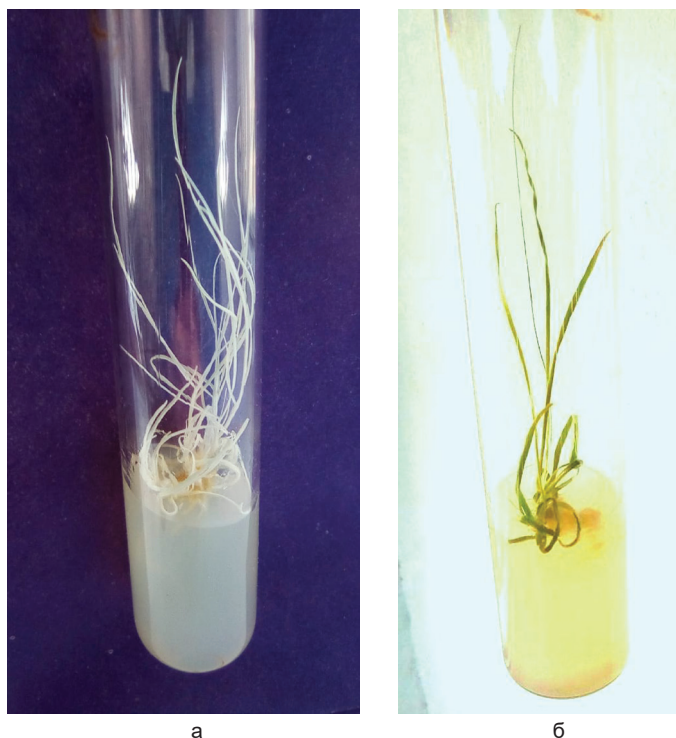


Рис. 2. Растения-регенеранты: а – зеленые; б – альбиносные
Fig. 2. Plants regenerants: a – green; b – albino

Частота образования зеленых растений и частота регенерации в целом зависели от генотипа и состава среды для регенерации.

Анализ полученных данных показал, что процесс возникновения новообразований зависит как от варианта среды, так и от генотипа. Лучшим вариантом для новообразований, как видно из таблиц, является среда N6 для всех генотипов. По всей видимости, это связано с отсутствием в питательной среде P2 микроэлементного состава и мезо-инозита. Сорт Гром (селекции ФГБНУ «НЦЗ им. П. П. Лукьяненко»), который был взят за стандарт, так как был получен с помощью биотехнологических методов, в нашем случае не показал никаких результатов. Но это не свидетельствует о том, что микроспоры данного сорта вообще не способны давать каллус. Возможно, данные условия оказались неблагоприятными для андрогенеза

этих генотипов. Самый высокий ответ *in vitro* был получен у образцов 595/13 и Нива Дона.

Выводы. В результате проведенных исследований было доказано, что наиболее благоприятной средой для андрогенеза пыльников озимой мягкой пшеницы является среда N6.

Установлено, что максимальный процент новообразований (5,21%) из пыльников озимой мягкой пшеницы зафиксирован у образца 595/13. Выявлено, что образцы 595/13 (9 растений) и Нива Дона (6 растений) селекции ФГБНУ «АНЦ «Донской» показали самую высокую отзывчивость на образование каллусов и растений-регенерантов. Наибольшее количество растений-регенерантов из пыльцевого каллуса получено у образца 595/13 (6 зеленых и 3 альбиноса) и у образца Нива Дона (4 зеленых и 2 альбиноса).

Библиографические ссылки

1. Голованова И. В. Экспериментальная гаплоидия у мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L. // Проблемы ботаники Южной Сибири и Монголии: XIII Междунар. науч.-практ. конференция. Барнаул, 2014. С. 60–63.
2. Гончарова Ю. К. Использование метода культуры пыльников селекции риса. Краснодар: ВНИИ риса, 2012. 91 с.
3. Картель Н. А., Макеева Е. Н., Мезенко А. М. Генетика: энциклопедический словарь. Минск: Тэхналогія, 1999. 448 с.
4. Лаврова Н. В. Гаплоидные биотехнологии в селекции озимой пшеницы // Вестник КГУ им. Н. А. Некрасова. 2006. № 4. С. 22–25.
5. Першина Л. А., Осадчая Т. С., Бадаева Е. Д., и др. Изучение особенностей андрогенеза в культуре пыльников сортов и перспективной формы яровой мягкой пшеницы западносибирской селекции, различающихся наличием или отсутствием пшенично-чужеродных транслокаций // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2013. Т. 17, № 1. С. 40–48.

6. Суханов В. М., Ключков В. П., Хохлов С. С., Тырнов В. С. Использование культуры пыльников для получения гаплоидов // Культура клеток растений. Киев: Наукова думка, 1978. С. 312–314.
7. Шамина З. Б. Андрогенез и получение гаплоидов в культуре пыльников и микроспор // Культура клеток растений. М.: Наука, 1981. 168 с.
8. Nitch J. P., Nitck C. Haploid plants from pollen grains // Science. 1969. Vol. 163, no. 3862. Pp. 85–87.

References

1. Golovanova I. V. Eksperimental'naya gaploidiya u myagkoj pshenicy *Triticum aestivum* L. [Experimental haploidy in soft wheat *Triticum aestivum* L.] // Problemy botaniki Yuzhnoj Sibiri i Mongolii: XIII Mezhdunar. nauch.-prakt. konferenciya. Barnaul, 2014. S. 60–63.
2. Goncharova Yu. K. Ispol'zovanie metoda kul'tury pyl'nikov selekcii risa [The use of anther culture of rice breeding]. Krasnodar: VNII risa, 2012. 91 s.
3. Kartel' N. A., Makeeva E. N., Mezenko A. M. Genetika: enciklopedicheskij slovar' [Genetics: an encyclopedic dictionary]. Minsk: Tekhnalogiya, 1999. 448 s.
4. Lavrova N. V. Gaploidnye biotekhnologii v selekcii ozimoy pshenicy [Haploid biotechnologies in winter wheat breeding] // Vestnik KGU im. N. A. Nekrasova. 2006. № 4. S. 22–25.
5. Pershina L. A., Osadchaya T. S., Badaeva E. D, i dr. Izuchenie osobennostej androgeneza v kul'ture pyl'nikov sortov i perspektivnoj formy yarovoj myagkoj pshenicy Zapadnosibirskoj selekcii, razlichayushchihsya nalichiem ili otsutstviem pshenichno-chuzherodnyh translokacij [The study of androgenesis in the anther culture of varieties and the promising form of spring soft wheat of West Siberian breeding, differing by the presence or absence of wheat-foreign translocations] // Vavilovskij zhurnal genetiki i selekcii. 2013. T. 17, № 1. S. 40–48.
6. Suhanov V. M., Klochkov V. P., Hohlov S. S., Tyrnov B. C. Ispol'zovanie kul'tury pyl'nikov dlya polucheniya gaploidov [The use of anther culture to produce haploids] // Kul'tura kletok rastenij. Kiev: Naukova dumka, 1978. S. 312–314.
7. Shamina Z. B. Androgenez i poluchenie gaploidov v kul'ture pyl'nikov i mikrospor [Androgenesis and production of haploids in the culture of anthers and microspores] // Kul'tura kletok rastenij. M.: Nauka, 1981. 168 s.
8. Nitch J. P., Nitck C. Haploid plants from pollen grains // Science. 1969. Vol. 163, no. 3862. Pp. 85–87.

Поступила: 16.10.19; принята к публикации: 18.10.19.

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: Вожжова Н. Н., Ионова Е. В., Яцына А. А. – концептуализация исследования; Головкин С. Г., Калинина Н. В., Яцына А. А. – подготовка опыта, выполнение лабораторных опытов и сбор данных, анализ данных и их интерпретация, подготовка рукописи.

Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.