

Получение растений-регенерантов озимой мягкой пшеницы с использованием метода культуры пыльников

Н. В. Калинина^{1✉}, Д. М. Марченко¹

¹ Аграрный научный центр «Донской», Зерноград, Россия

✉ E-mail: kalinina74783@mail.ru

Аннотация. Цель исследования – оценить влияние условий культивирования и генотипа образцов озимой мягкой пшеницы на образование эмбрионного каллуса и регенерационную способность, получить растения-регенеранты для создания нового исходного материала в селекции новых сортов. **Научная новизна.** Определена доля влияния индукционных питательных сред различного состава и генотипа на выход растений-регенерантов озимой пшеницы в культуре пыльников, выявлены новые образцы с высоким регенерационным потенциалом. **Методы.** Объектом исследований были растения-доноры озимой мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) поколения F₃ из селекционных питомников отдела озимой пшеницы ФГБНУ «АНЦ «Донской»: 13 гибридных комбинаций лаборатории селекции и семеноводства озимой мягкой пшеницы полунтенсивного типа. В работе использовался метод получения гаплоидов в культуре пыльников *in vitro*, который включал следующие методики: стерилизация при проведении работ с *in vitro*; приготовление питательных сред; отбор и предобработка растительных эксплантов; определение стадии развития микроспор; выделение и посадка пыльников на индукционную питательную среду; регенерация растений из каллусных тканей. **Результаты.** Установлены наиболее благоприятные для индукции андрогенеза *in vitro* питательные среды. Зафиксирован максимальный процент новообразований из пыльников озимой мягкой пшеницы у образца Вольница × Герда. Получено наибольшее количество зеленых растений-регенерантов гаплоидов из пыльцевого каллуса у образцов Вольница × Герда, Капитан × Вольный Дон. Выявлено, что вклад генотипа и питательной среды в количество новообразований и регенерацию зеленых растений был статистически достоверным.

Ключевые слова: озимая мягкая пшеница, гибридная комбинация, культура пыльников, андрогенез, искусственная питательная среда, новообразование, растение-регенерант.

Для цитирования: Калинина Н. В., Марченко Д. М. Получение растений-регенерантов озимой мягкой пшеницы с использованием метода культуры пыльников // Аграрный вестник Урала. 2022. № 07 (222). С. 58–67. DOI: 10.32417/1997-4868-2022-222-07-58-67.

Дата поступления статьи: 24.03.2022, **дата рецензирования:** 04.04.2022, **дата принятия:** 15.04.2022.

Постановка проблемы (Introduction)

Для увеличения генетического разнообразия 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 у перекрестников – линий, необходимых для производства высокогетерозисных гибридов [1, с. 14; 2, с. 88; 3, с. 35].

Необходимость проведения таких работ связана с тем, что в процессе длительной селекции, ориентированной на высокую продуктивность и

качество, произошло сильное по сравнению с дикорастущими сородичами обеднение генофонда культурных растений по генам, контролирующим признаки устойчивости к биотическим (вредителям и возбудителям болезней) и разным абиотическим факторам. Например, сорта мягкой пшеницы, в том числе возделываемые в разных регионах, стали однотипными по основным генам, ответственным за устойчивость к грибным патогенам. Развитие вирулентных патотипов грибов приводит к быстрому их распространению и масштабному поражению сортов. Кроме того, изменения климата, воздействие техногенных и антропогенных факторов приводят к изменениям условий выращивания культур, что требует создания сортов, устойчивых ко многим абиотическим стрессам, в том числе к засухе, за-

топлению, высоким и низким температурам, засолению и т. п. [4, с. 60; 5, с. 43; 6, с. 4].

Для получения дигаплоидных линий используют методы культивирования пыльников, изолированных микроспор, завязей и семяпочек и скрещивания с гаплопродуцерами. В работе с озимой мягкой пшеницей и ее гибридами наиболее часто используют методы культивирования пыльников и микроспор, предусматривающие создание условий для андрогенеза *in vitro*. Этот метод позволяет получать новые формы пшеницы в кратчайшие сроки и без привлечения больших площадей. В настоящее время в мире технология культивирования изолированных пыльников является неотъемлемой частью процесса селекции пшеницы. Однако, несмотря на положительные результаты, многие проблемные вопросы все еще остаются нерешенными [7, с. 154; 8, с. 2967; 9, с. 6].

Универсальная для зерновых культур технология получения гаплоидных растений в культуре пыльников отсутствует, 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. Кроме этого, 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 [10, с. 15; 11, с. 9285; 12, с. 130].

Эффективность данного метода оценивается по частоте получения жизнеспособных зеленых растений, из которых в конечном счете будут получены необходимые для дальнейшей работы дигаплоидные линии. Известно, что 40–70 % генотипов мягкой пшеницы способны к регенерации растений с частотой 0,4–3,6 %. Это обусловлено тем, что каждый из основных этапов андрогенеза: образование каллусов/ эмбриоидов, регенерация, развитие зеленых и альбиносных проростков – находится под влиянием ядерного генома и цитоплазмы [13, с. 858; 14, с. 23; 15, с. 131].

Исследования, направленные на выявление образцов озимой мягкой пшеницы с высоким регенерационным потенциалом в культуре пыльников *in vitro* и вовлечение их в создание нового селекционного материала являются актуальными.

Цель исследования – оценить влияние условий культивирования и генотипа образцов озимой мягкой пшеницы на образование эмбриогенного каллуса и регенерационную способность, получить растения-регенеранты для создания нового исходного материала в селекции новых сортов.

Методология и методы исследования (Methods)

В эксперименте были исследованы растения-доноры озимой мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) поколения F₃. Растительный материал был получен из селекционных питомников отдела озимой пшеницы ФГБНУ «АНЦ «Донской»: 13 гибридных комбинаций лаборатории селекции и семеноводства озимой мягкой пшеницы полунтенсивного

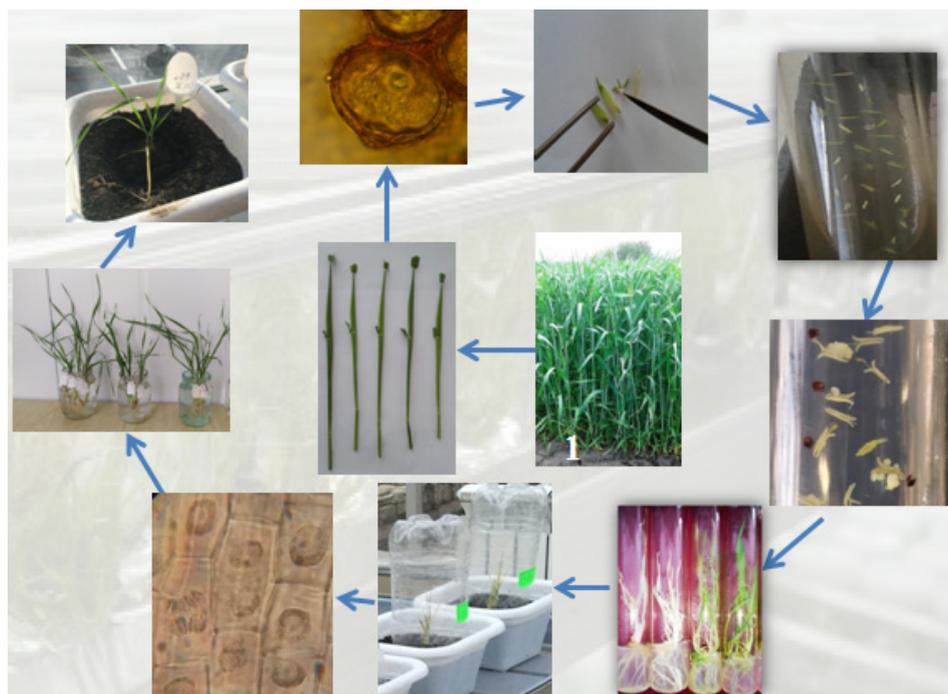


Рис. 1. Получение растений-регенерантов озимой мягкой пшеницы
Fig. 1. Development of regenerated plants of winter bread wheat

типа (Капитан × Амбар, Вольница × 586/13, Сват × Аксинья, Собербаш × 1408/15, Вольница × Сват, 273/16 × Шеф, Вольница × Герда, Гигант × Краса Дона, Лилит × Алексеич, Вольница × Донская степь, 586/13 × Алексеич, Велена × Лидия, Капитан × Вольный Дон).

Основной отбор побегов с колосьями для посадки пыльников проводили в утренние часы в ясную сухую погоду. Побег, у которых влагище предпоследнего листа (последний лист флаговый) находилось на уровне центральной части колоса (± 1 см), срезали на уровне почвы без повреждения последующих побегов. Местоположение колоса в листовой обертке определяли вручную. Поверхность отобранных побегов обрабатывали 96-процентным этиловым спиртом, чтобы в дальнейшем повысить эффект основного стерилизующего раствора. Донорные колосья хранили в сосудах с водопроводной водой в темноте при температуре 2–4 °С в течение 7–14 дней. Перед извлечением пыльников проводили определение стадии развития микроспор под микроскопом. Из 2–3 цветков средней части колоса выделяли пыльники, помещали на предметное стекло, раздавливали. Добавляли две капли ацеткармина, нагревали над спиртовкой, оставляли для окрашивания (10–15 минут), накрывали покровным стеклом и готовый препарат исследовали. Стадию развития определяли по форме микроспор, по числу и расположению ядер в клетке. Подходящими для посадки являются пыльники, микроспоры которых находятся на средней и поздней одноядерной стадии развития. Колосья, содержащие одноядерные микроспоры, подвергали поверхностной стерилизации 5-процентным раствором гипохлорита натрия в течение 10 минут и затем трижды промывали стерильной дистиллированной водой.

Для культивирования растительных эксплантов использовали три среды, из которых N6, W14, NPB-99 – для индукции андрогенеза, 190-2 – для регенерации растений из пыльцевого каллуса. Все среды были твердыми агаризованными (7 г/л). Индукционные среды отличались от сред регенерации не только по содержанию макро-, микроэлементов, но и по составу и содержанию фитогормонов и углеводов.

Индукционная среда W14 была близка по содержанию макроэлементов 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 тиамин (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 средах N6 и W14 присутствовал один ауксин 2,4-Д (2 мг/л). Во всех трех средах было одинаковое содержание цитокининов кинетин (0,5 мг/л) и зеатин (0,05 мг/л). В питательной среде 190-2 содержались кинетин (0,5 мг/л), НУК (0,5 мг/л) и сахара (30 г/л). Далее из колосьев выделяли пыльники и помещали в культуральные пробирки по 30 шт. на индукционную среду. Всего было высажено на индукционные питательные среды 8690 шт. пыльников. Их культивировали в термостате при температуре 25–27 °С без доступа света в течение 5–6 недель до появления новообразований. Ежедневно наблюдали за процессом роста культуры (рис. 1).

Через 5–6 недель после посадки пыльников на индукционную среду образовавшиеся структуры пересаживали на среду регенерации, размер каллусов не превышал 2 мм. Новообразования инкубировали в ростовой комнате на фитостеллажах (НЛО 79-01-00) при 24–25 °С, фотопериоде 16 ч / 8 ч (день/ночь), освещенности 3000 люкс, влажности 70 %. Ежедневно наблюдали за регенерацией растений. Инкубацию проводили около 4 недель. Полученные зеленые растения-регенеранты отправляли в пробирках в холодильник для прохождения яровизации при пониженной температуре (2–4 °С) на 40 дней.

Зеленые проростки на стадии не менее трех листьев с хорошо развитыми корнями были аккуратно высажены в вегетационные сосуды, наполненные смесью из предварительно просеянной почвы, песка и торфа (1:1:1). Для поддержания влажности их прикрывали стаканами. В течение трех недель проростки подкармливали жидкой средой MS, наполовину разбавленной водой, за это время удаляли стаканы, таким образом подготавливали растения к диплоидизации и пересадке в большие горшки (ящики) в теплицу.

Анализ результатов включал оценку влияния генотипа и питательных сред на гаплопродукционную способность, были определены следующие признаки: частота возникновения новообразований, частота регенерации зеленых растений, частота регенерации растений-альбиносов. Данные параметры были выражены в процентах. Кроме этого, был проведен двухфакторный дисперсионный анализ для определения доли влияния генотипов и состава питательной среды на выход новообразований и зеленых растений-регенерантов. Математическая и статистическая обработка данных проводилась по методике полевого опыта Б. А. Доспехова.

Результаты (Results)

В результате эксперимента из колосьев гибридных популяций F₃ лаборатории селекции и семеноводства озимой мягкой пшеницы полуинтенсивного типа было извлечено и высажено на питательную среду N6 – 2930 пыльников, в среднем по 225 шт. на образец, на среду W14 – 2895 пыльников, в среднем 222 шт., на среду NPB-99 – 2865 пыльников, в среднем по 220 шт. на образец (таблица 1).

Эффективность андрогенеза *in vitro* в культуре пыльников образцов озимой мягкой пшеницы на разных питательных средах, 2021 г.

Образец	Индукционная среда	Число высаженных пыльников, шт.	Количество пыльников с новообразованиями		Количество новообразований	
			Число, шт.	Частота, %	Число, шт.	Частота, %
Капитан × Амбар	N6	228	1	0,44	1	0,44
	W14	218	не обн.*	не обн.	не обн.	не обн.
	NPB-99	207	1	0,48	1	0,48
Вольница × 586/13	N6	193	не обн.	не обн.	не обн.	не обн.
	W14	237	не обн.	не обн.	не обн.	не обн.
	NPB-99	127	не обн.	не обн.	не обн.	не обн.
Сват × Аксинья	N6	445	19	4,27	26	5,84
	W14	389	7	1,8	16	4,11
	NPB-99	371	1	0,27	1	0,27
Собербаш × 1408/15	N6	330	не обн.	не обн.	не обн.	не обн.
	W14	265	не обн.	не обн.	не обн.	не обн.
	NPB-99	407	не обн.	не обн.	не обн.	не обн.
Вольница × Сват	N6	175	не обн.	не обн.	не обн.	не обн.
	W14	183	не обн.	не обн.	не обн.	не обн.
	NPB-99	383	не обн.	не обн.	не обн.	не обн.
273/16 × Шеф	N6	434	2	0,46	4	0,92
	W14	359	не обн.	не обн.	не обн.	не обн.
	NPB-99	338	не обн.	не обн.	не обн.	не обн.
Вольница × Герда	N6	117	5	4,27	8	6,84
	W14	104	15	14,42	42	40,38
	NPB-99	95	13	13,68	29	30,53
Гигант × Краса Дона	N6	183	17	9,29	36	19,67
	W14	173	16	9,25	25	14,45
	NPB-99	140	3	2,14	6	4,29
Лилит × Алексеич	N6	117	2	1,71	2	1,71
	W14	191	4	2,09	6	3,14
	NPB-99	191	не обн.	не обн.	не обн.	не обн.
Вольница × Донская степь	N6	279	1	0,36	1	0,36
	W14	196	1	0,51	1	0,51
	NPB-99	155	не обн.	не обн.	не обн.	не обн.
586/13 × Алексеич	N6	119	не обн.	не обн.	не обн.	не обн.
	W14	126	2	1,59	2	1,59
	NPB-99	98	1	1,02	1	1,02
Велена × Лидия	N6	174	1	0,57	1	0,57
	W14	229	2	0,87	2	0,87
	NPB-99	147	не обн.	не обн.	не обн.	не обн.
Капитан × Вольный Дон	N6	136	4	2,94	12	8,82
	W14	225	9	4	15	6,67
	NPB-99	206	2	0,97	2	0,97
Сумма	N6	2930	52	24,32	91	45,18
	W14	2895	56	34,54	109	71,73
	NPB-99	2865	21	18,57	38	36,59
Средняя	N6	225,38	4	1,77	7	3,1
	W14	222,69	4,31	1,93	8,38	3,76
	NPB-99	220,38	1,62	0,73	2,92	1,32
НСР ₀₅	N6	–	3,15	–	6,73	–
	W14	–	1,51	–	3,23	–
	NPB-99	–	1,51	–	3,23	–

Примечание. * Не обнаружено отзвучивших пыльников/новообразований.

Table 1
The efficiency of androgenesis in vitro in anther culture of winter bread wheat on various nutrient media, 2021

Sample	Induction medium	Number of planted anthers, pcs.	Number of anthers with new formations		Number of new formations	
			Number, pcs.	Frequency, %	Number, pcs.	Frequency, %
Kapitan × Ambar	N6	228	1	0.44	1	0.44
	W14	218	not found*	not found	not found	not found
	NPB-99	207	1	0.48	1	0.48
Vol'nitsa × 586/13	N6	193	not found	not found	not found	not found
	W14	237	not found	not found	not found	not found
	NPB-99	127	not found	not found	not found	not found
Svat × Aksin'ya	N6	445	19	4.27	26	5.84
	W14	389	7	1.8	16	4.11
	NPB-99	371	1	0.27	1	0.27
Soberbash × 1408/15	N6	330	not found	not found	not found	not found
	W14	265	not found	not found	not found	not found
	NPB-99	407	not found	not found	not found	not found
Vol'nitsa × Svat	N6	175	not found	not found	not found	not found
	W14	183	not found	not found	not found	not found
	NPB-99	383	not found	not found	not found	not found
273/16 × Shef	N6	434	2	0.46	4	0.92
	W14	359	not found	not found	not found	not found
	NPB-99	338	not found	not found	not found	not found
Vol'nitsa × Gerda	N6	117	5	4.27	8	6.84
	W14	104	15	14.42	42	40.38
	NPB-99	95	13	13.68	29	30.53
Gigant × Krasa Dona	N6	183	17	9.29	36	19.67
	W14	173	16	9.25	25	14.45
	NPB-99	140	3	2.14	6	4.29
Lilit × Alekseich	N6	117	2	1.71	2	1.71
	W14	191	4	2.09	6	3.14
	NPB-99	191	not found	not found	not found	not found
Vol'nitsa × Donskaya Step'	N6	279	1	0.36	1	0.36
	W14	196	1	0.51	1	0.51
	NPB-99	155	not found	not found	not found	not found
586/13 × Alekseich	N6	119	not found	not found	not found	not found
	W14	126	2	1.59	2	1.59
	NPB-99	98	1	1.02	1	1.02
Velena × Lidiya	N6	174	1	0.57	1	0.57
	W14	229	2	0.87	2	0.87
	NPB-99	147	not found	not found	not found	not found
Kapitan × Vol'nyy Don	N6	136	4	2.94	12	8.82
	W14	225	9	4	15	6.67
	NPB-99	206	2	0.97	2	0.97
Total	N6	2930	52	24.32	91	45.18
	W14	2895	56	34.54	109	71.73
	NPB-99	2865	21	18.57	38	36.59
Average	N6	225.38	4	1.77	7	3.1
	W14	222.69	4.31	1.93	8.38	3.76
	NPB-99	220.38	1.62	0.73	2.92	1.32
LSD ₀₅	N6	-	3.15	-	6.73	-
	W14	-	1.51	-	3.23	-
	NPB-99	-	1.51	-	3.23	-

Note.* No responsive anthers / new formations found.

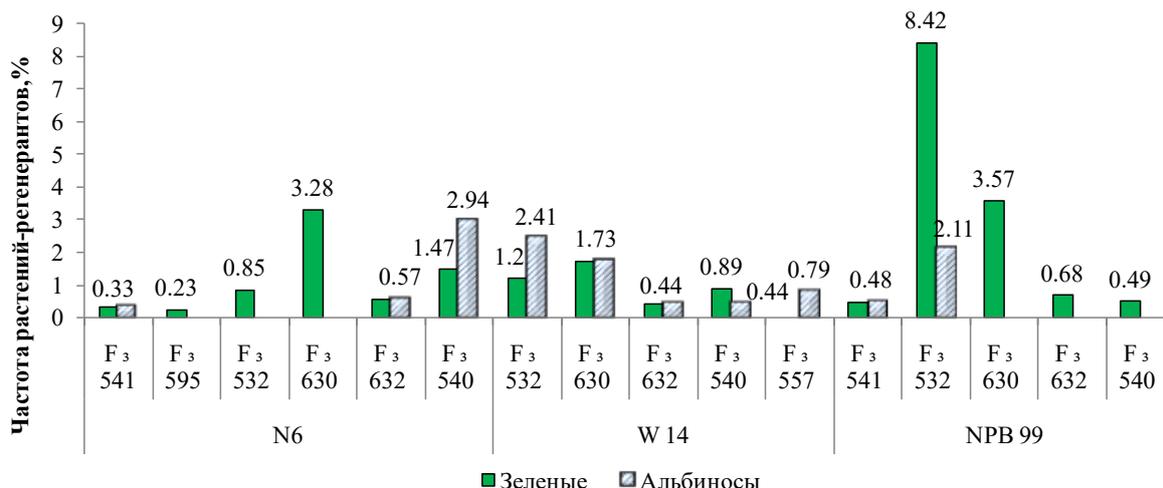


Рис. 2. Частота регенерации растений озимой мягкой пшеницы в зависимости от питательной среды и генотипа, 2021:

F₃ 541 (Капитан × Амбар), F₃ 595 (273/16 × Шеф), F₃ 532 (Вольница × Герда), F₃ 630 (Гигант × Краса Дона), F₃ 632 (Велена × Лидия), F₃ 540 (Капитан × Вольный Дон), F₃ 557 (586/13 × Алексеич)

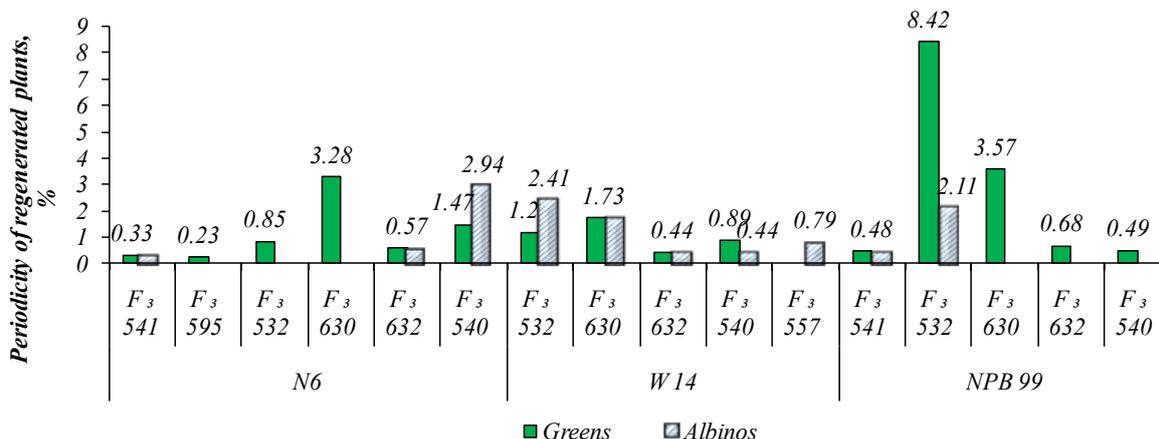


Fig. 2. Periodicity of regeneration of winter bread wheat plants depending on nutrient medium and a genotype, 2021:

F₃ 541 (Kapitan × Ambar), F₃ 595 (273/16 × Shef), F₃ 532 (Vol'nitsa × Gerda), F₃ 630 (Gigant × Krasa Dona), F₃ 632 (Velena × Lidiya), F₃ 540 (Kapitan × Vol'nyy Don), F₃ 557 (586/13 × Alekseich)

Количество отзывчивых пыльников на среде N6 варьировало по гибридным комбинациям F₃ от 0 до 19 шт. (с частотой 0–4,27 %). По количеству отзывчивых пыльников выделились следующие образцы: Сват × Аксинья (19 шт. с частотой 4,27 %), Вольница × Герда (5 шт. с частотой 4,27 %), Гигант × Краса Дона (17 шт. с частотой 9,29 %), Капитан × Вольный Дон (4 шт. с частотой 2,94 %). Всего по гибридным комбинациям F₃ на среде N6 было отмечено 52 отзывчивых пыльника со средней частотой отзывчивости от числа высаженных 1,77 %.

На среде W14 количество отзывчивых пыльников варьировало по образцам от 0 до 16 шт. (с частотой 0–14,42 %). Наибольшее значение отмечено у гибридов F₃ Вольница × Герда (15 шт. с частотой 14,42%), Гигант × Краса Дона (16 шт. с частотой 9,25 %), Капитан × Вольный Дон (9 шт., с частотой 4,0 %). Всего по комбинациям F₃ на среде W14 было

отмечено 56 отзывчивых пыльников со средней частотой отзывчивости от числа высаженных 1,93 %.

Варьирование количества отзывчивых пыльников на среде NPB-99 по изучаемым образцам составило от 0 до 13 шт. (0–13,68%). По отзывчивости пыльников на каллусообразование на индукционной среде NPB-99 выделились такие гибридные комбинации F₃, как Вольница × Герда (13 шт. с частотой 13,68 %), Гигант × Краса Дона (3 шт. с частотой 2,14 %), 586/13 × Алексеич (1 шт. с частотой 1,02 %), Капитан × Вольный Дон (2 шт. с частотой 0,97 %). Всего по гибридам F₃ на среде NPB-99 был отмечен 21 отзывчивый пыльник со средней частотой отзывчивости 0,73 %.

Лучшая реакция на условия культивирования пыльников установлена на средах W14 и NPB-99 у образца Вольница × Герда (с частотой 14,42 % и 13,68% соответственно), а на среде N6 – Гигант ×

Краса Дона (9,29 %). Также перечисленные гибридные популяции проявили себя в способности к новообразованиям. У остальных образцов количество новообразований было либо ниже, либо не обнаружено.

Средний процент новообразования с учетом неотозвавшихся пыльников у образцов озимой мягкой пшеницы на среде N6 составил 3,1 %, на среде W14 – 3,76 %, на среде NPB-99 – 1,32 %. Оценка существенности частных различий по НСР₀₅ достоверно установила влияние состава питательных сред на выход новообразований у разных генотипов. Так, существенное влияние на число новообразований питательной среды N6 отмечено у гибридных популяций F₃ Сват × Аксинья (26 шт. с частотой 5,84 %), Гигант × Краса Дона (36 шт. с частотой 19,67 %). На среде W14 – Вольница × Герда (42 шт. с частотой 40,38 %), Гигант × Краса Дона (25 шт. с частотой 14,45 %), Сват × Аксинья (16 шт., с частотой 4,11 %), Капитан × Вольный Дон (15 шт. с частотой 6,67 %), на среде NPB-99 – Вольница × Герда (29 шт. с частотой 30,53 %). Всего было получено 238 новообразований, в том числе на среде N6 – 91 шт. (3,1 % от числа высаженных пыльников), W14 – 109 шт. (3,76 %), на среде NPB-99 – 38 шт. (1,32 %).

Изучаемые гибридные комбинации характеризовались различными показателями частоты образования растений-регенерантов. Максимальная частота регенерации растений из каллусов, индуцированных на среде N6, была отмечена у генотипа Гигант × Краса Дона (F₃ 630) – 3,28 % (рис. 2).

Количество альбиносных растений на этой среде было максимальным, в том числе у генотипа Капитан × Вольный Дон (F₃ 540) оно составило 2,94 %. Наибольшее число зеленых растений-регенерантов отмечено у образцов Гигант × Краса Дона (F₃ 630) – 3,28 % и Капитан × Вольный Дон (F₃ 540) – 1,47 %.

На среде W14 максимальная частота регенерации зеленых растений была у двух гибридных комбинаций: Гигант × Краса Дона (F₃ 630) – 1,73 % и Вольница × Герда (F₃ 532) – 1,2 %, а альбиносных растений – у тех же генотипов 1,73 % и 2,41 % соответственно.

Самая высокая частота регенерации зеленых растений наблюдалось после индукции пыльников на среде NPB-99 у тех же генотипов 3,57 и 8,42 % соответственно. Среди альбиносных растений выделился генотип Вольница × Герда (F₃ 532) – 2,11 %.

Для определения долей влияния главных эффектов (генотипа, питательных сред) и их взаимодействия на выход растений был проведен двухфакторный дисперсионный анализ, который позволил выявить вклад изучаемых факторов в количество новообразований и число зеленых растений-регенерантов (таблица 2).

Вклад генотипа в количество новообразований был значительным (34,55 %) и статистически достоверным ($F_{\text{факт.}} > F_{\text{таб. 095}}$). То есть отзывчивость пыльников на тех или иных средах является генотипспецифическим фактором. Влияние питательной среды и эффекта взаимодействия факторов составило 27,18 % и 25,78 % соответственно, но существенные различия в опыте были лишь по питательной среде ($F_{\text{факт.}} > F_{\text{таб. 095}}$).

Таблица 2
Влияние генотипа, состава питательных сред на выход новообразований и зеленых растений-регенерантов, 2021

Фактор	Количество новообразований			Число зеленых растений-регенерантов		
	Доля влияния, %	$F_{\text{факт}}$	$F_{\text{таб. 095}}$	Доля влияния, %	$F_{\text{факт}}$	$F_{\text{таб. 095}}$
Генотип	34,55	2,29	2,2	32,60	2,39	2,2
Питательная среда	27,18	5,99	4,3	41,57	6,15	4,3
Взаимодействие генотип × питательная среда	25,78	0,51	2,06	25,40	0,79	2,06
Прочие факторы	12,49	–	–	10,43	–	–

Table 2
The influence of a genotype and a composition of nutrient media on a number of new formations of green regenerated plants, 2021

Factor	Number of new formations			Number of green regenerated plants		
	Proportion of influence, %	F_{fact}	$F_{\text{tab 095}}$	Proportion of influence, %	F_{fact}	$F_{\text{tab. 095}}$
Genotype	34.55	2.29	2.2	32.60	2.39	2.2
Nutrient medium	27.18	5.99	4.3	41.57	6.15	4.3
Genotype × medium	25.78	0.51	2.06	25.40	0.79	2.06
Other factors	12.49	–	–	10.43	–	–

Прочие факторы составили 12,49 %. Значительный и достоверный вклад в формирование зеленых растений-регенерантов оказал генотип – 32,6 % ($F_{\text{факт.}} > F_{\text{таб. 095}}$). Влияние фактора питательной среды было существенным ($F_{\text{факт.}} > F_{\text{таб. 095}}$) и составляло 41,57 %. Прочие факторы не оказали значительного влияния.

Обсуждение и выводы (Discussion and Conclusion)

При посеве пыльников гибридных комбинаций F_3 озимой мягкой пшеницы на искусственные питательные среды (в частности, с разным содержанием макро- и микросолей) установлено, что наиболее благоприятными для индукции андрогенеза *in vitro* питательными средами являются N6 и W14. Результаты исследований показали, что средняя частота возникновения новообразований на среде W14

была наибольшей (3,76 %). Максимальный процент новообразований из пыльников озимой мягкой пшеницы зафиксирован у образца Вольница × Герда (40,38 %).

Выделены образцы с самым высоким регенерационным потенциалом Вольница × Герда (17 растений), Гигант × Краса Дона (21 растение), Капитан × Вольный Дон (15 растений). Получено наибольшее количество зеленых растений-регенерантов гаплоидов из пыльцевого каллуса у образцов Вольница × Герда (7 шт.), Капитан × Вольный Дон (9 шт.). В исследованиях 2021 г. выявлено, что вклад генотипа и питательной среды в количество новообразований и регенерацию зеленых растений был статистически достоверным ($F_{\text{факт.}} > F_{\text{таб. 095}}$).

Библиографический список

1. Pershina L., Trubacheeva N., Badaeva E., Belan I., Rosseeva L. Study of androgenic plant families of alloplasmic introgression lines (*H. vulgare*) – *T. aestivum* and the use of sister DH lines in breeding [e-resource] // Plants. 2020. Vol. 9. Iss. 6. URL: <https://www.mdpi.com/2223-7747/9/6/764> (date of reference: 10.03.2022). DOI: 10.3390/plants9060764.
2. Дьячук Т. И., Хомякова О. В., Акинина В. Н., Кибкало И. А., Поминов А. В. Микроспоровый эмбриогенез *in vitro* – роль стрессов // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019. Т. 23. № 1. С. 86–94. DOI: 10.18699/VJ19.466.
3. Kanbar O. Z., Lantos C., Pauk J. In vitro anther culture as efficiently applied technique for doubled haploid production of wheat (*Triticum aestivum* L.) // Ratarstvo i povrtarstvo. 2021. Vol. 58. Iss. 1. Pp. 31–45. DOI: 10.5937/ratpov58-29902.
4. Калинина Н. В., Головки С. Г., Ионова Е. В. Методы получения гаплоидов в клеточной селекции озимой пшеницы (обзор) // Зерновое хозяйство России. 2020. № 6. С. 56–63. DOI: 10.31367/2079-8725-2020-72-6-56-63.
5. Головки 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.
6. Hassan M. F., Islam S. S. Effect of silver nitrate and growth regulators to enhance anther culture response in wheat (*Triticum aestivum* L.) [e-resource] // Heliyon. 2021. Vol. 7. Iss. 5. Article number e07075. URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2405844021011786> (date of reference: 15.03.2022). DOI: 10.1016/j.heliyon.2021.e07075.
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. Iss. 4. Pp. 150–158. DOI: 10.17221/113/2019-CJGPB.
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. Iss. 11. Pp. 2965–2978. DOI: 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.) [e-resource] // Plants. 2020. Vol. 9. Iss. 1. URL: <https://www.mdpi.com/2223-7747/9/1/49#> (date of reference: 15.03.2022). DOI: 10.3390/plants9010049.
10. Давоян Р. О., Давоян Э. Р., Бебякина И. В., Зинченко А. Н., Миков Д. С., Зубанова Ю. С., Болдаков Д. М. Изучение эффективности гаплопродюсеров кукурузы для стимулирования образования гаплоидных зародышей мягкой пшеницы // Рисоводство. 2019. № 4. С. 12–18.
11. Abd El-Fatah B. E. S., Sayed M. A., El-Sanusy S. A. Genetic analysis of anther culture response and identification of QTLs associated with response traits in wheat (*Triticum aestivum* L.) // Molecular Biology Reports. 2020. Vol. 47. Iss. 12. Pp. 9289–9300. DOI: 10.1007/s11033-020-06007-z.
12. Seldimirova O. A., Kudoyarova G. R., Kruglova N. N., Galin I. R., Veselov, D. S. Somatic embryogenesis in wheat and barley calli *in vitro* is determined by the level of indoleacetic and abscisic acids // Russian Journal of Developmental Biology. 2019. Vol. 50. Iss. 3. Pp. 124–135. DOI: 10.1134/S1062360419030056.

13. Kyriienko A. V., Shcherbak N. L., Kuchuk M. V., Parii M. F., Symonenko, Y. V. In vitro plant regeneration from mature embryos of amphidiploid spelt *Triticum spelta* L. // *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*. 2021. Vol. 57. Iss. 6. Pp. 856–863. DOI: 10.1007/s11627-021-10158-4.

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

15. Белан И. А., Россеева Л. П., Блохина Н. П., Мухина Я. В., Трубачеева Н. В., Першина Л. А. Использование дигаплоидных линий – ускорение селекционного процесса в создании сортов яровой мягкой пшеницы // *Перспективные технологии в аграрном производстве: человек, «цифра», окружающая среда (AgroProd 2021): сборник трудов конференции*. Омск, 2021. С. 128–133.

Об авторах:

Наталья Владимировна Калинина¹, младший научный сотрудник лаборатории клеточной селекции, ORCID 0000-0002-2305-4189, AuthorID 679481; +7 928 769-39-28, kalinina74783@mail.ru

Дмитрий Михайлович Марченко¹, кандидат сельскохозяйственных наук, ведущий научный сотрудник отдела селекции и семеноводства озимой пшеницы, ORCID 0000-0002-5251-3903, AuthorID 616568; +7 928 213-51-50, wiza101@mail.ru

¹ Аграрный научный центр «Донской», Зерноград, Россия

Developing of regenerated plants of winter bread wheat using the anther culture method

N. V. Kalinina[✉], D. M. Marchenko¹

¹ Agricultural Research Center “Donskoy”, Zernograd, Russia

[✉]E-mail: kalinina74783@mail.ru

Abstract. The purpose of the current study was to evaluate the effect of cultivation conditions and the genotype of winter bread wheat samples on the formation of embryogenic callus and regenerative capacity, to identify regenerated plants in order to develop new initial material for breeding new varieties. **Scientific novelty.** There has been estimated the share of influence of induction nutrient media with different composition and genotype on the amount of regenerated plants of winter wheat in anther culture; there have been identified the new samples with high regeneration potential. **Methods.** The objects of the study were the donor plants of winter bread wheat (*Triticum aestivum* L.) of F₃ generation from breeding nurseries of the winter wheat department of the FSBSI “ARC “Donskoy”, namely 13 hybrid combinations developed in the laboratory for breeding and seed production of winter bread wheat of half-intensive type. There has been used a methodology of obtaining haploids in anther culture *in vitro* including such methods as sterilization during work with *in vitro*; preparation of nutrient media; selection and pretreatment of plant explants; determination of the stage of microspores’ development; isolation and planting of anthers on an induction nutrient medium; regeneration of plants from callus tissues. **Results.** There has been found the most favorable nutrient media for the induction of androgenesis *in vitro*. There has been identified a maximum percentage of new formations from the anthers of winter bread wheat in the sample Vol’nitsa × Gerda. There have been developed the largest number of green haploid regenerated plants from pollen callus from the samples Vol’nitsa × Gerda, Kapitan × Vol’nyy Don. There has been revealed that the contribution of the genotype and nutrient medium into the number of new formations and the regeneration of green plants was statistically significant.

Keywords: winter bread wheat, hybrid combination, anther culture, androgenesis, artificial nutrient medium, new formation, regenerated plant.

For citation: Kalinina N. V., Marchenko D. M. Polucheniye rasteniy-regenerantov ozimoy myagkoy pshenitsy s ispol’zovaniyem metoda kul’tury pyl’nikov [Developing of regenerated plants of winter bread wheat using the anther culture method] // *Agrarian Bulletin of the Urals*. 2022. No. 07 (222). Pp. 58–67. DOI: 10.32417/1997-4868-2022-222-07-58-67. (In Russian.)

Date of paper submission: 24.03.2022, **date of review:** 04.04.2022, **date of acceptance:** 15.04.2022.

References

1. Pershina L., Trubacheeva N., Badaeva E., Belan I., Rosseeva L. Study of androgenic plant families of alloplasmic introgression lines (*H. vulgare*) – *T. aestivum* and the use of sister DH lines in breeding [e-resource] //

Plants. 2020. Vol. 9. Iss. 6. URL: <https://www.mdpi.com/2223-7747/9/6/764> (date of reference: 10.03.2022). DOI: 10.3390/plants9060764.

2. Dyachuk T. I., Khomyakova O. V., Akinina V. N., Kibkalo I. A., Pominov A. V. Mikrosporovyy embriogenez in vitro – rol' stressov [Microspore embryogenesis in vitro-partes accentus] // Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2019. Vol. 23. Iss. 1. Pp. 86–94. DOI:10.18699/VJ19.466. (In Russian.)

3. Kanbar O. Z., Lantos C., Pauk J. In vitro anther culture as efficiently applied technique for doubled haploid production of wheat (*Triticum aestivum* L.) // Ratarstvo i povrtarstvo. 2021. Vol. 58. Iss. 1. Pp. 31–45. DOI: 10.5937/ratpov58-29902.

4. Kalinina N. V., Golovko S. G., Ionova E. V. Metody polucheniya gaploidov v kletochnoy selektsii ozimoy pshenitsy (obzor) [Methods for obtaining haploids in cell selection of winter wheat (review)] // Grain Economy of Russia. 2020. No. 6. Pp. 56–63. DOI: 10.31367/2079-8725-2020-72-6-56-63. (In Russian.)

5. Golovko S. G., Kalinina N. V., Yatsyna A. A., Vozzhova, N. N., Ionova E. V. Izucheniye sposobnosti k androgenezu v kul'ture pyl'nikov ozimoy myagkoy pshenitsy [Study of the ability to androgenesis in the anther culture of winter soft wheat] // Grain Economy of Russia. 2019. No. 6 (66). Pp. 41–45. DOI: 10.31367/2079-8725-2019-66-6-41-45. (In Russian.)

6. Hassan M. F., Islam S. S. Effect of silver nitrate and growth regulators to enhance anther culture response in wheat (*Triticum aestivum* L.) [e-resource] // Heliyon. 2021. Vol. 7. Iss. 5. Article number e07075. URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2405844021011786> (date of reference: 15.03.2022). DOI: 10.1016/j.heliyon.2021.e07075.

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. Iss. 4. Pp. 150–158. DOI: 10.17221/113/2019-CJGPB.

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. Iss. 11. Pp. 2965–2978. DOI: 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.) [e-resource] // Plants. 2020. Vol. 9. Iss. 1. URL: <https://www.mdpi.com/2223-7747/9/1/49#> (date of reference: 15.03.2022). DOI: 10.3390/plants9010049.

10. Davoyan R. O., Davoyan E. R., Bebyakina I. V., Zinchenko A. N., Mikov D. S., Zubanova Yu. Izucheniye effektivnosti gaploprodyuserov kukuruzy dlya stimulirovaniya obrazovaniya gaploidnykh zarodyshey myagkoy pshenitsy [The study of the effectiveness of maize haploproducers to stimulate the formation of haploid embryos of soft wheat] // Rice breeding. 2019. No. 4. Pp. 12–18. (In Russian.)

11. Abd El-Fatah B. E. S., Sayed M. A., El-Sanussy S. A. Genetic analysis of anther culture response and identification of QTLs associated with response traits in wheat (*Triticum aestivum* L.) // Molecular Biology Reports. 2020. Vol. 47. Iss. 12. Pp. 9289–9300. DOI: 10.1007/s11033-020-06007-z.

12. Seldimirova O. A., Kudoyarova G. R., Kruglova N. N., Galin I. R., Veselov, D. S. Somatic embryogenesis in wheat and barley calli in vitro is determined by the level of indoleacetic and abscisic acids // Russian Journal of Developmental Biology. 2019. Vol. 50. Iss. 3. Pp. 124–135. DOI: 10.1134/S1062360419030056.

13. Kyriienko A. V., Shcherbak N. L., Kuchuk M. V., Parii M. F., Symonenko, Y. V. In vitro plant regeneration from mature embryos of amphidiploid spelt *Triticum spelta* L. // In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant. 2021. Vol. 57. Iss. 6. Pp. 856–863. DOI: 10.1007/s11627-021-10158-4.

14. Kalinina N. V. Sozdaniye gaploidov v kul'ture pyl'nikov ozimoy myagkoy pshenitsy [Creation of haploids in the anther culture of winter soft wheat] // Grain Economy of Russia. 2021. No. 6. Pp. 21–26. DOI: 10.31367/2079-8725-2021-78-6-21-26. (In Russian.)

15. Belan I. A., Rosseeva L. P., Blokhina N. P., Mukhina Ya. V., Trubacheeva N. V., Pershina L. A. Ispol'zovaniye digaploidnykh liniy – uskoreniye selektsionnogo protsessa v sozdanii sortov yarovoy myagkoy pshenitsy [Use of dihaploid lines – acceleration of the breeding process in the creation of varieties of spring soft wheat] // Perspektivnye tekhnologii v agrarnom proizvodstve: chelovek, “tsifra”, okruzhayushchaya sreda (AgroProd 2021): sbornik trudov konferentsii. Omsk, 2021. Pp. 128–133. (In Russian.)

Authors' information:

Nataliya V. Kalinina¹, junior researcher of the laboratory for cell breeding, ORCID 0000-0002-2305-4189, AuthorID 679481; +7 928 769-39-28, kalinina74783@mail.ru

Dmitriy M. Marchenko¹, candidate of agricultural sciences, head of the department of winter wheat breeding and seed production, ORCID 0000-0002-5251-3903, AuthorID 616568; +7 928 213-51-50, wiza101@mail.ru

¹ Agrarian Research Center “Donskoy”, Zernograd, Russia