



УДК 57.085.23

DOI <https://doi.org/10.26516/2073-3372.2020.34.20>

## **Влияние инициальных сред и длительности холодовой предобработки на эффективность андрогенеза в культуре изолированных пыльников озимой пшеницы сорта Иркутская**

И. В. Любушкина<sup>1,2</sup>, А. В. Поморцев<sup>1</sup>, М. С. Полякова<sup>1</sup>,  
Г. А. Арбузова<sup>1,2</sup>, В. К. Войников<sup>1</sup>, Б. Б. Анапияев<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, г. Иркутск, Россия

<sup>2</sup>Иркутский государственный университет, г. Иркутск, Россия

<sup>3</sup>Казахский национальный исследовательский технический университет

им. К. И. Сатпаева, г. Алматы, Казахстан

E-mail: [ostrov1873@yandex.ru](mailto:ostrov1873@yandex.ru)

**Аннотация.** Изучались особенности андрогенеза *in vitro* в культуре изолированных пыльников озимой пшеницы сорта Иркутская. Исследовано влияние разных питательных сред и условий холодной предобработки на образование каллусов и эмбриоидов, выявлена оптимальная для индукции андрогенеза среда, определены оптимальные для образования эмбриоидов и зелёных растений-регенерантов температурный режим и длительность холодной предобработки.

**Ключевые слова:** озимая пшеница, культура изолированных пыльников, индуцированный андрогенез, гаплоиды, эмбриоидоподобные структуры, каллусы, инициальные среды, низкотемпературное воздействие.

**Для цитирования:** Влияние инициальных сред и длительности холодной предобработки на эффективность андрогенеза в культуре изолированных пыльников озимой пшеницы сорта Иркутская / И. В. Любушкина, А. В. Поморцев, М. С. Полякова, Г. А. Арбузова, В. К. Войников, Б. Б. Анапияев // Известия Иркутского государственного университета. Серия Биология. Экология. 2020. Т. 34. С. 20–32. <https://doi.org/10.26516/2073-3372.2020.34.20>

### **Введение**

Гаплоидные технологии основываются на регенерации гаметных клеток с образованием целых растений. Главное преимущество гаплоидных технологий – это возможность быстрого, за одно поколение, получения гомозиготных растений с требуемыми параметрами. В связи с этим данный метод имеет большие перспективы использования в генетике и селекционных программах, а также в фундаментальных областях биологии для исследования структуры и эволюции генома растений. Сегодня для получения гаплоидных растений используют достаточно широкий ряд методик: отдалённую гибридизацию с селективной элиминацией хромосом чужеродного вида-опылителя [Niroula, Bimb, 2009], культивирование изолированных пыльников и микроспор [An improved ... , 2001; Lantos, Jancso, Pauk, 2005;

Soriano, Li, Boutilier, 2013], неоплодотворённых завязей и семян [Bohanec, 2009]. Весьма примечательным, с нашей точки зрения, является метод культивирования изолированных пыльников, который основывается на явлении андрогенеза *in vitro*, поскольку он достаточно несложен и требует минимальных затрат. Кроме того, некоторые виды растений показывают наибольшую частоту индуцированного андрогенеза именно в культурах изолированных пыльников, где микроспоры находятся в условиях, соответствующих родительскому организму [Bhojwani, Dantu, 2010]. Следует отметить, что эффективность андрогенеза у разных видов растений значительно различается и даже внутри одного вида может варьировать между сортами. Показано, что эффективность андрогенеза в культуре изолированных пыльников во многом определяется генотипом растений и находится под строгим генетическим контролем [Islam, Tuteja, 2012]. Так, у мягкой пшеницы имеются сорта, для которых экспериментально установлена невозможность применения данного метода [Comparison of ... , 2020]. Условия выращивания донорных растений также могут оказывать значительное воздействие на развитие пыльников и, следовательно, на частоту эмбриогенеза у микроспор [Olmedilla, 2010]. Ещё одной проблемой применения гаплоидных технологий является образование растений со смешанной ploидностью вследствие слияния гаплоидных ядер на инициальных стадиях андрогенеза или эндополиплоидии [Islam, Tuteja, 2012]. Однако главной проблемой андрогенеза у хозяйственно значимых злаковых культур является высокая частота формирования растений-альбиносов, лишённых хлорофилла [Progress in doubled ... , 2009]. Такие растения не могут выживать в природе и не имеют какой-либо хозяйственной ценности. Во многом существующие проблемы применения гаплоидных технологий связаны с недостаточной изученностью данного метода. Тем не менее его использование открывает большие перспективы для получения новых сортов значимых для сельского хозяйства растений, более устойчивых к широкому ряду факторов внешней среды, что особенно важно для регионов рискованного земледелия.

Настоящая работа посвящена изучению особенностей андрогенеза *in vitro* в культуре изолированных пыльников озимой мягкой пшеницы сорта Иркутская и определению методических особенностей получения интактных растений данного сорта.

### **Материалы и методы**

В качестве исходного материала использовалась озимая мягкая пшеница сорта Иркутская. В осенне-зимний период донорные растения выращивали на станции искусственного климата (фитотрон) СИФИБР СО РАН. Температура поддерживалась в интервале 22–26 °С, фотопериод составил 16 ч. Полив осуществляли еженедельно. В весенне-летний период донорные растения выращивали в поле на экспериментальных участках Заларинского агроэкологического стационара (дер. Тунгуй, Заларинский район, Иркутская область). Стационар расположен в лесостепной части Среднего Приангарья в бассейне р. Заларинка. Среднемесячные температуры в 2020 г. в период

активной вегетации колебались от 9 до 19 °С. Количество среднемесячных осадков в этот же период составило от 50 до 130 мм. Растительный материал отбирался на стадии трубкования. После срезки колосья помещались в воду и подвергались холодной предобработке при 4 °С в темноте в течение 3–15 сут.

В асептических условиях донорные колосья обрабатывали 98%-ным этанолом. Пыльники вычленились из 6–10 колосков средней трети колоса. Извлечённые пыльники помещались на инициальные стерильные среды Potato IV (PIV) [A set of the ... , 1978] и N<sub>6</sub> [Анапияев, 2001] с разным содержанием регуляторов роста, нафтилуксусную кислоту (НУК; 0,5, 1, 1,5 мг/л) и 2,4-дихлорфеноксисуксусную кислоту (2,4-Д; 0,2, 0,5, 1, 1,5 и 2 мг/л). В качестве источника углеводов использовали сахарозу (90 г/л) и мальтозу (80 г/л). Содержание агара в средах составляло 7 г/л. После пересадки пыльники культивировали в темноте при температуре 26 °С в течение 4 недель до появления каллусов и эмбриоподобных структур. В дальнейшем эмбриоподобные структуры и каллусы переносили на среды для регенерации: Гамборга (B<sub>5</sub>) [Gamborg, Eveleigh, 1968] или 190-2Cu [Pauk, Mihály, Puolimatka, 2003] с регуляторами роста НУК (0,5 мг/л) и кинетином (0,5 мг/л) или без регуляторов роста и помещали в темноту при 4 °С на 3, 5 или 7 сут. Затем сосуды с каллусами и эмбриоподобными структурами переносили под непрерывное освещение при 22–24 °С. Развившиеся зелёные проростки обрабатывали 0,05%-ным раствором колхицина, высаживали в смесь вермикулит : перлит и прикрывали стаканами для поддержания влажности. В течение трёх недель проростки подкармливали либо соответствующей средой (B<sub>5</sub> или 190-2Cu) в разведении 1:2, либо средой Кнопа в разведении 1:1. Далее растения переносили в почвосмесь.

Особенности андрогенеза оценивали по частоте образования каллусов и эмбриоподобных структур к общему числу пыльников и частоте образования общего числа проростков и числа зелёных проростков к числу эмбриоподобных структур и каллусов. Статистическая обработка данных производилась с использованием программ MS Excel 2016 и SigmaPlot v. 14.0.

### ***Результаты и обсуждение***

Широкое применение гаплоидных технологий для создания новых высокопродуктивных и устойчивых к абиотическим и биотическим факторам среды сортов ценных сельскохозяйственных растений сегодня во многом ограничено низкой частотой образования каллусов, эмбриоидов и зелёных растений-регенерантов. Подбор оптимальных условий культивирования и определение отзывчивых генотипов играет значимую роль для повышения частоты андроклинии. Нами было исследовано влияние разных питательных сред и условий холодной предобработки на образование андроклинных структур, а именно каллусов и эмбриоидов, в культуре изолированных пыльников озимой пшеницы сорта Иркутская. С целью выбора оптимальной инициальной среды были проанализированы среды N<sub>6</sub> и PIV и их модификации (табл. 1).

Таблица 1

Влияние состава инициальных сред на частоту эмбриоидо- и каллусогенеза в культуре изолированных пыльников озимой пшеницы сорта Иркутская

Среда	Источник С	Модификация среды	Содержание 2,4-Д, мг/л	Число культивируемых пыльников	ЭС		Каллусы	
					Число	Частота, %	Число	Частота, %
PIV	9%-ная сахароза	–	0,2	179	1	0,56	4	2,23
		–	1,5	315	0	0	9	2,85
	8%-ная мальтоза	–	0,2	188	0	0	0	0
		–	1,5	156	0	0	0	0
Минеральная основа PIV	9%-ная сахароза	Без картофельного экстракта	0,2	210	0	0	2	0,95
			1,5	290	4	1,38	2	0,69
N <sub>6</sub>	9%-ная сахароза	–	1	315	0	0	33	10,47
		Глицин 2 мг/л	1	363	2	0,55	40	11,11
		Глицин 2 мг/л; НУК 1 мг/л	1	4183	57	1,36	14 3	3,41
		Глицин 2 мг/л; НУК 1,5 мг/л	0,5	642	3	0,46	15	2,35
		Глицин 2 мг/л; НУК 0,5 мг/л	1,5	572	2	0,35	16	2,79

Примечание: ЭС – эмбриоидоподобные структуры. 2,4-Д – дихлорфеноксиуксусная кислота; НУК – нафтилуксусная кислота.

Среда PIV является рекомендуемой по протоколу J. Pauk с соавторами [Pauk, Mihály, Puolimatka, 2003] для инициации андрогенеза в культуре изолированных пыльников пшеницы *Triticum aestivum* L. Для разных сортов озимой и яровой пшеницы именно эта среда считается одной из наиболее подходящих. Многие авторы сообщали об успешном применении сред PИ или PIV с целью получения эмбриогенных структур в культурах изолированных пыльников и микроспор [Получение высокоморозостойких форм ... , 2012; Изучение особенностей андрогенеза ... , 2013]. Однако в наших исследованиях разные модификации среды PIV в большинстве случаев показали крайне низкую частоту образования эмбриоидов или их полное отсутствие в культуре вне зависимости от содержания ростового регулятора 2,4-Д (см. табл. 1). Использование в качестве источника углеводов мальтозы было также совершенно неэффективным – образования каллусов и эмбриоидов в культуре пыльников не наблюдалось вовсе (см. табл. 1). Единственным вариантом среды PIV, на которой образование эмбриоидоподобных структур происходило с частотой выше 1 %, явилась модификация, в которой использовалась минеральная основа PIV без картофельного экстракта с добавлением 2,4-Д в концентрации 1,5 мг/л (см. табл. 1). Однако значительным недостатком данного варианта явилась низкая частота образования каллусов – 0,69 % (см. табл. 1).

Оригинальный вариант среды N<sub>6</sub> также показал полное отсутствие эмбриоидоподобных структур в культуре изолированных пыльников. В то же время характерной особенностью применения этой среды для изучаемого сорта пшеницы явилась высокая частота образования каллусов – более 10 % (см. табл. 1). Интересно отметить, что добавление в среду N<sub>6</sub> аминокислоты глицина в концентрации 2 мг/л приводило к образованию эмбриоидов в культуре, хотя и с низкой частотой (см. табл. 1). Наиболее подходящим вариантом среды для индукции образования андроклинных структур в культуре изолированных пыльников озимой пшеницы сорта Иркутская явилась модификация N<sub>6</sub>, содержащая наряду с глицином и 2,4-Д дополнительный регулятор роста НУК. Оптимальные концентрации НУК и 2,4-Д в среде составили 1 и 1 мг/л соответственно (см. табл. 1). При использовании данного варианта среды N<sub>6</sub> мы наблюдали образование эмбриоидоподобных структур в культуре изолированных пыльников с частотой 1,36 % и каллусов с частотой 3,41 % (см. табл. 1). Такой выход андроклинных структур считается приемлемым для продолжения работы с исследуемым сортом [Анапияев, 2001].

Для переключения микроспор с гаметофитного на спорофитный путь развития необходим соответствующий сигнал. Холодовая предобработка может инициировать симметричное деление микроспор и, следовательно, приводить к образованию андрогенных структур [Stress induced microspore ... , 1996; Hu, Kasha, 1997]. Следует отметить, что для каждого генотипа температура и продолжительность такого воздействия на донорные растения устанавливается экспериментально, хотя рекомендуемый период холодной предобработки для работ со злаковыми культурами составляет от 3 до 21 сут. [Islam, Tuteja, 2012]. Некоторые авторы отмечают тот факт, что длительность холодной предобработки донорных растений пшеницы может быть значимым фактором, влияющим на образование андроклинных структур в культурах изолированных пыльников [Анапияев, 2001]. В нашей работе установлено, что максимальная частота образования эмбриоидов в культуре изолированных пыльников озимой пшеницы сорта Иркутская наблюдалась в тех случаях, когда длительность холодной предобработки донорных колосьев при +4 °С составляла от 6 до 12 дней (рис., а). В то же время максимальная частота образования каллусов в культуре изолированных пыльников регистрировалась после холодной предобработки растений озимой пшеницы в течение 3–6 сут. (рис., б). Вероятно, это может быть обусловлено необратимыми физиолого-биохимическими изменениями, происходящими в срезанных колосьях в этот период. Интересно отметить, что работы некоторых авторов свидетельствуют о том, что воздействие низкими положительными температурами не всегда является необходимым для получения андроклинных структур и растений-регенерантов у ряда сортов пшеницы [Marsolais, Séguin-Swartz, Kasha, 1984].

Образование андроклинных структур в культуре изолированных пыльников не всегда в дальнейшем сопровождается регенерацией интактных зелёных растений [Comparison of the ... , 2020]. В нашей работе для инициации регенерации растений озимой пшеницы использовались среды В<sub>5</sub> и 190-2Cu (табл. 2, 3). Некоторые авторы для образования растений-регенерантов

применяют также модификации среды Мурасиге – Скуга [Comparison of the ... , 2020]. Нами было установлено, что среда В<sub>5</sub> не приводила к образованию регенерантов из андроклинных структур озимой пшеницы сорта Иркутская вне зависимости от наличия или отсутствия ростовых регуляторов и происхождения донорных растений (см. табл. 2, 3). Среда 190-2Cu оказалась более эффективной для индукции регенерации растений как с добавлением ростовых регуляторов, так и без них (см. табл. 2, 3).

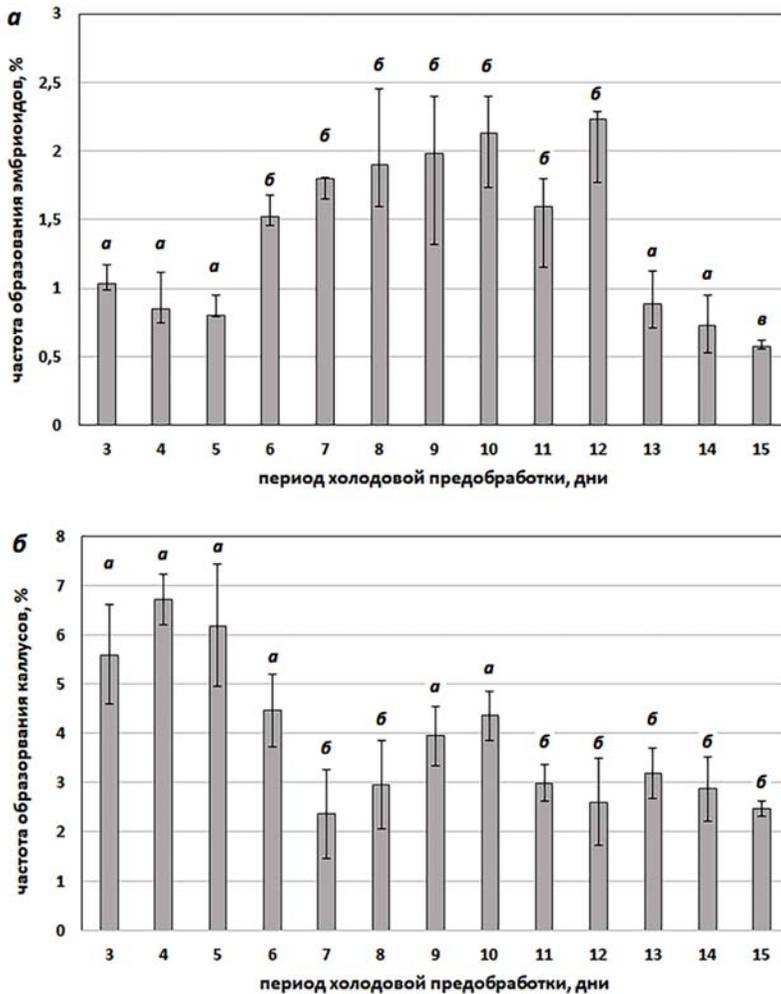


Рис. Влияние длительности холодной предобработки донорных колосьев озимой пшеницы сорта Иркутская на частоту образования эмбрионов (а) и каллусов (б) в культуре изолированных пыльников. а – представлены медианы ( $Q_{50}$ ), планки погрешностей ограничивают  $Q_{25}$  и  $Q_{75}$  процентиля. Тест на нормальность проводился по методу Шапиро – Уилкса. Парное множественное сравнение проводилось с использованием теста Тьюки. Значимые различия  $Q_{50}$  при  $p < 0,05$  отмечены на диаграмме разными буквами.  $n = 3$ ; б – представлены  $M \pm S.D.$  Тест на нормальность проводился по методу Шапиро – Уилкса. Парное множественное сравнение проводилось с использованием метода Холма – Сидака. Значимые различия  $M$  при  $p < 0,05$  отмечены на диаграмме разными буквами.  $n = 3$

Таблица 2

Влияние состава индукционных сред на образование растений-регенерантов из андроклинных структур, полученных в культуре изолированных пыльников, выделенных из донорных растений озимой пшеницы, выращенных в условиях фитотрона

Среда	Наличие ростовых регуляторов / наличие холодовой предобработки	Общее число пыльников	Число андроклинных структур	Донорные растения, выращенные в условиях фитотрона			
				Общее число растений-регенерантов		Зелёные растения-регенеранты	
				Число	Частота, %	Число	Частота, %
B <sub>5</sub>	- / -	205	14	0	0	0	0
	+ / -	189	10	0	0	0	0
190-2Cu	- / -	217	12	3	25	1	8,3
	+ / -	388	14	8	57,1	4	28,6
	- / +	208	15	4	26,7	0	0
	+ / +	198	15	4	26,7	0	0

В литературе имеются сведения о том, что способность пыльников к андрогенезу и последующая способность эмбриоидов образовывать зелёные растения-регенеранты определяются как генотипом выбранного сорта, так и условиями выращивания растений-доноров. Так, некоторые авторы отмечают, что выращивание донорных растений в искусственных условиях негативно сказывается на образовании эмбриоидоподобных структур в культуре пыльников и последующей регенерации зелёных растений [Жоносарь, 2009; Изучение особенностей андрогенеза ... , 2013]. В нашей работе принципиальных различий между частотой образования каллусов и эмбриоидоподобных структур из донорных растений, выращенных в полевых и лабораторных условиях, не было. В то же время применение среды 190-2Cu с ростовыми регуляторами было более эффективным в тех случаях, когда мы использовали донорные растения, выращенные в условиях фитотрона (см. табл. 2, 3).

Таблица 3

Влияние состава индукционных сред на образование растений-регенерантов из андроклинных структур, полученных в культуре изолированных пыльников, выделенных из донорных растений озимой пшеницы, выращенных в полевых условиях Заларинского агроэкологического стационара

Среда	Наличие ростовых регуляторов / наличие холодовой предобработки	Общее число пыльников	Число андроклинных структур	Донорные растения, выращенные в условиях фитотрона			
				Общее число растений-регенерантов		Зелёные растения-регенеранты	
				Число	Частота, %	Число	Частота, %
B <sub>5</sub>	- / -	253	16	0	0	0	0
	+ / -	199	18	0	0	0	0
190-2Cu	- / -	719	28	7	25	4	14,2
	+ / -	540	21	10	47,6	3	14,3
	- / +	352	17	3	17,6	0	0
	+ / +	416	22	4	18,2	0	0

Следует также отметить, что во всех случаях частота образования растений-альбиносов была достаточно высокой и в ряде случаев достигала 70 % от числа всех образовавшихся растений (см. табл. 3). Интересным является и тот факт, что без предварительной низкотемпературной обработки андроклинных структур при +4 °С в течение 3–7 дней мы не наблюдали образования зелёных растений-регенерантов вне зависимости от присутствия ростовых гормонов (см. табл. 2, 3). Рядом авторов отмечается, что в целом образование андроклинных структур и зелёных растений-регенерантов у разных видов озимой пшеницы происходит значительно реже, чем у яровой [Regeneration of fertile ... , 2000; Genetics of androgenesis ... , 2003; Anther culture effectiveness ... , 2014; Comparison of the ... , 2020]. Вероятно, именно низкотемпературное воздействие на разных этапах, начиная от предобработки донорных колосьев и заканчивая воздействием на андроклинные структуры, является для озимой пшеницы ключевым фактором, способствующим андрогенезу в культуре изолированных пыльников и успешному формированию интактных растений.

### **Выводы**

1. Оптимальной средой для индукции андрогенеза в культуре изолированных пыльников озимой пшеницы сорта Иркутская оказалась среда N<sub>6</sub> с добавлением глицина (2 мг/л), НУК (1 мг/л) и 2,4-Д (1 мг/л), содержащая в качестве источника углерода 9%-ную сахарозу.

2. Максимальная частота образования эмбриоидов в культуре изолированных пыльников озимой пшеницы сорта Иркутская наблюдалась в тех случаях, когда длительность холодовой предобработки донорных колосьев при +4 °С составляла от 6 до 12 дней.

3. Образование зелёных растений-регенерантов происходило только при использовании среды 190-2Cu с добавлением ростовых регуляторов 2,4-Д (0,5 мг/л) и кинетина (0,5 мг/л), а также без них, при обязательной низкотемпературной обработке андроклинных структур при +4 °С в течение 3–7 сут.

*Работа выполнена с использованием коллекций ЦКП «Биоресурсный центр» и оборудования ЦКП «Биоаналитика» Сибирского института физиологии и биохимии растений СО РАН.*

*Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках проекта № 20-34-80003 мол\_эв\_а.*

### **Список литературы**

Анапиев Б. Б. Культура микроспор и гаплоидная биотехнология пшеницы. Алматы, 2001. 220 с.

Жоносарь М. В. Оптимизация технологии получения удвоенных гаплоидов мягкой пшеницы, различающихся по генам фотопериодической чувствительности (Ppd) и продолжительности яровизации (Vrd) : автореф. дис. ... канд. биол. наук. Одесса, 2009. 20 с.

Изучение особенностей андрогенеза в культуре пыльников сортов и перспективной формы яровой мягкой пшеницы западносибирской селекции, различающихся наличием или отсутствием пшенично-чужеродных транслокаций / Л. А. Першина, Т. С. Осадчая,

Е. Д. Бадаева, И. А. Белан, Л. П. Россеева // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2013. Т. 17, № 1. С. 40–49.

Получение высокоморозостойких форм пшенично-пырейных гибридов / Е. П. Размахнин, Т. М. Размахнина, В. Е. Козлов, Е. И. Гордеева, Н. П. Гончаров, Ю. Г. Галицын, С. Г. Вепрев, В. М. Чекуров // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2012. Т. 16, № 1. С. 240–249.

An improved *in vitro* technique for isolated microspore culture of barley / K. J. Kasha, E. Simion, R. Oro, Q. A. Yao, T. C. Hu, A. R. Carlson // *Euphytica*. 2001. Vol. 120. P. 379–385. <https://doi.org/10.1023/A:1017564100823>

Anther culture effectiveness in producing doubled haploids of cereals / D. Grauda, A. Miķelsons, N. Ļisina, K. Žagata, R. Ornicāns, O. Fokina, L. Lapiņa, I. Rashal // *Proc. Latv. Acad. Sci. Sect. B*. 2014. Vol. 68. P. 142–147. <https://doi.org/10.2478/prolas-2014-0016>

A set of potato media for wheat anther culture / C. C. Chuang, J. W. Ouyang, H. Chia, S. M. Chou, C. K. Ching // *Proc. Symp. Plant Tissue Culture*. Peking: Sci. Press., 1978. P. 51–56.

Bohanec B. Doubled Haploids via Gynogenesis // *Advanced in haploid production in higher plants*. Dordrecht: SpringerScience + BusinessMedia B.V., 2009. P. 47–65. [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8854-4\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8854-4_2)

Bhojwani S. S., Dantu P. K. Haploid plants // *Plant Cell Culture: Essential Methods*. N. Y.: John Wiley & Sons, 2010. P. 61–78. <https://doi.org/10.1002/9780470686522.ch4>

Comparison of the androgenic response of spring and winter wheat (*Triticum aestivum* L.) / D. Weigt, A. Kiel, I. Siatkowski, J. Zyprych-Walczak, A. Tomkowiak, M. Kwiatek // *Plants*. 2020. Vol. 9, N 1. P. 49. <https://doi.org/10.3390/plants9010049>

Gamborg O. L., Eveleigh D. E. Culture methods and detection of glucanases in suspension cultures of wheat and barley // *Can. J. Biochem.* 1968. Vol. 46, N 5. P. 417–421. <https://doi.org/10.1139/o68-063>

Genetics of androgenesis in winter and spring wheat genotypes / H. K. Chaudhary, I. Dhaliwal, S. Singh, G. S. Sethi // *Euphytica*. 2003. Vol. 132. P. 311–319. <https://doi.org/10.1023/A:1025094606482>

Hu T., Kasha K. J. Improvement of isolated microspore culture of wheat (*Triticum aestivum* L.) through ovary co-culture // *Plant Cell Rep.* 1997. Vol. 16. P. 520–525. <https://doi.org/10.1007/BF01142316>

Islam S. M. S., Tuteja N. P. Enhancement of androgenesis by abiotic stress and other pretreatments in major crop species // *Plant science*. 2012. Vol. 182. P. 134–144. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2011.10.001>

Lantos C., Jancsó M., Pauk J. Microspore culture of small grain cereals // *Acta Physiol. Plant.* 2005. Vol. 27. P. 631–639. <https://doi.org/10.1007/s11738-005-0067-6>

Niroula R. K., Bimb H. P. Overview of wheat X maize system of crosses for dihaploid induction in wheat // *WASJ*. 2009. Vol. 7, N 8. P. 1037–1045.

Marsolais A. A., Séguin-Swartz G., Kasha K. J. The influence of anther cold pretreatments and donor plant genotypes on *in vitro* androgenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.) // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 1984. Vol. 3. P. 69–79. <https://doi.org/10.1007/BF00035922>

Olmedilla A. Microspore embryogenesis // *Plant Development Biology – Biotechnological Perspectives*. Heidelberg: Springer-Verlag, 2010. Vol. 2. P. 27–44. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-04670-4\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-642-04670-4_2)

Pauk J., Mihály R., Puolimatka M. Protocol for wheat (*Triticum aestivum* L.) anther culture // *Doubled Haploid Production in Crop Plants*. Dordrecht: Springer Science+Business Media, 2003. P. 59–64. [https://doi.org/10.1007/978-94-017-1293-4\\_10](https://doi.org/10.1007/978-94-017-1293-4_10)

Progressed in doubled haploid technology in higher plants / M. Wedzony, B. P. Forster, I. Żur, E. Golemic, M. Szechynska-Hebda, E. Dubas, G. Gotębiowska // *Advances in haploid*

Production in Higher Plants. Heidelberg : Springer-Verlag, 2009. P. 1–34. [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8854-4\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8854-4_1)

Regeneration of fertile doubled haploid plants from colchicine-supplemented media in wheat anther culture / I. Zamani, G. Kovacs, E. Gouli-Vavdinoudi, D. G. Roupakias, B. Barnabas // Plant Breed. 2000. Vol. 119. P. 461–465. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0523.2000.00538.x>

Soriano M., Li H., Boutilier K. Microspore embryogenesis: establishment of embryo identity and pattern in culture // Plant Reprod. 2013. Vol. 26. P. 181–196. <https://doi.org/10.1007/s00497-013-0226-7>

Stress induced microspore embryogenesis in tobacco: an optimized system for molecular studies / A. Touraev, A. Ilham, O. Vicente, E. Heberle-Bors // Plant Cell Rep. 1996. Vol. 15. P. 561–565. <https://doi.org/10.1007/BF00232453>

## **Influence of Initial Media and Duration of Cold Pretreatment on the Efficiency of Androgenesis in the Culture of Isolated Anthers of Winter Wheat (*Triticum aestivum* L.) Variety Irkutskaya**

I. V. Lyubushkina<sup>1,2</sup>, A. V. Pomortsev<sup>1</sup>, M. S. Polyakova<sup>1</sup>,  
G. A. Arbusova<sup>1,2</sup>, V. K. Voinikov<sup>1</sup>, B. B. Anapiyaev<sup>3</sup>

<sup>1</sup>*Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS, Irkutsk, Russian Federation*

<sup>2</sup>*Irkutsk State University, Irkutsk, Russian Federation*

<sup>3</sup>*Satbayev University, Almaty, Kazakhstan*

**Abstract.** Haploid technologies are based on the regeneration of gamete cells to form whole plants. The main advantage of haploid technologies is the ability to quickly in one generation obtain homozygous plants with the required parameters. Nevertheless, the use of these technologies today is limited, what is associated with insufficient knowledge of the physiological and biochemical features of the application of this method. In this regard, this work is devoted to the study of the features of androgenesis *in vitro* in the culture of isolated anthers of winter wheat cultivar Irkutskaya and the determination of the methodological features of obtaining intact plants. In the autumn-winter period, donor plants were grown at the artificial climate station SIPPB SB RAS. In the spring-summer period, donor plants were grown in the field at the experimental plots of the Zalarinsky agroecological station (Tungui village). The plant material was selected at the booting stage. Anthers were isolated from 6-10 spikelets of the middle third of the spike. The features of androgenesis were assessed by the frequency of formation of calli and embryo-like structures to the total number of anthers and the frequency of formation of the total number of seedlings and the number of green seedlings to the number of embryo-like structures and calli. It was found that the optimal medium for the induction of androgenesis in the anther culture of this common wheat cultivar is the modification of medium N<sub>6</sub> containing 9% sucrose, with the addition of glycine (2 mg/L), 2,4-D (1 mg/L) and NAA (1 mg/L). The maximum yield of embryoid-like structures was observed in the case of low-temperature pretreatment of donor plants at +4 °C for 6-12 days. At the same time, the most intensive calli formation in the culture of isolated anthers occurred after 3-6 days of donor plant cold pretreatment. Regeneration of green plants took place on 190-2Cu medium with the addition of growth regulators (2,4-D, 0.5 mg/L; kinetin, 0.5 mg/L) with obligatory cold pretreatment of androclonic structures at +4 °C for 3-7 days. Obtained results indicate that low-temperature exposure at different stages, from pretreatment of donor ears to exposure to androclonic structures, is a key factor for winter wheat

that promotes androgenesis in the culture of isolated anthers and the successful formation of intact plants.

**Acknowledgment:** *The reported study was funded by RFBR, project number 20-34-80003.*

**Keywords:** winter wheat, isolated anther culture, induced androgenesis, haploid, embryoid-like structures, calli, initial media, cold treatment.

**For citation:** Lyubushkina I.V., Pomortsev A.V., Polyakova M.S., Arbuzova G.A., Voinikov V.K., Anapiyayev B. B. Influence of Initial Media and Duration of Cold Pretreatment on the Efficiency of Androgenesis in the Culture of Isolated Anthers of Winter Wheat (*Triticum aestivum* L.) Variety Irkutskaya. *The Bulletin of Irkutsk State University. Series Biology. Ecology*, 2020, vol. 34, pp. 20-32. <https://doi.org/10.26516/2073-3372.2020.34.20> (in Russian)

## References

Anapiyayev B.B. *Kultura mikrospor i gaploidnaya biotekhnologiya pshenitsy* [The microspores culture and haploid biotechnology of wheat]. Almaty, 2001, 220 p. (in Russian)

Zhonosar M.V. *Optimizatsiia tekhnologii polucheniia udvoennykh gaploidov miagkoi-pshenitsy razlichaiushchikhsia po genam fotoperiodicheskoi chuvstvitel'nosti (Ppd) I prodolzhitel'nosti iarovizatsii (Vrd)* [Optimization of the technology for obtaining doubled haploids of common wheat, differing in genes for photoperiodic sensitivity (Ppd) and duration of vernalization (Vrd): Candidate in Biology dissertation abstract]. Odessa, 2009, 20 p. (in Russian)

Pershina L.A., Osadchaya T.S., Badaeva E.D., Belan I.A., Rosseeva L.P. *Izuchenie osobennosti androgeneza v kulture pyl'nikov sortov i perspektivnoi formy yarovoi myagkoi pshenitsy zapadnosibirskoi selektsii, razlichayushchikhsya nalichiem ili otsutstviem pshenichno-chuzherodnykh translokatsii* [Features of androgenesis in anther cultures of varieties and a promising accession of spring common wheat bred in west siberia differing in the presence or absence of wheat-alien translocations]. *Vavilovskij zhurnal genetiki i selektsii* [Vavilov J. Genet. Breed.], 2013, vol. 17, no. 1, pp. 40-49. (in Russian)

Razmakhnin E.P., Razmakhnina T.M., Kozlov V.E., Gordeeva E.I., Goncharov N.P., Galitsyn G.Y., Veprev S.G., Chekurov V.M. *Poluchenie vysokomorozostoikikh form pshenichno-pyreinykh gibridov* [Raise of high frost-resistant Agropyron–Triticum hybrids]. *Vavilovskij zhurnal genetiki i selektsii* [Vavilov J. Gen. Breed.], 2012, vol. 16, no. 1, pp. 240-249. (in Russian)

Bhojwani S.S., Dantu P.K. Haploid plants. *Plant Cell Culture: Essential Methods*. N. Y., John Wiley & Sons., 2010, pp. 61-78. <https://doi.org/10.1002/9780470686522.ch4>

Bohanec B. Doubled Haploids via Gynogenesis. *Advanced in haploid production in higher plants*. Dordrecht, SpringerScience + BusinessMedia, 2009, pp. 47-65. [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8854-4\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8854-4_2)

Chaudhary H.K., Dhaliwal I., Singh S., Sethi G.S. Genetics of androgenesis in winter and spring wheat genotypes. *Euphytica*, 2003, vol. 132, pp. 311-319. <https://doi.org/10.1023/A:1025094606482>

Chuang C.C., Ouyang J.W., Chia H., Chou S.M., Ching C.K. A set of potato media for wheat anther culture. *Proc. of Symposium on Plant Tissue Culture*. Peking, Sci. Press., 1978, pp. 51-56.

Gamborg O.L., Eveleigh D.E. Culture methods and detection of glucanases in suspension cultures of wheat and barley. *Can. J. Biochem.*, 1968, vol. 46, no. 5, pp. 417-421. <https://doi.org/10.1139/o68-063>

Grauda D., Miķelsone A., Līsiņa N., Žagata K., Ornicāns R., Fokina O., Lapiņa L., Rašal I. Anther culture effectiveness in producing doubled haploids of cereals. *Proc. Latv. Acad. Sci. Sect. B*, 2014, vol. 68, pp. 142-147. <https://doi.org/10.2478/prolas-2014-0016>

Hu T., Kasha K.J. Improvement of isolated microspore culture of wheat (*Triticum aestivum* L.) through ovary co-culture. *Plant Cell Rep.*, 1997, vol. 16, pp. 520-525. <https://doi.org/10.1007/BF01142316>

Islam S.M.S., Tuteja N. Enhancement of androgenesis by abiotic stress and other pre-treatments in major crop species. *Plant science*, 2012, vol. 182, pp. 134-144. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2011.10.001>

Kasha K.J., Simion E., Oro R., Yao Q.A., Hu T.C., Carlson A.R. An improved in vitro technique for isolated microspore culture of barley. *Euphytica*, 2001, vol. 120, pp. 379-385. <https://doi.org/10.1023/A:1017564100823>

Lantos C., Jancsó M., Pauk J. Microspore culture of small grain cereals. *Acta Physiol. Plant.* 2005, vol. 27, pp. 631-639. <https://doi.org/10.1007/s11738-005-0067-6>

Marsolais A.A., Séguin-Swartz G., Kasha K.J. The influence of anther cold pretreatments and donor plant genotypes on *in vitro* androgenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1984, vol. 3, pp. 69-79. <https://doi.org/10.1007/BF00035922>

Niroula R.K., Bimb H.P. Overview of wheat X maize system of crosses for dihaploid induction in wheat. *WASJ*, 2009, vol. 7, no 8, pp. 1037-1045.

Olmedilla A. Microspore embryogenesis. *Plant Development Biology – Biotechnological Perspectives*. Heidelberg, Springer-Verlag, 2010, vol. 2, pp. 27-44. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-04670-4\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-642-04670-4_2)

Pauk J., Mihály R., Puolimatka M. Protocol for wheat (*Triticum aestivum* L.) anther culture. *Doubled Haploid Production in Crop Plants*. Dordrecht, Springer Science+Business Media Publ., 2003, pp. 59–64. [https://doi.org/10.1007/978-94-017-1293-4\\_10](https://doi.org/10.1007/978-94-017-1293-4_10)

Soriano M., Li H., Boutilier K. Microspore embryogenesis: establishment of embryo identity and pattern in culture. *Plant Reprod.*, 2013, vol. 26, pp. 181-196. <https://doi.org/10.1007/s00497-013-0226-7>

Touraev A., Ilham A., Vicente O., Heberle-Bors E. Stress induced microspore embryogenesis in tobacco: an optimized system for molecular studies. *Plant Cell Rep.*, 1996, vol. 15, pp. 561-565. <https://doi.org/10.1007/BF00232453>

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, vol. 9, no. 1, pp. 49. <https://doi.org/10.3390/plants9010049>

Wedzony M., Forster B.P., Żur I., Golemiec E., Szechynska-Hebda M., Dubas E., Gotębiowska G. Progressed in doubled haploid technology in higher plants. *Advances in haploid Production in Higher Plants*. Heidelberg, Springer-Verlag, 2009, pp. 1-34. [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8854-4\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8854-4_1)

Zamani I., Kovacs G., Gouli-Vavdinoudi E., Roupakias D.G., Barnabas B. Regeneration of fertile doubled haploid plants from colchicine-supplemented media in wheat anther culture. *Plant Breed.*, 2000, vol. 119, pp. 461-465. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0523.2000.00538.x>

Любушкина Ирина Викторовна  
кандидат биологических наук,  
научный сотрудник  
Сибирский институт физиологии  
и биохимии растений СО РАН  
Россия, 664033, г. Иркутск,  
ул. Лермонтова, 132  
доцент  
Иркутский государственный университет  
Россия, 664003, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 1  
e-mail: ostrov1873@yandex.ru

Lyubushkina Irina Viktorovna  
Candidate of Science (Biology),  
Research Scientist  
Siberian Institute of Plant Physiology  
and Biochemistry SB RAS  
132, Lermontov st., Irkutsk, 664033,  
Russian Federation  
Assistant Professor  
Irkutsk State University  
1, K. Marx st., Irkutsk, 664033,  
Russian Federation  
e-mail: ostrov1873@yandex.ru

Поморцев Анатолий Владимирович  
кандидат биологических наук,

Pomortsev Anatolii Vladimirovich  
Candidate of Science (Biology),

*научный сотрудник  
Сибирский институт физиологии  
и биохимии растений СО РАН  
Россия, 664033, г. Иркутск,  
ул. Лермонтова, 132  
e-mail: pomorcevanatolii@mail.ru*

*Research Scientist  
Siberian Institute of Plant Physiology  
and Biochemistry SB RAS  
132, Lermontov st., Irkutsk, 664033,  
Russian Federation  
e-mail: pomorcevanatolii@mail.ru*

*Полякова Марина Станиславовна  
ведущий инженер  
Сибирский институт физиологии  
и биохимии растений СО РАН  
Россия, 664033, г. Иркутск,  
ул. Лермонтова, 132  
e-mail: poljakova.m@gmail.com*

*Polyakova Marina Stanislavovna  
Lead Engineer  
Siberian Institute of Plant Physiology  
and Biochemistry SB RAS  
132, Lermontov st., Irkutsk, 664033,  
Russian Federation  
e-mail: poljakova.m@gmail.com*

*Арбузова Галина Андреевна  
ведущий инженер  
Сибирский институт физиологии  
и биохимии растений СО РАН  
Россия, 664033, г. Иркутск,  
ул. Лермонтова, 132  
магистрант  
Иркутский государственный университет  
Россия, 664003, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 1  
e-mail: mingronland@mail.ru*

*Arbuzova Galina Andreevna  
Lead Engineer  
Siberian Institute of Plant Physiology  
and Biochemistry SB RAS  
132, Lermontov st., Irkutsk, 664033,  
Russian Federation  
Undergraduate Student  
Irkutsk State University  
1, K. Marx st., Irkutsk, 664003,  
Russian Federation  
e-mail: mingronland@mail.ru*

*Войников Виктор Кириллович  
доктор биологических наук,  
научный руководитель института  
Сибирский институт физиологии  
и биохимии растений СО РАН  
Россия, 664033, г. Иркутск,  
ул. Лермонтова, 132  
e-mail: vvk@sifibr.irk.ru*

*Voinikov Victor Kirillovich  
Doctor of Sciences (Biology),  
Scientific Director  
Siberian Institute of Plant Physiology  
and Biochemistry SB RAS  
132, Lermontov st., Irkutsk, 664033,  
Russian Federation  
e-mail: vvk@sifibr.irk.ru*

*Анапияев Бахытжан Бейсенбекович  
доктор биологических наук  
Казахский национальный исследовательский  
технический университет им. К. И. Сатпаева, 22а,  
050013, Казахстан, г. Алматы,  
ул. Сатпаева, 22а  
e-mail: bak\_anapiyayev@mail.ru*

*Anapiyayev Bahytzhan Beisenbekovich  
Doctor of Sciences (Biology)  
Satbayev University  
22a, Satpaev st., Almaty, 050013,  
Kazakhstan  
e-mail: bak\_anapiyayev@mail.ru*

**Дата поступления:** 27.08.2020

**Received:** August, 27, 2020