

ВЛИЯНИЕ МЕТЕЛОК, СФОРМИРОВАННЫХ НА ПОБЕГАХ РАЗНОГО ПОРЯДКА, НА АНДРОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОТВЕТЫ *in vitro* РИСА *Oryza sativa* L.

М.В. Илюшко, кандидат биологических наук, М.В. Ромашова, кандидат сельскохозяйственных наук, С.С. Гученко

Федеральный научный центр агробιοтехнологий Дальнего Востока им. А.К. Чайки, 692539, Приморский край, пос. Тимирязевский, ул. Воложенина, 30
E-mail: ilyushkoiris@mail.ru

Исследования проводили с целью сравнительного анализа отзывчивости пыльников с метелок, расположенных на главных и боковых побегах риса *Oryza sativa* L., в андрогенезе *in vitro* на растениях F_1 двух гибридных комбинаций для увеличения числа культивируемых пыльников в течение сезона. Растения доноры выращивали на вегетационной площадке в металлических сосудах, наполненных почвой. Главную метелку использовали с трех растений гибрида $L \times 3P$ и одного растения гибрида $K \times 3P$, по одной боковой метелке срезали с шести растений $L \times 3P$ и трех растений $K \times 3P$. Число генотипов рассчитывали, как произведение числа каллусов с удвоенными гаплоидами на 1,25. В культуру *in vitro* введено 2050 пыльников. По интенсивности каллусообразования, числу зеленых регенерантов на каллус и доле удвоенных гаплоидов статистически значимых различий между главными и боковыми метелками в комбинации $L \times 3P$ не выявлено. Всего получено 215 линий удвоенных гаплоидов 29 генотипов, чего теоретически достаточно для выведения нового сорта. Из гибридной комбинации $K \times 3P$ получено 120 удвоенных гаплоидов 5 генотипов с одного растения донора с главной метелкой. Статистически значимые различия между главными и боковыми метелками отсутствовали. Использование боковых метелок риса дает возможность распределить трудозатраты во времени и увеличить общий объем культивируемых *in vitro* пыльников и, в конечном счете, число и варибельность удвоенных гаплоидов одного образца. При отсутствии временных и прочих ограничений предпочтительней главные метелки.

PANICLE FORMATION ORDER INFLUENCE IN RICE *Oryza sativa* L. *in vitro* ANDROGENESIS

M.V. Ilyushko, M.V. Romashova, S.S. Guchenko

Federal Scientific Centre of Agrobiotechnology of the Far East named A.K. Chaika, 692539, Primorskiy kray, pos. Timiryasevskiy, ul. Volozhenina, 30
E-mail: ilyushkoiris@mail.ru

A comparative analysis of rice *Oryza sativa* L. main and lateral panicles in androgenesis *in vitro* on F_1 plants of two hybrid combinations: $L \times 3P$ and $K \times 3P$ to increase the number of cultivated anthers during the season was carried out. Donor plants were grown on the growing area in metal vessels filled with soil. The main panicle was used from three $L \times 3P$ hybrids and one $K \times 3P$ hybrid, single lateral panicle was cut from six $L \times 3P$ plants and three $K \times 3P$ plants. The genotypes number was calculated as the product of the calli number with doubled haploids by 1.25. *In vitro* culture 2050 anthers were introduced. According to the intensity of callus formation, the number of green regenerants per callus, and the doubled haploids proportion, there were no statistically significant differences between the main and lateral panicles in the $L \times 3P$ combination. In total, 215 doubled haploids lines of twenty nine genotypes were obtained, which is theoretically sufficient for breeding a new variety. On the hybrid combination $K \times 3P$, 120 doubled haploids of five genotypes were formed from one donor plant with the main panicle. There were no statistically significant differences between the main and lateral panicles. It is concluded that it is expedient to use lateral rice panicles *in vitro* androgenesis to create the initial breeding material. Their use makes it possible to distribute labor force over time and increase the total volume of anthers cultivated *in vitro*, and, ultimately, the doubled haploids number and variability of one sample. In the time absence and other restrictions, it is preferable to use the main panicle.

Ключевые слова: *Oryza sativa*, андрогенез *in vitro*, главная и боковая метелки, удвоенные гаплоиды

Key words: *Oryza sativa*, *in vitro* androgenesis, main and lateral panicles, doubled haploids

Андрогенез *in vitro* (культура пыльников или микроспор *in vitro*) – один из ведущих методов создания исходного материала в современной селекции сельскохозяйственных растений, позволяющий ускорить перевод гетерозиготных гибридов в гомозиготные линии (удвоенные гаплоиды – *doubled haploids*, *DH*) за одно поколение [1, 2]. Для риса разработан ряд протоколов создания удвоенных гаплоидов, основанный исключительно на культуре пыльников *in vitro* [3, 4, 5]. В результате их использования отмечен значительный селекционный успех в различных рисосеющих странах [3, 4].

Ключевые факторы эффективного андрогенетического ответа – генотип растения донора, благоприятные условия выращивания, стадия микроспор незрелого пыльника и его шоковая предобработка до введения в культуру *in vitro*, условия культивирования пыльников, каллусов и регенерантов [3, 6, 7]. Есть немногочисленные сведения о преимуществе главной метелки (или колоса) в культуре пыльников *in vitro* злаковых культур

над второстепенными [6, 8]. В целом считают, что физиологическое состояние растений доноров оказывают значительное влияние на андрогенетические ответы *in vitro*, и главный побег, как наиболее крупный и сильный, наиболее отзывчив в культуре пыльников [3, 6, 7].

Получение растений доноров для культивирования пыльников *in vitro* возможно в контролируемых условиях, но преимущество имеют растения из естественных условий [3, 7]. При использовании большого количества гибридов, посев следует проводить в несколько сроков, чтобы расширить временные рамки введения пыльников в культуру. Однако при выращивании риса на северной границе ареала его возделывания с ограниченным количеством тепла семена гибридов могут не вызреть. Андрогенетические ответы *in vitro* в значительной степени зависят от генотипа, часто они бывают отрицательными [2, 3, 9], отсутствуют гарантии получения удвоенных гаплоидов из гибридов первого поколения, поэтому селекционеры используют гибриды второго поколения

Табл. 1. Число пыльников риса *Oryza sativa* L., введенных в культуру *in vitro*

Номер гибрида	Число пыльников, шт.	Порядок формирования метелки
Луговой×[(Дарий 8×Хаяюки)×Славутич]		
1	194	боковая
2	50	боковая
3	122	главная
4	50	главная
5	246	боковая
6	198	боковая
7	78	боковая
8	190	боковая
9	176	главная
Каскад×[(Дарий 8×Хаяюки)×Славутич]		
1	184	боковая
2	194	боковая
3	208	главная
4	168	боковая

[5, 8, 10], а селекцию трудно культивируемых *in vitro* генотипов ведут традиционным способом. Таким образом, после срезания побега с растения донора необходимо собрать полноценные семена в качестве страхового фонда. В период массового введения пыльников в культуру *in vitro* в отдельных случаях главный побег не удастся использовать. При этом рис формирует несколько боковых метелок меньшего размера.

Цель исследования – сравнение андрогенетических ответов *in vitro* главной и боковой метелок гибридов риса *Oryza sativa* L. для увеличения числа культивируемых пыльников в течение сезона.

Методика. В исследовании использовали гибриды F₁ риса *Oryza sativa* L.: девять растений гибридной комбинации Луговой×[(Дарий 8×Хаяюки)×Славутич] – Л×ЗР и четыре растения комбинации Каскад×[(Дарий 8×Хаяюки)×Славутич] – К×ЗР. Гибриды выращивали в 2020 г. на вегетационной площадке ФНЦ агроботехнологий Дальнего Востока им. А.К. Чайки в металлических сосудах, наполненных почвой. Температурный фон в мае составил 12,8 °С, в июне – 17,2 °С, в июле – 20,8 °С, в августе – 22 °С, что на 0,7...1,8 °С выше среднегогодовой нормы. Для введения пыльников в культуру *in vitro* с трех растений комбинации Л×ЗР использовали главную метелку, на шести срезали по одной боковой метелке. В гибридной комбинации К×ЗР у одного растения взята главная метелка, у остальных боковые. О готовности метелки к использованию судили по морфологическим маркерам: расстояние между флаговым и подфлаговым листьями – 5...7 см, что у риса соответствует поздней одноядерной стадии развития микроспоры [2]. Введение пыльников в культуру осуществляли в конце июля–начале августа.

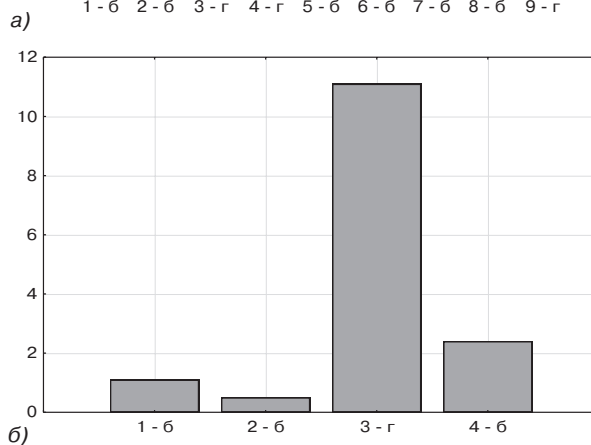
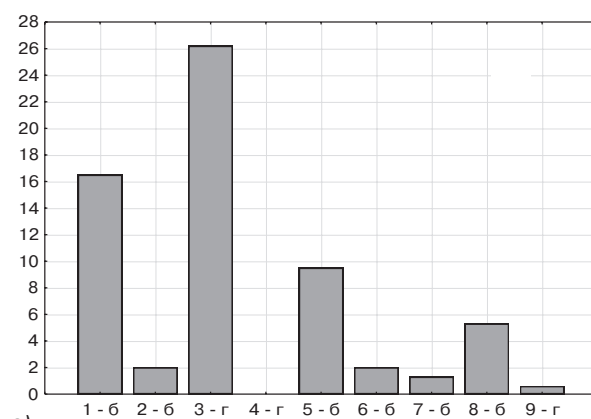
Порядок предобработки и инокуляции пыльников, условия культивирования каллусов и регенерантов приведены в работе [11]. Выбор метелки (главная или боковая) зависел от физической возможности оператора ввести пыльники культуру *in vitro* (400...450 шт. в день). Для оценки различий средних значений использовали непараметрический критерий Ван дер Вардена (X), применимый для малых выборок [12, 13]. Число генотипов

рассчитывали как произведение числа каллусов с ДН на 1,25, согласно показателю внутрикаллусного генетического разнообразия риса [14].

Результаты и обсуждение. По каждому гибриду на питательную среду инокулировано от 50 до 274 асептических чистых пыльников риса (всего 2050 шт.), из них 520 шт. с главных метелок и 1530 шт. с боковых метелок (табл. 1).

Каллусообразование с боковых метелок варьировало от 0 до 16,5 %, с главных метелок – от 0 до 26,2% (см. рисунок). Достоверные различия по величине этого показателя между главными и боковыми метелками не подтверждены: в гибридной комбинации Л×ЗР $X_{\phi}=0,84$, $X_{05}=2,4$, в комбинации К×ЗР – $X_{\phi}=0,84$, $X_{05}=2,3$ (табл. 2).

Среднее число зеленых регенерантов в расчете на каллус на боковых метелках в комбинации Л×ЗР было больше, чем на главных, в 4 раза. Ранее было отмечено, что в отдельных случаях на каллусной линии может сформироваться больше сотни регенерантов [15]. На единственной каллусной линии гибрида Л×ЗР №2 образовалось 131 растение (гаплоиды и удвоенные гаплоиды), что привело к значительному увеличению среднего показателя регенерации из пыльников боковых метелок. В комбинации К×ЗР множественная регенерация отмечена только на гибриде с использованием главной метелки – 120 растений на четырех каллусных линиях. У одного растения К×ЗР (№1) наблюдали морфогенетический ответ с боковой метелки – семь растений, которые погибли на стадии 3...4 листьев.



Каллусообразование (%) в андрогенезе *in vitro* риса *Oryza sativa* L.: а – девяти растений гибридной комбинации Луговой×[(Дарий 8×Хаяюки)×Славутич]; б – четырех растений гибридной комбинации Каскад×[(Дарий 8×Хаяюки)×Славутич] (цифрами обозначены номера растений, буквами порядок формирования метелки – г – главная, б – боковая).

Табл. 2. Андрогенетические ответы *in vitro* метелок побегов разного порядка гибридов риса *Oryza sativa* L.

Среднее значение показателя	Порядок формирования метелки		Х-критерий Ван дер Вардена	
	главная	боковая	X_{ϕ}	X_{05}
Луговой×(Дарий 8×Хаяюки)×Славутич]				
Каллусообразование, %	8,9	6,1	0,84	2,4
Число зеленых регенерантов на каллус, шт.	5,7	24,9	0,32	2,3
Доля удвоенных гаплоидов, %	38,8	17,6	0,25	2,3
Каскад×(Дарий 8×Хаяюки)×Славутич]				
Каллусообразование, %	11,1	1,3	0,84	2,4
Число зеленых регенерантов на каллус, шт.	27,0	0	0,84	2,4
Доля удвоенных гаплоидов, %	22,5	0	0,84	2,4

Доля удвоенных гаплоидов от боковых метелок варьировала в пределах от 0 до 34,2 %, от главных метелок – от 0 до 38,8 %. Различия между средними значениями ДН на главной и боковых метелках в комбинации Л×ЗР статистически не значимы (см. табл. 2). В гибридной комбинации К×ЗР единственное исходное растение, у которого регенеранты выросли до стадии цветения и созрели (использованы пыльники с главной метелки), образовало 22,5 % удвоенных гаплоидов. Отсутствие статистически значимых различий между показателями главной и боковой метелок указывает на то, что в гаплоидной селекции они равнозначны для использования в андрогенезе *in vitro*. Свидетельства о том, что у злаковых культур важно использовать главную метелку [6, 7, 8] скорее связаны с условиями произрастания, так как они детерминируют физиологические процессы растений доноров [6]. На андрогенетические ответы оказывают влияние различные факторы, воздействующие на исходные растения [6]. В естественных условиях возможны колебания в теплообеспеченности гибридов в фазе выхода в трубку и выметывания более чем на 10 °С, а приход циклонов и тайфунов изменяет инсоляцию. В год проведения эксперимента резких колебаний метеоусловий в период выращивания растений доноров на вегетационной площадке, особенно в критические стадии, не наблюдали, поэтому пыльники главных и боковых метелок в андрогенезе *in vitro* риса проявились одинаково.

Кроме того, число колосков соцветий главных и боковых стеблей многих зерновых (пшеница, ячмень, овес) сильно различаются. У риса боковые метелки часто не уступают главному соцветию по числу колосков, что дает возможность для их использования в культуре пыльников *in vitro*. Важно, чтобы микроспоры в пыльниках находились в поздней одноядерной стадии развития, когда они морфологически компетентны к переключению программы развития с гаметофитной на спорофитную [7, 16]. Для гибридной комбинации К×ЗР характерны низкие значения андрогенетических ответов уже на начальной стадии: каллусообразование на главной метелке 11,1 %, на боковых метелках – 1,33 %, что в среднем ниже, чем в гибридной комбинации Л×ЗР, в 2 раза. Учитывая большие различия по величине этого показателя между гибридными комбинациями, очевидна закономерность влияния генотипа в

эксперименте. Попытки оптимизировать протоколы получения ДН, как правило, позволяют улучшить андрогенетические ответы для некоторых сортов или гибридов, но всегда находятся генотипы с отрицательным результатом [2, 17, 18].

В абсолютных значениях в сумме с главных метелок было получено 169 ДН, с боковых – 73 удвоенных гаплоида по обоим гибридным комбинациям. Низкая внутрикалусная генетическая изменчивость свидетельствует о тиражировании одного или небольшого числа генотипов растений с одного пыльника. В отдельных случаях на одной каллусной линии клонируется до нескольких десятков ДН [15], и только 25 % каллусов вариабельны [14]. С учетом внутрикалусной генетической изменчивости образовалось примерно равное число генотипов (16 с главных метелок и 18 с боковых), однако пыльников на боковых побегах использовали в 3 раза больше. С другой стороны, именно на главной метелке растения №4 в комбинации Л×ЗР каллусообразование отсутствовало (см. рисунок), подтверждая генотипическую зависимость андрогенетических ответов *in vitro* [2, 9, 19] даже в пределах одной гибридной комбинации с использованием лучшего экспланта – пыльников главной метелки. Вовлечение боковых метелок позволило инициировать больше морфогенных каллусов и, как следствие, увеличить генотипическое разнообразие ДН вдвое, по сравнению с применением исключительно главных метелок.

Для выведения сорта риса с использованием гаплоидных технологий достаточно 100...150 ДН одного образца [2, 20] без учета их принадлежности к каллусным линиям. Есть пример селекционного успеха на основе 17 линий ДН [2]. В нашем эксперименте образовалось 215 линий удвоенных гаплоидов 29 генотипов (расчетное число) гибридной комбинации Л×ЗР, что теоретически может привести к созданию нового сорта риса.

Выводы. Результаты исследований свидетельствуют о целесообразности использования боковых метелок некоторых гибридов риса в культуре пыльников *in vitro* для генерации исходного селекционного материала. Это позволяет перераспределить трудозатраты во времени и увеличить общий объем культивируемых *in vitro* пыльников и, в конечном счете, число и вариабельность удвоенных гаплоидов одного образца. При отсутствии временных и прочих ограничений предпочтительней использовать главную метелку.

Литература

1. Сельдимирова О.А., Титова Г.Е., Круглова Н.Н. Комплексный морфолого-гистологический подход к изучению морфогенных структур в культуре *in vitro* пыльников пшеницы // Известия РАН. Серия биологическая. 2016. № 2. С. 155-161. doi: 10.7868/S0002332916020089.
2. Study of androgenic plant families of alloplasmic introgression lines (*H. vulgare*) – *T. aestivum* and the use of sister DH lines in breeding / L. Pershina, N. Trubacheeva, E. Badaeva, et al. // Plants. 2020. Vol. 9. URL: <https://pdfs.semanticscholar.org/0f17/6f055840695843ec653ebe8584cfaf14eb2f.pdf>. (дата обращения: 16.03.2022). doi: 10.3390/plants9060764.
3. Tripathy S.K. High-throughput doubled haploid production for indica rice breeding / ed. J.M. Segui-Simarro // Doubled haploid technology. Methods molecular biology. New York: Humana, 2021. Vol. 2287. P. 343-363. doi: 10.1007/978-1-0716-315-3_20.
4. Goncharova Y.K., Vereshchagina S.A., Gontcharov S.V. Nutrient media for double haploid production in anther

- culture of rice hybrids // *Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology*. 2020. Vol. 20. No. 23-24, P. 1215-1223.
5. Hooghvorst I., Ferreres I., Nogues S. Anther culture and chromosome doubling in Mediterranean japonica rice / ed. J.M. Segui-Simarro // *Doubled haploid technology. Methods in molecular biology*. New York: Humana, 2021. Vol. 2287. P. 333-341. doi: 10.1007/978-1-0716-315-3_19.
 6. Haploids: constraints and opportunities in plant breeding / S.L. Dwivedi, A.B. Brite, L. Tripathi, et al. // *Biotechnology Advances*. 2015. Vol. 33. № 6. P. 812-829. doi: 10.1016/j.biotechadv.2015.07.001.
 7. High-frequency androgenic green plant regeneration in indica rice for accelerated breeding / S. Samantaray, B. Dash, S.S. Bhuyan, et al. / eds. S.S. Gosal, S.H. Wani. *Accelerated plant Breeding*. 2020. Vol. 1. Springer, Cham. URL: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/978-3-030-41866-3.pdf> (дата обращения: 16.03.2022). doi: 10.1007/978-3-030-41866-3_10.
 8. Dunwell J.M. Haploids in flowering plants: origins and exploitation // *Plant Biotechnology Journal*. 2010. Vol. 8. P. 377-424. doi: 10.1111/j.1467-7652.2009.00498.x
 9. Niazian M., Shariatpanahi M.E. In vitro-based doubled haploid production: recent improvements // *Euphatica*. 2020. Vol. 216. Article 69. URL: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10681-020-02609-7> (дата обращения: 01.02.2022). doi: 10.1007/s10681-020-02609-7.
 10. Murovec J., Bohanec B. Haploids and doubled haploids in plant breeding / ed. I. Abdurakhmonov. *Plant breeding*. 2012. P. 87-106. URL: <https://www.intechopen.com/chapters/25554> (дата обращения 16.03.2022). doi: 10.5772/29982.
 11. Илюшко М.В., Скапцов М.В., Ромашова М.В. Содержание ядерной ДНК у регенерантов риса (*Oryza sativa* L.), полученных в культуре пыльников *in vitro* // *Сельскохозяйственная биология*. 2018. Т. 53. № 3. С. 531-538. doi: 10.15389/agrobiology.2018.3.531rus.
 12. Ван дер Варден Б.Л. *Математическая статистика / пер. с нем.* М.: Иностранная литература, 1960. 450 с.
 13. Лакин Г.Ф. *Биометрия*. М.: Высш. Школа, 1980. 293 с.
 14. Ilyushko M.V., Romashova M.V., Guchenko S.S. Intra-callus genetic variability of rice *Oryza sativa* L. doubled haploids regenerated through androgenesis *in vitro* / eds. A. Muratov, S. Ignateva. *Fundamental and applied scientific research in the development of agriculture in the Far East (AFE-2021). Lecture Notes in Networks and Systems*. Cham.: Springer, 2022. Vol. 353. P. 9-18. doi: 10.1007/978-3-030-91402-8_2.
 15. Илюшко М.В. Регенерационный максимум в андрогенных каллусных линиях риса *Oryza sativa* L. *in vitro* // *Рисоводство*. 2019. № 2(43). С. 29-32.
 16. Сельдимирова О.А., Круглова Н.Н. Андроклинический эмбриоидогенез *in vitro* злаков // *Успехи современной биологии*. 2014. Т. 134. № 5. С. 476-487.
 17. Antimitotic and hormone effects on green double haploid plant production through anther culture of Mediterranean japonica rice / I. Hooghvorst, E. Ramos-Fuentes, C. Lopez-Cristofannini, et al. // *Plant Cell Tissue Organ Culture*. 2018. Vol. 134. P. 205-215. doi: 10.1007/s11240-018-1413-x.
 18. Callus induction and regeneration from anther cultures of Indonesian indica black rice cultivar / A. Maharani, W.I.D. Fanata, F.N. Laeli, et al. // *J. Crop Sci. Biotech.* 2020. Vol. 23. No. 1. P. 21-28. doi: 10.1007/s12892-019-0322-0.
 19. Exploring factors affecting anther culture in rice (*Oryza sativa* L.) / S.K. Tripathy, D. Swain, P.M. Mohapatra, et al. // *Journal of Applied Biology and Biotechnology*. 2019. Vol. 7(02). P. 87-92. doi: 10.7324/JABB.2019.70216.
 20. Sarao N.K., Gosal S.S. *In vitro* androgenesis for accelerated breeding in rice / eds. S.S. Gosal, S.H. Wani // *Biotechnologies of crop improvement*. Cham.: Springer, 2018. Vol. 1. P. 407-435. doi: 10.1007/978-3-319-78283-6_12.

Поступила в редакцию 02.02.2022

После доработки 26.09.2022

Принята к публикации 29.11.2022