

ПОДБОР ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ДЛЯ ИНДУКЦИИ АНДРОГЕНЕЗА И РЕГЕНЕРАЦИИ РАСТЕНИЙ ПШЕНИЦЫ (*TRITICUM AESTIVUM* L.) В КУЛЬТУРЕ ПЫЛЬНИКОВ**Нуртаза А.С.¹, Нармахан К.Н.^{1,2}, Какимжанова А.А.^{1*}**¹ТОО «Национальный центр биотехнологии», 010000, Казахстан, Астана, Кургальжинское шоссе, 13/5²НАО «Евразийский национальный университет им. Л.Н. Гумилёва», 010000, Казахстан, Астана, ул. К. Сатпаева, 2

*Автор для корреспонденции: kakimzhanova@biocenter.kz

АБСТРАКТ

Андрогенез в культуре пыльников является перспективным методом ускоренного получения гомозиготных линий пшеницы (*Triticum aestivum* L.), однако широкое применение данной технологии ограничено выраженной генотипической зависимостью и низкой эффективностью регенерации. Целью настоящего исследования является оптимизация условий индукции андрогенеза и регенерации растений путём подбора питательной среды и гормонального состава. В работе было изучено 12 вариантов сред на основе N6, C17 и MC с добавлением различных концентраций 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д). Установлено, что наибольшая эмбрионная активность наблюдалась на средах, содержащих 2,0 мг/л 2,4-Д и 0,5 мг/л кинетина, в частности на основе сред N6 и C17. Регенерация растений также варьировала в зависимости от условий, при этом наибольшая эффективность наблюдалась на гормональных средах, содержащих комбинации ауксина и цитокинина. Полученные результаты подтверждают необходимость комплексного подбора компонентов среды и демонстрируют, что правильное сочетание питательной среды и фитогормонов позволяет значительно повысить выход эмбрионов и жизнеспособных регенерантов.

Ключевые слова: андрогенез, культура пыльников, пшеница (*Triticum aestivum* L.), питательная среда, фитогормоны, регенерация растений.

ВВЕДЕНИЕ

Андрогенез представляет собой перспективную биотехнологическую платформу для получения гомозиготных линий пшеницы (*Triticum aestivum* L.) в одно поколение. Это существенно сокращает сроки селекции по сравнению с традиционными методами, требующими многолетнего самоопыления [1, 2]. В одном пыльнике содержится более тысячи микроспор, каждая из которых потенциально способна дать начало гаплоидному или самопроизвольно удвоенному растению [3]. При этом удвоение хромосом, индуцированное либо спонтанное, позволяет получить полностью гомозиготные растения, что делает данный метод особенно ценным в генетике, молекулярной биологии и прикладной селекции [4, 5].

Андрогенез проводится в искусственных условиях *in vitro*, при которых незрелые микроспоры перенаправляются с гаметофитного пути развития на спорофитный путь под действием стрессовых факторов [6]. Среди них наиболее часто применяются термическая обработка, осмотический шок, а также обработка химическими соединениями. Применение метода андрогенеза позволяет в кратчайшие сроки получать полностью гомозиготные линии, пригодные для генетического анализа, картирования признаков и включения в селекционные программы [7, 8].

Несмотря на очевидные преимущества, эффективность андрогенеза у пшеницы варьирует в широких пределах и остаётся недостаточной. Основными проблемами являются низкий уровень индукции эмбриогенеза, образование альбиносных растений, слабая регенерационная способность и низкая частота удвоения хромосом [9]. Наибольшее влияние на эффективность андрогенеза оказывают генотип донора, физиологическое состояние растений, стадия развития микроспор, тип стрессовой обработки и состав питательной среды [6, 10].

Установлено, что яровые и озимые формы пшеницы по-разному реагируют на условия культивирования и тип гормональной стимуляции. Эти различия обусловлены генетическими и физиологическими особенностями, включая чувствительность к фотопериоду и температуре [4, 11]. Озимая пшеница требует прохождения периода яровизации, обладает большей толерантностью к холоду, что может повышать её ответную реакцию на температурный шок при индукции андрогенеза. В то же время яровые формы лучше отвечают на осмотические воздействия и гормональную стимуляцию цитокининами [9].

Состав питательной среды, особенно на этапе индукции эмбриогенеза, играет ключевую роль в эффективности андрогенеза у пшеницы. Как показано в ряде исследований, гормональная регуляция, в частности баланс между ауксинами и цитокининами, оказывает критическое влияние на переориентацию микроспор с гаметофитного на спорофитный путь развития [6, 12]. Наиболее часто используемыми в практике являются среды Мурасиге и Скуга (MC), N6 и C17, каждая из которых имеет свои особенности в составе минеральных компонентов и аминокислот, влияющих на метаболическую активность микроспор.

Среда MC отличается высоким содержанием макро- и микроэлементов, однако при андрогенезе пшеницы она не всегда демонстрирует наивысшую эффективность, особенно при отсутствии оптимального гормонального сопровождения. Среда N6, изначально разработанная для риса, показала более высокую частоту образования эмбрионов в культурах пыльников пшеницы, особенно в комбинации с 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислотой (2,4-Д) в концентрации 2–3 мг/л [10]. Эта концентрация, по литературным данным, способствует симметричному делению микроспор и активному формированию каллуса [13].

Среда C17 также получила широкое применение в

культуре пыльников зерновых. Благодаря сниженной концентрации нитратов и более сбалансированному составу аминокислот, она может снижать частоту альбинизма, часто наблюдаемого в андрогенезе у пшеницы, и повышать долю зеленых регенерантов [7]. Некоторые авторы указывают на то, что добавление цитокининов (например, кинетина в концентрации 0,5 мг/л) к ауксиновому фону усиливает морфогенетический ответ и способствует регенерации растений [9].

Таким образом, эффективность получения гаплоидных растений зависит не только от генотипа донора и условий предварительной обработки, но и от оптимизации питательной среды, в частности — от выбора базового состава (МС, N6, С17) и подбора гормонального фона. Правильное соотношение 2,4-Д и возможного добавления цитокининов может значительно повысить продуктивность культуры пыльников и получить жизнеспособные зеленые растения. Так, целью настоящего исследования является оценка влияния различных вариантов питательной среды на индукцию андрогенеза и эффективность регенерации у генотипов пшеницы казахстанской селекции. Особое внимание уделено сравнительному анализу ответов разных генотипов на гормональный состав среды и оптимизации условий получения зеленых регенерантов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы исследования. В рамках исследования использовали 14 генотипов гибридного материала пшеницы, селекции Карабалыкской СХОС, Карагандинской СХОС им. А.Ф. с целью получения колосьев для выделения пыльников (Таблица 1).

Для получения донорского материала посев осуществ-

ляли в пластиковые горшки объемом 5 литров. В качестве субстрата использовали смесь почвы и песка в соотношении 1:1 по объему. Семена высевали на глубину 5–7 см. В течение всего вегетационного периода растения поливали водой по мере необходимости. Один раз в две недели в качестве удобрения вносили раствор комплексного минерального удобрения «Кристаллон специальный» согласно инструкции производителя. Первые колосья, пригодные для выделения пыльников, начали срезать на 46-й день после посева. Срезанные колосья выдерживали в холодильнике в темноте 14 суток (Рисунок 1).



Рисунок 1. Срезанные колосья пшеницы на этапе предобработки

Цитологическая оценка стадии развития микроспор. Для определения стадии развития микроспор у пшеницы была проведена световая микроскопия. В качестве образцов использовали колосья трёх различных морфологических типов: нераскрывшиеся (замкнутые в листовом

Таблица 1. Используемые генотипы пшеницы и их обозначения в статье

Генотипы	Обозначение
<i>Карабалыкская СХОС</i>	
ALTAYSKAYA 530*2/3/WHEAR/VIVITSI//WHEAR× Лидер 80 (Алтайский НЦА) Индивид. отбор из немецкого сортообразца ШТРУ Р-29	1ALT
LUTESCENS 54/CHYAK1//OMSKAYA 36× Лютесценс 36	16/14
OMSKAYA 35*2/EMB16 (КП ямп - 17 г.) × LANGDON/KU2074 x Ekada 113 (Scala RB 2098/Yuliya)	34/32
DKSI 2020 (WS - 9.KAZ). Короткостебельность (V102.12 WS1154)×ANGDON/ KU2074 x Ekada 113 (Scala RB 2098/Yuliya)	58/56
WS - 11.KAZ× LANGDON/KU2074 x Ekada 113 (Scala RB 2098/Yuliya)	68/64
<i>Карагандинская СХОС им А.Ф. Христенко</i>	
Айна× Татьяна	1/26
Омот GAI (№9)× Целинная 26	5/30
Байтерек× Боевчанка	9/34
Целинная юбилейная × Боевчанка	14/39
Шортандинская 95 улуч × Омот GAI (№1)	21/46
Байтерек 15 × Карагандинская 55	1/36
Тризо × Карагандинская 60	5/40
Лютесцес 2231 × Байтерек 15	8/43
Шортандинская 2015 × Карагандинская 30	13/48

влагалище), частично раскрывшиеся и полностью раскрывшиеся. Из каждого типа колосьев извлекали пыльники с центральной части. Для цитологического анализа микроспоры окрашивали раствором красителя Гимзы. Препараты готовили путём раздавливания пыльников в капле красителя на предметном стекле с последующим микроскопированием при увеличении $\times 400$ – $\times 1000$. Микроскопирование проводили с использованием микроскопа Zeiss Axio Scope A1 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Germany). Определение стадии развития микроспор проводилось визуально по морфологическим признакам клеточного ядра и цитоплазмы. Каждая стадия оценивалась в трех биологических повторностях, по 5 пыльников на повторность. Данные наблюдения использовались для выбора оптимального времени срезки колосьев для дальнейшей индукции андрогенеза.

Индукция андрогенеза. Пыльники пшеницы выделяли на одноядерной стадии развития микроспор и культивировали на двенадцати вариантах питательных сред, обозначенных как I–IV N6, C17 и MC, в зависимости от минеральной основы и состава фитогормонов. Контрольные среды (I-N6, I-C17, I-MC) не содержали регуляторов роста, остальные варианты включали 2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту (2,4-Д) в концентрациях 2,0 (II-), 2,5 (III-) и 3,0 мг/л (IV-) в сочетании с 0,5 мг/л кинетина. Инкубацию пыльников проводили в условиях темноты при температуре 27 °C в течение трёх недель с целью индукции каллусообразования и/или формирования эмбриоидов (Рисунок 2).

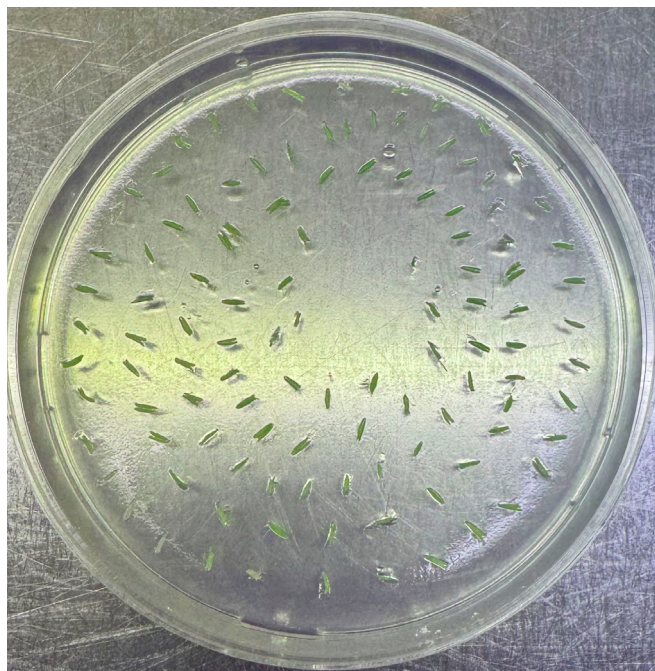


Рисунок 2. Культивированные пыльники пшеницы генотипа 16/14

Регенерация гаплоидных растений. Образованные эмбриоиды пшеницы культивировали на регенерационных средах: MC с добавлением БАП 0,5 мг/л и ИУК 0,5 мг/л; MC с кинетином 0,5 мг/л и ИУК 0,5 мг/л, а также безгормональную среду для стимулирования прорастания побегов и дальнейшей регенерации растений. Экспланты

выращивали в культуральных сосудах в фактеростатной комнате, фотопериод составил 16/8, температура 24–26 °C.

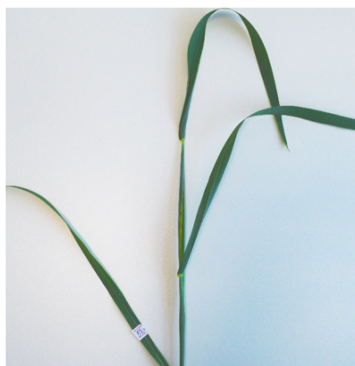
Анализ данных. Для анализа данных по эффективности индукции андрогенеза и последующей регенерации у пшеницы использовались методы описательной и дисперсионной статистики, реализованные в языке программирования Python с использованием библиотек pandas, statsmodels, seaborn и matplotlib. Для оценки влияния минерального состава питательной среды и генотипа донорных растений на уровень индукции андрогенеза был выполнен однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA). Для каждого фактора (тип среды и генотип) была проведена статистическая значимость различий в среднем значении процента индукции. Апостериорный сравнительный анализ между группами проводился с применением теста Тьюки (Tukey HSD) при уровне значимости $\alpha = 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

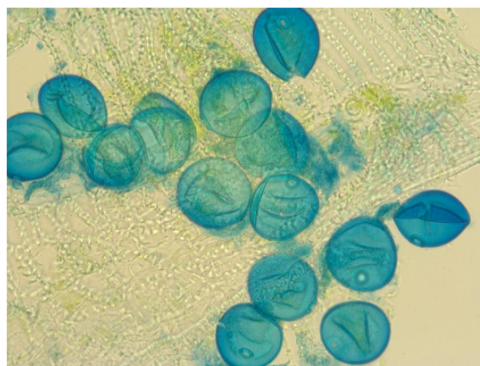
Цитологическая оценка стадии развития микроспор. Развитие микроспор у пшеницы (*Triticum aestivum* L.) тесно связано с морфологическим состоянием колоса, что позволяет использовать внешние признаки растения для ориентировочного определения стадии клеточной дифференцировки. Для повышения эффективности андрогенеза важно точно установить фазу развития микроспор, на которой осуществляется отбор донорского материала. В ходе настоящей работы были проанализированы три морфологические стадии развития колоса: нераскрывшийся, частично вышедший и полностью раскрывшийся колос, соответствующие различным цитологическим стадиям микроспор.

На первой стадии, когда колос полностью скрыт во флаговом листе, а расстояние между флаговым и предпоследним листом не превышает 2 см, микроспоры преимущественно находятся на ранней одноядерной стадии. На рисунке 3а представлен колос, полностью скрытый во флаговом листе. На этой морфологической стадии наблюдается удлинение последнего междоузлия, при этом колос ещё не вышел наружу. Микроскопическое изображение пыльников (Рисунок 3б), изъятых на этом этапе, демонстрирует преимущественное присутствие микроспор с центральным расположенным ядром и отсутствием выраженной вакуолизации, что соответствует ранней одноклеточной стадии. Эта стадия микроспорогенеза предшествует оптимальной фазе для индукции андрогенеза *in vitro*, однако уже свидетельствует о начале перехода микроспор к эмбриогенному потенциалу.

Следующая стадия характеризуется частичным выходом колоса из флагового листа на одну треть или две трети его длины. Морфологически определяется увеличением расстояния между флаговым и предпоследним листом до 3–6 см. На рисунке 4а представлен колос пшеницы, частично приподнятый и начинающий выход из флагового листа, что соответствует переходной фазе между закрытым и полностью вышедшим колосом. Цитологический анализ пыльников, собранных на этой стадии, выявил преобладание микроспор на поздней одноядерной стадии (Рисунок 4б). В этот период микроспоры характеризуются эксцентричным положением ядра и вакуолизацией, что свидетельствует о высокой жизнеспособности.



а — закрытый колос во флаговом листе

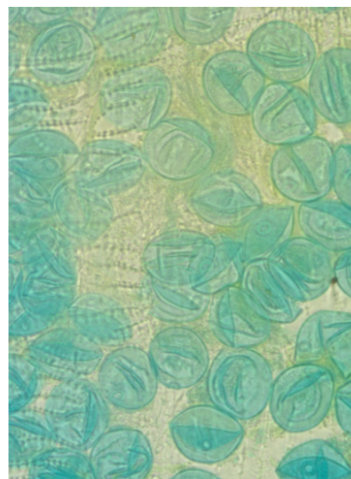


б — микроспоры на ранней одноядерной стадии

Рисунок 3. Морфологическая и цитологическая характеристика пшеницы на стадии, когда колос полностью скрыт во флаговом листе



а — начальная стадия выхода колоса из флагового листа

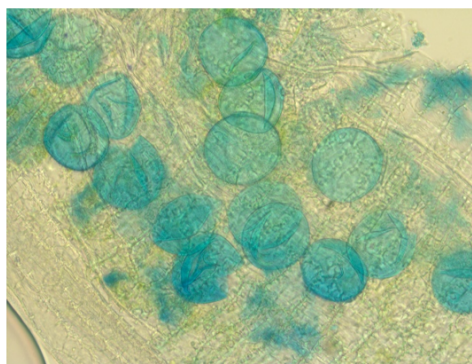


б — микроспоры на поздней одноядерной стадии

Рисунок 4. Морфологическая и цитологическая характеристика пшеницы на стадии частичного выхода колоса из флагового листа



а — поздняя стадия выхода колоса из флагового листа



б — микроспоры преимущественно на поздней двухъядерной стадии

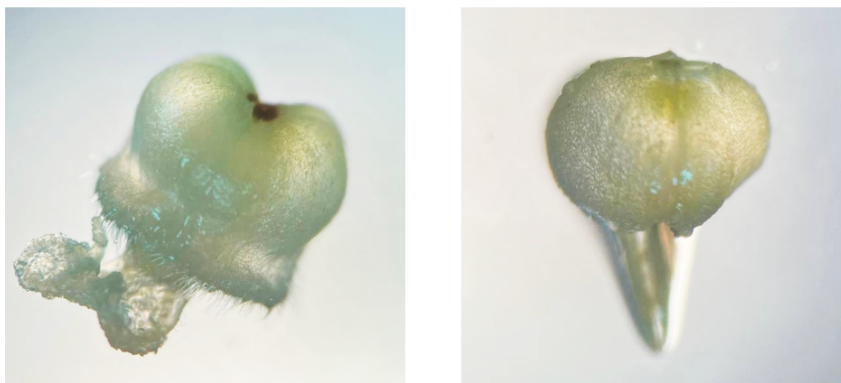
Рисунок 5. Стадия полного выхода колоса с началом колошения

способности и морфогенетическом потенциале клеток. Данная стадия считается наиболее благоприятной для отбора пыльников и последующего культивирования *in vitro* с целью индукции андрогенеза.

На третьей стадии, когда колос полностью выходит из флагового листа и начинается фаза колошения, в микроспорах происходит асимметричное деление с образованием вегетативных и генеративных клеток, что соответствует поздней одноядерной и двухъядерной стадиям. На рисунке 5а колос полностью вышел из флагового ли-

ста, начинается фаза колошения. Микроспоры преимущественно находятся на поздней двухъядерной стадии, что сопровождается снижением их тотипотентности и сниженной способностью к эмбриогенезу (Рисунок 5б). Таким образом, растения на этой стадии не рекомендуются для закладки культур пыльников.

Таким образом, определение морфологической стадии колоса позволяет достоверно прогнозировать цитологическое состояние микроспор и выбирать оптимальный момент для их изоляции. Максимально эффективное инду-



а – эмбрионд генотипа 58/56 на среде II-C17 б – эмбрионд генотипа 1ALT на среде II-N6

Рисунок 6. Образованные эмбриоды пшеницы (увеличение $\times 40$)

цирование андрогенеза достигается при использовании колосьев, находящихся на средней одноядерной стадии развития микроспор, что подтверждается как микроскопическим анализом, так и морфологическими признаками растения.

Индукция андрогенеза. В рамках исследования была проведена оценка эффективности 12 вариантов питательных сред, разработанных на основе минеральных сред N6, C17 и MC, для индукции андрогенеза у пшеницы. Выделенные пыльники культивировали на этих средах с целью стимулирования эмбриогенеза. В качестве фитогормональной регуляции в состав сред добавляли ауксин 2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту (2,4-Д) в трёх концентрациях — 2,0, 2,5 и 3,0 мг/л в сочетании с кинетином в концентрации 0,5 мг/л. Также были включены контрольные варианты без добавления гормонов. В среднем на каждый генотип и вариант питательной среды культивировалось 322 пыльника.

Анализ данных, представленных в таблице 2, показал существенное варьирование эмбриогенной активности как в зависимости от генотипа, так и от состава питательной среды. Наиболее отзывчивым оказался генотип 58/56, у которого на среде II-N6 образовалось 174 эмбри-

оида, на среде II-C17 – 130 (Рисунок 6а) и на III-N6 – 68, тогда как на средах MC количество эмбрионидов не превышало 29. Высокие показатели также отмечены у генотипа 34/32: на II-N6 – 140 эмбрионидов, на III-N6 – 48, на II-C17 – 60, при этом на средах MC формировалось лишь 4–6 эмбрионидов. Генотип 13/48 демонстрировал похожие результаты: максимум на среде II-N6 (126), высокие значения на III-N6 (47) и II-C17 (51) и отсутствие эмбрионидов на среде IV-C17, низкая эффективность на средах MC (0–26). Генотип 68/64 также проявил высокую эмбриогенную способность, особенно на средах II-C17 (148), III-C17 (136) и II-N6 (122), тогда как на IV-C17 количество эмбрионидов уменьшалось до 73, а на MC средах значения не превышали 30.

Другие генотипы показали более умеренные, но стабильные результаты. Так, генотип 1 ALT дал наибольшее число эмбрионидов на II-C17 (120) и II-N6 (109) (Рисунок 6б), несколько ниже на III-N6 (45) и III-C17 (48), тогда как на средах MC формировалось от 8 до 36 эмбрионидов. Генотип 16/14 проявил максимальную активность на средах II-N6 (99) и III-C17 (80), но на большинстве остальных сред количество эмбрионидов не превышало 40. Генотип 1/26 показал хорошие результаты на вариантах II-N6 (134) и II-C17 (108), тогда как на IV-C17 образовалось лишь 63

Таблица 2. Частота образования эмбрионидов на 12 вариантах сред

Генотип	Количество образованных эмбрионидов, шт											
	I_N6	II_N6	III_N6	IV_N6	I_C17	II_C17	III_C17	IV_C17	I_MC	II_MC	III_MC	IV_MC
1 ALT	29	109	45	31	25	120	48	40	11	36	8	16
16/14	24	99	40	16	14	33	80	25	2	23	9	5
34/32	3	140	48	36	16	60	30	33	6	4	4	0
8/43	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
58/56	38	174	68	37	43	130	105	51	19	29	20	13
68/64	37	122	64	38	42	148	136	73	13	30	29	16
1/26	17	134	44	7	24	108	94	63	2	10	0	2
5/30	35	58	25	16	11	84	10	59	0	12	6	8
14/39	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	0
9/34	12	65	27	33	12	113	47	36	2	23	17	8
21/46	11	68	56	25	0	47	92	28	0	0	0	5
1/36	6	112	41	32	10	128	50	24	6	28	18	16
5/40	8	156	38	8	9	165	54	30	0	19	12	3
13/48	11	126	47	16	0	51	66	0	2	26	0	0

эмбриоида, а на МС средах – не более 10. Схожий результат наблюдался у генотипа 5/30: высокий уровень на питательных средах II-N6 (58), II-C17 (84) и IV-C17 (59), но очень низкий на средах МС (до 12 эмбриоидов).

Питательная среда с добавлением 2,0 мг/л 2,4-Д и 0,5 мг/л кинетина положительно влияла на генотип 9/34, где образовано 65 эмбриоидов на среде N6 и 113 эмбриоидов на среде C17. Максимальное количество эмбриоидов у генотипа 21/46 отмечено на среде III-C17 (92 шт), на среде IV-МС получено 5 эмбриоидов или вовсе отсутствовали. Также, II вариант гормонального состава на основе сред N6 и C17 имел положительный эффект на генотипы 1/36 и 5/40, где количество эмбриоидов варьировало от 112 шт до 165 шт.

В то же время ряд генотипов оказался слабо отзывчивым. Генотип 8/43 полностью не формировал эмбриониды на всех вариантах сред, что свидетельствует о его полной нечувствительности к условиям андрогенеза. Генотип 14/39 также можно отнести к неотзывчивым, так как на большинстве сред эмбриогенез отсутствовал.

Таким образом, в ходе эксперимента по индукции андрогенеза у пшеницы выявлены значительные различия как между исследованными генотипами, так и между вариантами питательных сред. Полученные данные показали, что успех эмбриогенеза в существенной степени зависит от исходного генотипа, однако решающим фактором в большинстве случаев являлся состав питательной среды.

Согласно статистике, по фактору «генотип» по всем вариантам сред, наибольшие значения эмбриогенной активности отмечены у образцов 58/56 (60,58 эмбриоидов) и 68/64 (62,33), что свидетельствует о высоком потенциале этих линий к регенерации *in vitro*. Несколько других генотипов также характеризовались повышенной активностью: 1 ALT (43,17), 1/26 (42,08), 1/36 (39,25), 5/40

Таблица 3. Результаты описательной статистики по фактору «Генотип»

Генотип	Среднее кол-во эмбриоидов, шт
1 ALT	43,17±35,69
1/26	42,08±46,84
1/36	39,25±40,18
13/48	28,75±38,35
14/39	0,75±2,60
16/14	30,83±29,81
21/46	27,67±31,34
34/32	31,67±39,41
5/30	27,00±26,50
5/40	41,83±57,64
58/56	60,58±50,29
68/64	62,33±47,51
8/43	0,00±0,00
9/34	32,92±30,88
Данные представлены в виде среднего значения ± стандартного отклонения (Mean ± SD)	

(41,83), 58/56 (60,58) и 68/64 (62,33). При этом часть образцов продемонстрировала низкие показатели, включая 13/48 (28,75), 21/46 (27,67), 5/30 (27,00) и 16/14 (30,83). Минимальные результаты наблюдались у генотипов 14/39 (0,75) и 8/43 (0,00), которые практически не образовывали эмбриоидов, что указывает на выраженный генотипический барьер для андрогенеза (Таблица 3).

При сравнении питательных сред выявлено, что варианты без добавления гормонов характеризовались минимальной эмбриогенной активностью: I-N6 — 16,50; I-C17 — 14,71; I-МС — 4,50. Среди гормональных сред наибольшую эффективность продемонстрировали варианты II-N6 (97,36) и II-C17 (84,79), содержащие 2,0 мг/л 2,4-Д и 0,5 мг/л кинетина. Их показатели были статистически достоверно выше по сравнению как с контролем, так и с другими вариантами. Среды III-N6 (38,79) и III-C17 (58,00), содержащие более высокую концентрацию 2,4-Д (2,5 мг/л), обеспечивали промежуточные значения. Наименее эффективными оказались среды МС, даже с добавлением гормонов (II-МС — 17,14; III-МС — 9,43; IV-МС — 6,57) (Таблица 4). Это подтверждает, что основным условием успешной индукции является наличие оптимальной концентрации ауксина, в то время как повышение его дозы или использование другой минеральной основы приводит к снижению эффективности.

Таблица 4. Результаты описательной статистики по фактору «Среда»

Варианты питательных сред	Среднее кол-во эмбриоидов, шт
I-N6 без гормонов	16,50±13,66
II-N6 с 2,0 мг/л 2,4-Д и 0,5 мг/л кинетина	97,36±3,11
III-N6 с 2,5 мг/л 2,4-Д и 0,5 мг/л кинетина	38,79±20,28
IV-N6 с 3,0 мг/л 2,4-Д и 0,5 мг/л кинетина	21,07±13,79
I-C17 без гормонов	14,71±14,36
II-C17 с 2,0 мг/л 2,4-Д и 0,5 мг/л кинетина	84,79±53,46
III-C17 с 2,5 мг/л 2,4-Д и 0,5 мг/л кинетина	58,00±40,58
IV-C17 с 3,0 мг/л 2,4-Д и 0,5 мг/л кинетина	33,00±23,21
I-МС без гормонов	4,50±5,92
II-МС с 2,0 мг/л 2,4-Д и 0,5 мг/л кинетина	17,14±12,59
III-МС с 2,5 мг/л 2,4-Д и 0,5 мг/л кинетина	9,43±8,91
IV-МС с 3,0 мг/л 2,4-Д и 0,5 мг/л кинетина	6,57±6,35
Данные представлены в виде среднего значения ± стандартного отклонения (Mean ± SD)	

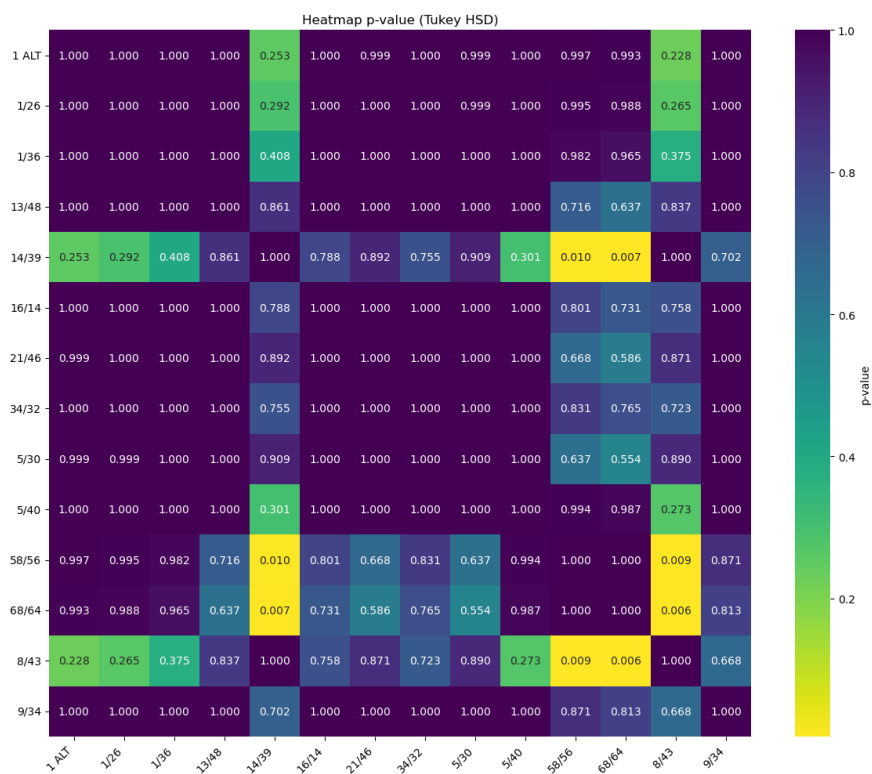


Рисунок 7. Тепловая карта p-value по результатам теста Тьюки по фактору «Генотип»



Рисунок 8. Тепловая карта p-value по результатам теста Тьюки по фактору «Среда»

Однофакторный дисперсионный анализ подтвердил достоверность полученных различий. Для фактора «генотип» $F=2,71$ при $p=0,0018$, что свидетельствует о наличии значимых различий между исследованными линиями. Для фактора «среда» различия оказались ещё более выраженными: $F=17,56$ при $p<0,0001$, что подчёркивает решающее влияние состава питательной среды на частоту эмбрионидогенеза.

Также, исходя из представленной тепловой карты р-значений теста Тьюки по фактору «генотип» (Рисунок 7), можно заключить, что генотипы 68/64 и 58/56 были наиболее отзывчивыми на этапе индукции эмбриоидов у пшеницы, что подтверждается их статистически значимыми различиями ($p < 0.05$) при сравнении с наименее отзывчивыми формами, такими как 14/39 и 8/43. В частности, генотип 68/64 демонстрирует наиболее выражен-

ные отличия, показывая крайне низкие р-значения (менее 0.01) при попарном сравнении с большинством генотипов, что указывает на его высокую эмбриогенную активность. Аналогично, генотип 58/56 также показывает статистически значимые различия, но в меньшей степени. Генотипы 14/39 и 8/43 выделяются как неотзывчивые на индукцию, что подтверждается их статистически значимыми различиями при сравнении с большинством других генотипов.

Для фактора «среда» различия оказались более выраженными. Тепловая карта p-value показала, что среды II-N6 и II-C17 достоверно отличались от большинства других вариантов, особенно от контрольных сред без гормонов и от всех вариантов на основе МС (p<0,01) (Рисунок 8). При этом внутри группы МС-сред различий практически не наблюдалось, что указывает на их одинаково низкую эффективность.

Таким образом, анализ полученных данных показывает, что наиболее перспективными для индукции андрогенеза оказались среды II-N6, II-C17 и III-C17, которые обеспечили максимальные значения у большинства генотипов. Среды на основе МС демонстрировали низкие результаты, что указывает на их недостаточную эффективность для культуры пыльников пшеницы. В то же время выявлена чёткая генотипическая зависимость: часть генотипов (58/56, 34/32, 68/64, 13/48) стабильно формировали большое количество эмбриоидов, тогда как другие (8/43, 5/40, 9/34) отличались крайне низкой эмбриогенной активностью вне зависимости от условий.

Регенерация гаплоидных растений. Для оценки способности различных генотипов пшеницы к регенерации *in vitro* проведено культивирование эмбриоидов на трёх вариантах питательных сред: МС без добавления фитогормонов, МС с 0,5 мг/л 6-бензиламинопурина (БАП) и 0,5 мг/л индолилуксусной кислоты (ИУК), а также МС



Рисунок 9. Регенерант генотипа 13/48 на среде МС с добавлением кинетина 0,5 мг/л и НУК 0,5 мг/л

с 0,5 мг/л кинетина и 0,5 мг/л нафтилуксусной кислоты (НУК). Регенерационная активность оценивалась по количеству полученных регенерантов и проценту регенерации (Таблица 5).

Анализ влияния вариантов среды МС показал, что наибольшая эффективность регенерации наблюдалась на среде с добавлением кинетина 0,5 мг/л и НУК 0,5 мг/л. Этот вариант обеспечивал формирование наибольшего числа регенерантов практически у всех отзывчивых генотипов: так, у генотипа 9/34 получено 14 растений, у 5/30

Таблица 5. Результаты регенерации пшеницы на трех вариантах сред

Генотип	Количество культивированных эмбриоидов, шт	Варианты питательных сред			Общее количество регенерантов, шт	% регенерации
		МС без гормонов	МС с БАП 0,5 мг/л и ИУК 0,5 мг/л	МС с кинетином 0,5 мг/л и НУК 0,5 мг/л		
1 ALT	54	0	3	2	5	9,26
16/14	46	0	4	2	6	13,04
34/32	42	1	7	9	17	40,48
58/56	50	2	12	6	20	40,00
68/64	45	1	11	8	20	44,44
1/26	52	3	6	4	13	25,00
5/30	47	1	18	11	30	63,83
14/39	51	2	3	2	7	13,73
9/34	55	4	13	14	31	56,36
21/46	48	0	15	9	24	50,00
1/36	64	1	8	10	19	29,69
5/40		2	12	8	22	36,07
61						
13/48	54	1	8	12	21	38,89

– 11, у 21/46 – 9 и у 13/48 – 12 (Рисунок 9).

Среда с добавлением БАП 0,5 мг/л и ИУК 0,5 мг/л также показала высокий потенциал для ряда генотипов. Например, у линии 5/30 именно этот вариант обеспечил 18 регенерантов, что составило более половины общего числа растений. Высокие показатели были также отмечены у генотипов 9/34 (13 регенерантов) и 21/46 (15 регенерантов), что подтверждает стимулирующее действие данной комбинации гормонов на процессы органогенеза.

В то же время среда МС без гормональных добавок имела крайне ограниченный эффект. На ней наблюдалась единичная регенерация растений только у отдельных генотипов, таких как 34/32, 58/56, 68/64 и 14/39, тогда как большинство линий полностью не реагировали. Это свидетельствует о том, что для успешной реализации регенерационного потенциала необходим экзогенный гормональный сигнал, тогда как базовая среда играет скорее поддерживающую роль.

Сопоставление данных между генотипами и условиями культивирования позволяет заключить, что наиболее эффективным подходом является использование среды МС с добавлением комбинаций ауксина и цитокинина, обеспечивающих высокий уровень морфогенетической активности. При этом отдельные генотипы (например, 5/30, 9/34, 21/46) проявляют высокую универсальность и формируют значительное количество растений на обоих гормональных вариантах, тогда как другие генотипы демонстрируют выраженную селективность к определённому составу среды.

Таким образом, полученные результаты не только подтверждают ключевую роль гормонального баланса в регенерации эмбриоидов, но и подчёркивают генотипическую специфику отклика, что имеет принципиальное значение при разработке протоколов получения гаплоидных линий у пшеницы. Высокие показатели у отдельных линий (5/30, 9/34, 21/46) позволяют рассматривать их в качестве перспективных доноров для получения гаплоидных растений.

ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние питательных сред и фитогормональной регуляции на индукцию андрогенеза в пшенице является одним из наиболее критических факторов, определяющих успех культуры пыльников. Полученные результаты показали, что минеральная основа и состав гормональных добавок существенно влияют на эмбриогенную активность. Наиболее эффективными оказались среды N6 и C17 с добавлением 2,0 мг/л 2,4-Д в сочетании с 0,5 мг/л кинетина. В то время как повышение концентрации ауксина до 2,5–3,0 мг/л снижало эмбриогенную активность, что подтверждает наличие узкого диапазона оптимальных условий. Это согласуется с выводами исследования, где отмечено, что тип и доза гормонов определяют характер отклика, причём весенние и озимые формы пшеницы различаются по реакции на комбинации ауксинов и цитокининов [9].

В нашем исследовании прослеживались различия между генотипами: линии 58/56, 34/32, 13/48 и 68/64 продемонстрировали максимальные показатели эмбриогенеза на средах N6 и C17, в то время как генотипы 8/43 и 5/40

практически не формировали эмбриоидов. Эти данные подтверждают известную генотипическую зависимость андрогенеза, которая неоднократно подчёркивалась в литературе [14, 15]. Более того, полученные результаты хорошо коррелируют с данными [3], показавшими, что у яровых форм уровень эмбриогенеза и регенерации выше, чем у озимых, и что отдельные комбинации гормонов позволяют частично компенсировать низкую отзывчивость генотипов.

Минеральная основа среды также оказала существенное влияние на эффективность андрогенеза. В условиях нашего эксперимента среды МС показали наименьшие показатели, что согласуется с данными Kim и Baenziger, которые разработали улучшенный протокол на модифицированной среде с добавлением фенилуксусной кислоты и зеатина, позволивший достичь высокой частоты эмбриоидов у отдельных генотипов [12]. Это указывает на то, что базовый состав среды является не менее значимым, чем гормональные добавки, и требует адаптации к конкретным генотипам.

Что касается регенерации, наиболее высокие результаты были получены на средах МС, содержащих комбинации ауксина и цитокинина. Так, среда с кинетином и ИУК способствовала получению максимального числа регенерантов у генотипов 9/34, 5/30 и 13/48, а среда с БАП и ИУК оказалась наиболее результативной для генотипов 5/30 и 21/46. Эти данные подтверждают, что регенерация растений тесно связана с правильным подбором гормональных комбинаций, а также демонстрируют, что разные линии могут проявлять селективность к определённым вариантам регуляции органогенеза. Похожие результаты описаны в работе Broughton, где культивирование с добавлением ауксина и цитокинина значительно повышало количество эмбриоподобных структур и зелёных растений [16].

Анализ наших данных в сравнении с литературными источниками показывает, что андрогенез у пшеницы остаётся процессом с выраженной генотипической зависимостью. Высокая отзывчивость отдельных линий, таких как 58/56 и 68/64, позволяет рассматривать их как перспективные доноры для создания протоколов с высокой эффективностью. В то же время линии, характеризующиеся низким откликом, могут использоваться в качестве тестовых моделей для оптимизации условий среды. Похожие выводы были сделаны и в исследованиях по гибридным комбинациям, где отмечалась высокая изменчивость откликов даже у близкородственных генотипов [14, 15].

Важно отметить, что в дополнение к классической культуре пыльников активно развиваются альтернативные подходы к получению гаплоидов. Так, метод опыления пшеницы пылью кукурузы (wheat × maize) позволяет получать гаплоидные растения через элиминацию хромосом кукурузы. Gupta и др. показали, что эффективность данного метода варьирует в зависимости от генотипа и условий обработки, однако может достигать высоких уровней эмбриогенеза и регенерации [17]. Другим направлением является использование меди и других микроэлементов, которые, по данным исследований, способны стимулировать образование зелёных растений [3].

Таким образом, проведённое исследование подтвер-

дило ключевую роль генотипа, минеральной основы и гормонального состава среды в реализации андрогенеза и последующей регенерации растений у пшеницы. Совокупность полученных данных и их сопоставление с литературными источниками демонстрируют необходимость комплексного подхода к оптимизации протоколов для каждого конкретного генотипа. Это открывает перспективы для дальнейшего повышения эффективности получения удвоенных гаплоидов, что особенно важно для ускорения селекционных программ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследование показало, что эффективность андрогенеза у пшеницы определяется как составом питательной среды, так и генотипом донора. Наибольший выход эмбрионидов обеспечили среды N6 и C17 с добавлением 2,0 мг/л 2,4-Д и 0,5 мг/л кинетина, тогда как повышение концентрации ауксина до 2,5–3,0 мг/л снижало результативность, а среды MC были наименее эффективны. Регенерация растений наиболее успешно проходила на средах MC с добавлением кинетина 0,5 мг/л и НУК 0,5 мг/л, тогда как безгормональная среда практически не обеспечивала морфогенеза. Наиболее отзывчивыми оказались генотипы 58/56, 68/64, 34/32 и 5/30, демонстрировавшие высокий уровень эмбриогенеза и регенерации, тогда как генотип 8/43 полностью не реагировал на условия индукции.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках научно-технической программы BR24992903 «Практическое внедрение современных молекулярно-генетических, физиолого-биохимических, биотехнологических методов и цифрового фенотипирования в селекцию экономически значимых сельскохозяйственных культур» на 2024-2026 годы при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Республики Казахстан.

ЛИТЕРАТУРА

1. Baenziger P.S. Reflections of doubled haploids in plant breeding // In vitro haploid production in higher plants, vol. 1: fundamental aspects and methods / Eds.: Jain S.M., Sopory S.K., Veileux R.E. – Norwell, MA: Kluwer Academic Publishers, 1996. – С. 35–48.
2. Kasha K.J., Maluszynski M. Production of doubled haploids in crop plants // Doubled Haploid Production in Crop Plants / Eds.: Maluszynski M., Kasha K.J., Forster B.P., Szarejko I. – Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2003. – С. 1–4.
3. Grauda D., et al. Anther culture effectiveness in producing doubled haploids of cereals // Proceedings of the Latvian Academy of Sciences. – 2014. – Т. 68. – № 3–4. – С. 142.
4. Makowska K., Oleszczuk S., Zimny A., Czaplicki A., Zimny J. Androgenic capability among genotypes of winter and spring barley // Plant Breeding. – 2015. – Т. 134. – С. 668–674.
5. Osadchaya T.S., Pershina L.A., Trubacheeva N.V., Belan I.A., Rosseeva L.P., Devyatkina E.P. Androgenetic ability in euplasmic lines of common wheat and alloplasmic

recombinant lines (H. vulgare–T. aestivum) carrying 1RS.1BL and 7DL–7Ai translocations and development of double haploid lines // Russian Journal of Genetics: Applied Research. – 2015. – Т. 5. – С. 174–181.

6. Testillano P.S. Microspore embryogenesis: targeting the determinant factors of stress-induced cell reprogramming for crop improvement // Journal of Experimental Botany. – 2019. – Т. 70. – С. 2965–2978.

7. Grauda D., Lepse N., Strazdina V., Kokina I., Lapina L., Mikelsone A., Lubinskis L., Rashal I. Obtaining of doubled haploid lines by anther culture method for the Latvian wheat breeding // Agronomy Research. – 2010. – Т. 8. – С. 545–552.

8. Dwivedi S.L., Britt A.B., Tripathi L., Sharma S., Upadhyaya H.D., Ortiz R. Haploids: constraints and opportunities in plant breeding // Biotechnology Advances. – 2015. – Т. 33. – С. 812–829.

9. Weigt D., Kiel A., Siatkowski I., Zyprych-Walczak J., Tomkowiak A., Kwiatek M. Comparison of the androgenic response of spring and winter wheat (Triticum aestivum L.) // Plants. – 2019. – Т. 9. – № 1. – С. 49.

10. Zhou H., Konzak C.F. Improvement of anther culture methods for haploid production in wheat // Crop Science. – 1989. – Т. 29. – С. 817–821.

11. Sharma S., Sethi G.S., Chaudhary H.K. Influence of winter and spring wheat genetic backgrounds on haploid induction parameters and trait correlations in the wheat × maize system // Euphytica. – 2005. – Т. 144. – С. 199–205.

12. Kim K.M., Baenziger P.S. A simple wheat haploid and doubled haploid production system using anther culture // In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant. – 2005. – Т. 41. – С. 22–27.

13. Jacquard C., et al. Microspore embryogenesis and programmed cell death in barley: effects of copper on albinism in recalcitrant cultivars // Plant Cell Reports. – 2009. – Т. 28. – С. 1329–1339.

14. Zamani I., Gouli-Vavdinoudi E., Kovacs G., Xynias I., Roupakias D., Barnabas B. Effect of parental genotypes and colchicine treatment on the androgenic response of wheat F1 hybrids // Plant Breeding. – 2003. – Т. 122. – С. 314–317.

15. El-Hennawy M.A., Abdalla A.F., Shafey S.A., Al-Ashkar I.M. Production of doubled haploid wheat lines (Triticum aestivum L.) using anther culture technique // Annals of Agricultural Sciences. – 2011. – Т. 56. – № 2. – С. 63–72.

16. Broughton S. Ovary co-culture improves embryo and green plant production in anther culture of Australian spring wheat (Triticum aestivum L.) // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. – 2008. – Т. 95. – № 2. – С. 185–195.

17. Gupta V., Kumar S., Singroha G., Mishra C.N., Kumar R., Tiwari V. Induction of haploids in wheat using wheat × maize system of chromosome elimination // Journal of Wheat Research. – 2016. – Т. 8. – № 2. – С. 43–48.

UDC: 57.085.2

SELECTION OF CULTURE MEDIA FOR ANDROGENESIS INDUCTION AND WHEAT (*TRITICUM AESTIVUM* L.) PLANT REGENERATION IN ANTHER CULTURENurtaza A.S.¹, Narmakhan K.N.^{1,2}, Kakimzhanova A.A.¹¹ LLP «National center for biotechnology», 010000, Kazakhstan, Astana, Qorgalzhyn highway, 13/5² Non-Commercial JSC «L.N.Gumilyov Eurasian National University», 010000, Kazakhstan, Astana, Satpayev str., 2

*Corresponding author: kakimzhanova@biocenter.kz

ABSTRACT

Androgenesis in anther culture is a promising method for the accelerated production of homozygous wheat (*Triticum aestivum* L.) lines; however, the widespread application of this technology is limited by strong genotype dependence and low regeneration efficiency. The aim of this study was to optimize the conditions for androgenesis induction and plant regeneration by selecting the appropriate culture medium and hormonal composition. Twelve medium variants based on N6, C17, and MS were tested with the addition of different concentrations of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). The highest embryogenic activity was observed on media containing 2.0 mg/L 2,4-D and 0.5 mg/L kinetin, particularly on N6 and C17 bases. Plant regeneration also varied depending on the conditions, with the highest efficiency observed on hormonal media containing auxin and cytokinin combinations. The results confirm the necessity of a comprehensive selection of medium components and demonstrate that the proper combination of nutrients and phytohormones can significantly increase the yield of embryoids and viable regenerants.

Keywords: androgenesis, anther culture, wheat (*Triticum aestivum* L.), culture medium, phytohormones, plant regeneration.

ӘОЖ: 57.085.2

БИДАЙДЫҢ (*TRITICUM AESTIVUM* L.) ТОЗАҢҚАП МӘДЕНИЕТІНДЕ АНДРОГЕНЕЗ ИНДУКЦИЯСЫ МЕН ӨСІМДІК РЕГЕНЕРАЦИЯСЫНА АРНАЛҒАН ҚОРЕКТІК ОРТАЛАРДЫ ТАҢДАУНұртаза А.С.¹, Нармахан Қ.Н.^{1,2}, Какимжанова А.А.¹¹ ЖШС «Ұлттық биотехнология орталығы», 010000, Қазақстан, Астана, Қорғалжын тас жолы, 13,5² КеАҚ «Л.Н. Гумилёв атындағы Еуразия ұлттық университеті», 010000, Қазақстан, Астана, Қ.Сәтбаев көшесі, 2

*Корреспондент автор: kakimzhanova@biocenter.kz

ТҮЙІН

Тозаңқап мәдениетіндегі андрогенез бидайдың (*Triticum aestivum* L.) гомозиготты линияларын жедел алу үшін болашағы зор әдіс болып табылады, алайда бұл технологияны кеңінен қолдану генотипке күшті тәуелділік пен регенерация тиімділігінің төмендігімен шектеледі. Зерттеудің мақсаты – андрогенез индукциясы мен өсімдіктердің регенерациясын оңтайландыру үшін қоректік орта мен гормондық құрамды іріктеу. Жұмыста N6, C17 және MS негізіндегі 12 орта нұсқасы әртүрлі концентрациядағы 2,4-дихлорфеноксиқышқылы (2,4-Д) қосып зерттелді. Ең жоғары эмбриогендік белсенділік құрамында 2,0 мг/л 2,4-Д және 0,5 мг/л кинетин бар, әсіресе N6 және C17 негізіндегі орталарда байқалды. Өсімдіктердің регенерациясы да жағдайларға байланысты өзгерді, ең жоғары тиімділік ауксин мен цитокинин комбинациясы бар гормондық орталарда тіркелді. Алынған нәтижелер ортаның компоненттерін кешенді таңдаудың қажеттілігін растайды және қоректік орта мен фитогормондардың дұрыс үйлесімі эмбриондар мен өміршең регенеранттардың шығымын айтарлықтай арттыра алатынын көрсетеді.

Кілт сөздер: андрогенез, тозаңқап мәдениеті, бидай (*Triticum aestivum* L.), қоректік орта, фитогормондар, өсімдік регенерациясы.