

ПРОДУЦЕНТЫ, БИОЛОГИЯ,
СЕЛЕКЦИЯ, ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИНЖЕНЕРИЯ

УДК 633.1

РАЗМНОЖЕНИЕ *in vitro* ПШЕНИЧНО-РЖАНЫХ ГИБРИДОВ
И ГАПЛОИДНЫХ РАСТЕНИЙ РОДА \times *Triticosecale* Wittmack

© 2023 г. А. О. Блинков¹ *, М. Алкубеси^{1, 2}, Д. С. Ульянов¹, В. С. Рубец²,
Н. В. Злобнова¹, Г. И. Карлов¹, П. Н. Харченко¹, М. Г. Дивашук¹

¹Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, Москва, 127550 Россия

²Российский государственный аграрный университет—Московская
сельскохозяйственная академия им. К.А. Тимирязева, Москва, 127434 Россия

*e-mail: aoblinkov@gmail.com

Поступила в редакцию 13.10.2022 г.

После доработки 16.11.2022 г.

Принята к публикации 21.11.2022 г.

Отдаленная гибридизация, получение удвоенных гаплоидов и амфидиплоидов — широко распространенные методы создания исходного материала в селекции злаков. Однако эти подходы связаны с проблемой стерильности созданных растений и трудностей при получении семян от самоопыления или беккроссирования. Эти проблемы ведут к потере уникального генетического материала в селекционных процессах. Определенным инструментом для размножения и сохранения таких растений может быть клональное микроразмножение. В связи с тем, что клеточные технологии находятся в строгой зависимости от ряда факторов, таких как генотип, состав питательной среды и условий культивирования, важной задачей является создание более универсальных подходов к регенерации растений. В представленном исследовании показано влияние фазы развития первоначального экспланта и условий культивирования на успешное получение растений-регенерантов в культуре молодых колосьев *in vitro*. Экспериментально продемонстрирован наивысший морфогенетический потенциал молодых колосьев на 5–6 этапе органогенеза по Куперман [1] или 31–36 фазе по Zadoks и др. [2]. Для индукции каллуса оптимальным условиям соответствовала инкубация молодых колосьев в темноте при 25°C на среде Murashige–Skoog (MS), дополненной 2 мг/л 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д), в течение 4 недель с последующим стимулированием соматического эмбриогенеза на среде MS, дополненной 0.5 мг/л 1-нафталинуксусной кислоты (НУК) и 0.5 мг/л кинетина. Возможность размножения и сохранения стерильных растений была проверена на 8 пшенично-ржаных гибридах и гаплоидах тритикале.

Ключевые слова: амфигаплоиды, гаплоиды, злаки, клональное микроразмножение, отдаленная гибридизация

DOI: 10.56304/S0234275823010039

В создании исходного материала для селекции злаков активно используют методы, связанные с манипуляцией уровнями пloidности. Это получение удвоенных гаплоидов [3–7], отдаленная гибридизация [8, 9] и синтез амфидиплоидов [10–12]. Удвоенные гаплоиды злаков играют большую роль не только в селекции при получении чистых линий и их изучении на пригодность использования как сорта [13–16], но также и в генетике: для индукции мутаций на гаплоидном уровне [17], при интрогрессии [18, 19] и картировании [20–22] генов. За последние годы технология получения удвоенных гаплоидов нашла применение в редактировании генома с использованием системы CRISPR/Cas для получения гомозиготных по отредактированному гену растений [23–25]. Не меньшей популярностью в селекции пользуется

отдаленная гибридизация — лидирующий метод в интрогрессии ценных генов из диких сородичей злаков в культурные виды [26–28]. Синтез амфидиплоидов находит применение не только для увеличения генофонда искусственно созданных человеком родов растений, таких как тритикале (\times *Triticosecale* Wittmack) и тритордеум (\times *Tritordeum martinii* A. Pujadas) [29–32], но также для ре-синтеза существующих культурных аллополиплоидных злаков [10, 33].

Несмотря на значимость данных методов в современной генетике, селекции и биотехнологии злаков, у них есть ограничивающие факторы, связанные со стерильностью полученных генотипов. Гибриды, созданные в процессе отдаленной гибридизации, в связи с наличием негомологичных субгеномов и нарушений в процессе мейоза

Таблица 1. Используемые в работе генотипы
Table 1. Genotypes used

Гибридная комбинация		
номер	расшифровка	плоидность
159h	<i>Triticum persicum</i> var. <i>fuliginosum</i> К-19726 × <i>Secale cereale</i> Альфа	Амфигаплоид
160h	<i>T. aestivum</i> var. <i>hostianum</i> (<i>Croc1/Ae.squarrosa</i> (205)// <i>Kauz/3/Sasia/4/Chuan-Mai</i> 28) × <i>S. cereale</i> Альфа	Амфигаплоид
163h	<i>T. aestivum</i> var. <i>hostianum</i> (<i>Croc1/Ae.squarrosa</i> (205)// <i>Kauz/3/Sasia/4/Chuan-Mai</i> 28) × <i>S. cereale</i> Саратовская 6	Амфигаплоид
165h	<i>T. persicum</i> var. <i>stramineum</i> К-6429 × <i>S. cereale</i> Саратовская 6	Амфигаплоид
166h	<i>T. persicum</i> var. <i>fuliginosum</i> К-19726 × <i>S. cereale</i> Саратовская 6	Амфигаплоид
167h	<i>T. durum</i> Марина × <i>S. cereale</i> Саратовская 6	Амфигаплоид
168h	<i>T. turgidum</i> Терра × <i>S. cereale</i> Альфа	Амфигаплоид
557h	× <i>Triticosecale</i> (♀ (× <i>Triticosecale</i> 21759/97 × <i>S. cereale</i> Альфа) × ♂ × <i>Triticosecale</i> Тимирязевская 150)	Гаплоид

формируют стерильную пыльцу и яйцеклетки. Это приводит к частичной или полной невозможности получить семена от самоопыления или бек-кроссирования отдаленных гибридов [32, 34, 35]. В то же время использование различных антимитотиков, таких как колхицин, трифлюралин, оризалин, амипрофосметил и другие, в удвоенном хромосом гаплоидных и амфигаплоидных растений редко приводит к получению 100%-ного выхода растений с удвоенным геномом [36–38]. Такие растения после вегетации обычно погибают, что приводит к потере уникального генетического материала.

Один из методов сохранения и размножения стерильных гибридов и гаплоидов — клональное микроразмножение *in vitro*. Высокая эффективность этой технологии продемонстрирована при размножении и сохранении таких стерильных межвидовых гибридов как *Brassica fruticulose* × *B. campestris* за счет индукции прямого органогенеза из верхушечных или пазушных почек стебля, а также индукции каллуса с последующей регенерацией побегов из эксплантов листьев [39]; при индукции соматического эмбриогенеза из черешков листа стерильного гибрида *Panax ginseng* × *P. quinquefolius* [40] и в других экспериментах. В некоторых работах продемонстрирована возможность использования молодого (зачаточного) колоса как первичного экспланта в клональном микроразмножении стерильных отдаленных гибридов злаков *Aegilops crassa* × *Hordeum vulgare* [41], *H. vulgare* × *Triticum aestivum* [42], гибридов *T. aestivum* с различными видами *Agropyron* [43], *Agropyron repens* × *Bromus inermis* [44], гибридов *H. vulgare* с рядом диких видов ячменя [45], пшенично-ржаных гибридов и гаплоидов тритикале [46]. Последний вид экспланта также получил распространение в трансформации растений, так как изолирование зачатков колоса

происходит быстрее, чем изолирование незрелых зародышей, а также проходит меньше времени с момента посева до получения необходимого типа экспланта. Кроме того, сообщалось, что процесс изолирования зачатков колоса сопровождается меньшей контаминацией, чем использование незрелых зародышей [47–50]. Однако этот вид экспланта не получил широкого распространения в связи с меньшим регенерационным потенциалом по сравнению с незрелыми зародышами. Следует сказать, что это может быть связано с тем, что до сих пор нет отработанного протокола использования зачатка колоса как первоначального экспланта для регенерации растений. В ряде работ сообщается о низкой эффективности этого метода для регенерации растений со стерильных злаков [43, 45].

В связи с этим целью проведенной нами работы был подбор оптимальных условий для индукции соматического эмбриогенеза в культуре молодых колосьев стерильных злаков для их депонирования в культуре *in vitro* и дальнейшей селекционной работы.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Растительный материал и условия выращивания

Для экспериментов использовали 7 пшенично-ржаных гибридов и одно гаплоидное растение озимой тритикале (× *Triticosecale* Wittm.) (табл. 1).

Гаплоидные и амфигаплоидные растения были получены, как описано ранее [51], и все остались стерильными после обработки колхицином. Растения выращивали в 5-литровых вегетационных сосудах, заполненных торфом. В теплый период времени сосуды с растениями держали вне помещения, с наступлением холодов заносили в теплицу. На протяжении всей вегетации каждые

две недели растения подкармливали азофоской (NPK 16:16:16; “Fertica”, Россия) из расчета 2 г/растение и проводили рыхление почвы. Полив, а также обработку от вредителей и болезней проводили по мере необходимости. Стебли, находящиеся на требуемых стадиях развития, срезали у растений, находящихся в тепличных условиях.

Условия культивирования

Для эксперимента по поиску первоначального экспланта, обладающего наибольшим регенерационным потенциалом, использовали побеги четырех генотипов (159*h*, 160*h*, 163*h*, 165*h*), содержащие молодые колосья на разных стадиях развития: а) V этап органогенеза по Куперман [1]; 31–32 подфазы по Zadoкс и др. [2] (в дальнейшем фаза 1); б) VI этап органогенеза по Куперман [1]; 33–36 подфазы по Zadoкс и др. [2] (в дальнейшем фаза 2); в) начало VII этапа органогенеза по Куперман [1]; 37–38 подфазы по Zadoкс и др. [2] (в дальнейшем фаза 3) (рис. 1*a*).

Со срезанных стеблей удаляли все листья и подвергали поверхностной стерилизации путем тщательного протирания 96%-ным этиловым спиртом в асептических условиях ламинарного бокса. Стерильным скальпелем на стеблях делали продольный надрез и находящиеся внутри молодые колосья осторожно вынимали с помощью пинцета. В качестве эксплантов использовали целые колосья размером около 1 см (для колосьев, находящихся в фазе 1), а также колосья, разрезанные на фрагменты размером 1.5–2.0 см (для колосьев, находящихся в фазах 2 и 3). Подготовленные экспланты помещали в чашки Петри с агаризованной средой Murashige–Skoog (MS), дополненной 2 мг/л 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д; Sigma-Aldrich, США), рН 5.7, для индукции каллусообразования.

При исследовании влияния условий культивирования на процессы регенерации чашки Петри, содержащие подготовленные экспланты четырех генотипов (159*h*, 160*h*, 163*h*, 165*h*), инкубировали при 25°C либо в полной темноте (24 ч ночь), либо в режиме 16 ч день/8 ч ночь в течение 4 недель. Экспланты пассировали на свежую питательную среду через две недели.

После 4 недель культивирования первоначальные экспланты с появившимся на них каллусом переносили на среду MS, дополненную 0.5 мг/л 1-нафталинуксусной кислоты (НУК; Sigma-Aldrich) и 0.5 мг/л кинетина (Sigma-Aldrich) (рН 5.7), при 16-часовом фотопериоде и температуре 25°C. Пассирование осуществляли каждые две недели до формирования побегов. Сформировавшиеся растения переносили в индивидуальные культуральные сосуды, содержащие среду MS, дополненную 0.5 мг/л НУК и 0.5 мг/л кинетина. При

отсутствии формирования корней растения пересаживали на среду MS, дополненную 1 мг/л НУК.

Для оценки влияния фазы развития колоса и условий инкубации на процессы морфогенеза четырех генотипов (159*h*, 160*h*, 163*h*, 165*h*) определяли частоту каллусообразования и среднее число побегов на эксплант. Каждый эксперимент проведен в 10 повторах. Для одного повтора использовали по 4 экспланта каждой фазы развития колоса. Частоту каллусообразования подсчитывали после 4 недель культивирования, а среднее число побегов на эксплант — после 6 недель.

Обработка результатов

Для статистической обработки полученных результатов использовали однофакторный дисперсионный анализ в программе Statsmodels (www.statsmodels.org). Для изучения возможности использования разработанного протокола на 7 пшенично-ржаных гибридах и 1 гаплоидном растении озимой тритикале (*× Triticosecale* Wittm.) подсчитывали частоту каллусообразования и среднее число побегов на эксплант.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Важным этапом работы было получение достаточного количества донорного растительного материала. Для стимулирования кушения использовали внесение азофоски (NPK 16:16:16) из расчета 2 г/растение каждые две недели. Использование этого приема совместно с постоянным срезанием побегов позволяло получать молодые стебли у стерильных растений до 10 месяцев в условиях теплицы. Описанная выше система стерилизации побегов с последующей изоляцией колоса практически не приводила к контаминации.

Среди трех изученных нами фаз развития колоса (рис. 1*a*) наибольшим потенциалом к формированию каллуса на среде, дополненной 2 мг/л 2,4-Д, отличались молодые колосья, у которых только происходила закладка элементов цветка и находящихся на фазах 1 и 2. На этих фазах каллус формировался на всем экспланте с частотой 100% для всех изучаемых генотипов (рис. 1*b*). Молодые колосья, находящиеся на фазе 3, формировали каллус в зонах поранения, реже — в частях с менее дифференцированными колосками с частотой $8.5 \pm 2.08\%$. Экспланты на фазе 3 в процессе культивирования приобретали бурую окраску и теряли жизнеспособность. В среднем по генотипам частота каллусообразования при переходе от фаз роста 1 и 2 к фазе 3 значительно снижалась ($F_{\text{факт}} > F_{0.5}$, где $F_{\text{факт}}$ — фактическое значение F (критерий Фишера), $F_{0.5}$ — табличное значение F для 5%-ного уровня значимости) (рис. 2*a*).



Рис. 1. Процессы морфогенеза при использовании молодого колоса в качестве первоначального экспланта. *a* – Стадии развития колосьев, использованные в работе (фаза 1, фаза 2 и фаза 3). Каллус, формирующийся при инкубации эксплантов в темноте (*b*), на свету (*c*). *d* – Начало соматического эмбриогенеза; *e* – регенерация каллуса по пути ризогенеза; *f* – формирование побегов.

Fig. 1. Processes of morphogenesis when using an young spike as an initial explant. *a* – Spikes' development stages used here (phase 1, phase 2, phase 3). Callus formed during incubation of explants in the dark (*b*), in the light (*c*). *d* – The beginning of somatic embryogenesis; *e* – callus regeneration along the path of rhizogenesis; *f* – shoot formation.

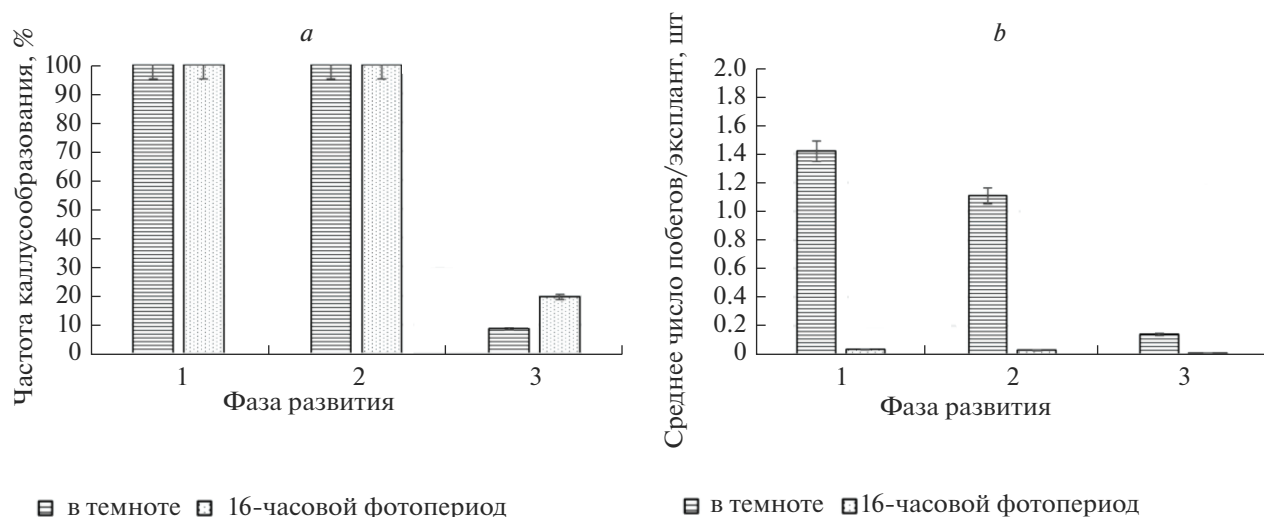


Рис. 2. Влияние стадии развития колоса и условий культивирования на частоту каллусообразования (а) и среднее число побегов на экспланте (б).
Fig. 2. Influence of spike development stage and culture conditions on callus formation frequency (a) and average number of shoots per explant (b).

Полученный каллус развивался по пути соматического эмбриогенеза. Наблюдалось влияние возраста экспланта на среднее число регенерировавших побегов на экспланте. При культивировании молодых колосьев фазы 1 и фазы 2 в среднем по генотипам из каллуса регенерировало 1.42 ± 0.59 и 1.11 ± 0.51 побегов на эксплант соответственно. Для колосьев на фазе развития 3 этот показатель значительно снижался ($F_{\text{факт}} > F_{0.5}$) и составлял 0.14 ± 0.12 побегов на эксплант в среднем по генотипам. При культивировании каллуса на среде для регенерации (MS, дополненная 0.5 мг/л НУК и 0.5 мг/л кинетина) помимо соматического эмбриогенеза наблюдался и исключительно ризогенез (рис. 1e). Среди регенерировавших растений альбиносы не обнаружены. Полученные растения не требовали яровизации для формирования колоса.

При различных способах культивирования (в темноте и при 16-часовом фотопериоде) не выявлено статистически значимого влияния света на процессы каллусообразования у колосьев на фазах 1 и 2 ($F_{\text{факт}} < F_{0.5}$). Оба типа эксплантов формировали каллус абсолютно идентично — с частотой 100% среди изучаемых генотипов. При культивировании колосьев на фазе 3 частота каллусообразования была значительно выше при 16-часовом фотопериоде в сравнении с культивированием в темноте ($F_{\text{факт}} > F_{0.5}$). Частота каллусообразования среди изучаемых генотипов для фазы 3 составляла 19.5 ± 10.28 и 8.5 ± 2.08 % для культивирования при 16-часовом фотопериоде и в темноте соответственно. При различных способах культивирования наблюдалась разница в цвете каллуса: в темноте формировался светлый каллус, при 16-часовом фотопериоде — зеленый (рис. 1b, 1c).

Выявлено достоверно положительное влияние темновой инкубации на конечный выход зеленых растений для колосьев в фазах 1 и 2 ($F_{\text{факт}} > F_{0.5}$) (рис. 2b). Так, при культивировании в темноте у колосьев в фазе 1 и 2 в среднем по генотипам формировалось 1.42 ± 0.59 и 1.11 ± 0.51 побегов на эксплант соответственно, а при 16-часовом фотопериоде 0.037 ± 0.04 и 0.03 ± 0.05 соответственно. Для колосьев, находящихся в фазе 3, конечный выход зеленых растений среди изучаемых генотипов был очень низким и составлял 0.14 ± 0.12 и 0.01 ± 0.01 для культивирования в темноте и при 16-часовом фотопериоде соответственно. В предварительных исследованиях нами показано, что для увеличения регенерационной способности инкубирование в темноте необходимо проводить в течение четырех недель. Если этот интервал сократить до двух недель, то формируется небольшое количество каллуса, который в основном развивается по пути ризогенеза.

Исследованные параметры легли в основу протокола клонального микроразмножения стерильных злаков, согласно которому индукцию каллуса у эксплантов молодого колоса, находящегося в фазах 1 и 2, проводят в темноте на среде MS, дополненной 2 мг/л 2,4-Д, после чего индуцируют соматический эмбриогенез при 16-часовом фотопериоде на среде MS, дополненной 0.5 мг/л НУК и 0.5 мг/л кинетина. Использование этого протокола на 7 генотипах пшенично-ржаных гибридов и 1 гаплоиде тритикале (\times *Triticosecale* Wittm.) показало, что у всех генотипов каллус формировался с частотой 100%, а среднее число побегов на эксплант варьировало от 0.5 до 1.8 — в зависимости от генотипа (табл. 2, рис. 1f).

Таблица 2. Влияние генотипа на частоту каллусообразования и регенерацию растений
Table 2. The effect of genotype on the frequency of callus formation and plant regeneration

Генотип	Число эксплантов	Частота каллусогенеза, %	Число регенерировавших растений	Среднее число побегов/эксплант
159h	12	100	21	1.8
160h	21	100	15	0.7
163h	18	100	15	0.8
165h	10	100	8	0.8
166h	6	100	4	0.7
167h	15	100	7	0.5
168h	17	100	13	0.8
557h	8	100	9	1.1
Все	107	100	92	0.9*

Примечание: *Указано среднее число побегов на эксплант по всем генотипам.

Note: *The average number of shoots per explant for all genotypes is indicated.

В качестве источника ауксина для индукции каллусообразования в культуре молодых колосьев использовали 2,4-Д в концентрации 2 мг/л. Этот регулятор роста широко используют как в работах по получению гаплоидов злаков [52, 53], так и для индукции каллуса у незрелых зародышей [54, 55]. В ряде исследований и в проведенных нами предварительных экспериментах показано, что использование 2,4-Д в концентрации меньше 2 мг/л не приводит к существенному каллусообразованию и соматическому эмбриогенезу, а при концентрациях выше 2 мг/л формируется рыхлый неморфогенный каллус [50, 55, 56]. Для индукции соматического эмбриогенеза из каллуса была выбрана среда MS, дополненная 0.5 мг/л НУК и 0.5 мг/л кинетина, так как именно такую комбинацию регуляторов роста мы широко используем при спасении зародышей отдаленных гибридов, стимулировании соматического эмбриогенеза из каллуса незрелых зародышей, а также при получении гаплоидных растений [51].

Замечено, что в культуре тканей растений возраст экспланта играет важную роль в процессах каллусогенеза и регенерации побегов [57–59]. В ходе работы нами показано, что наибольшей отзывчивостью отличались колосья на фазах развития 1 и 2. Это вполне согласуется с данными других исследователей, которые предпочитают работать с молодыми колосьями на тех же стадиях развития [43, 46, 48]. Некоторые авторы не уточняют стадию развития колоса, а рекомендуют использование конкретных размеров: их длина варьирует от 1 до 5 мм [41, 44, 47]. Использование системы фаз развития как маркера для отбора донорного материала, по нашему мнению, более правильно, так как размер колоса зависит от условий выращивания, что подтверждено, например, в работе Х. Нуо и др. [50]. Преимущество использования эксплантов, содержащих более молодые тка-

ни, описано и для других культур [57–59]. Связано это с тем, что в молодых тканях, которые еще проходят развитие, дифференцировка клеток низкая, а уровень эндогенных фитогормонов и метаболически активных веществ высокий, что способствует формированию каллуса и регенерации побегов [60].

Положительное влияние темновой инкубации на процессы регенерации растений, продемонстрированное в ходе этой работы, описано и для ряда других культур [61–63]. Использование темновой инкубации первоначальных эксплантов широко представлено в клеточной биотехнологии злаков [45, 47, 48, 53, 56]. Не до конца ясно, как темновая инкубация влияет на процессы регенерации. По одной из гипотез, при световой инкубации деградируют эндогенные фитогормоны [61] и усиливается перекисное окисление липидов, что приводит к снижению скорости физиологических процессов [63]. Согласно другой, этилирование, вызванное нахождением эксплантов в темноте, вызывает истончение клеточных стенок, что облегчает проникновение регуляторов роста в клетки [64]. Кроме того, в темноте снижается активность полифенолоксидазы, что приводит к уменьшению скорости окисления фенолов в хиноны [62].

Используя эту технологию на 8 различных генотипах, мы показали, что все они способны к регенерации растений, хотя и в разной степени. Таким образом, по-видимому, можно говорить о генотипспецифичности разработанного протокола. Влияние генотипа на процессы каллусогенеза и непрямого эмбриогенеза наблюдали и другие исследователи при использовании молодого колоса в качестве исходного экспланта [41–43, 45, 48]. Степень отзывчивости в культуре молодых колосьев отдаленных гибридов связывают с генетическими факторами, такими как цитоплазма гибрида

[42], эффект гетерозиса [43], присутствие субгенома дикого вида (обладают высокой регенерационной способностью) [41, 45], а также с большим накоплением фенольных соединений у неотзывчивых генотипов [45]. О проблеме ризогенеза, с которой мы столкнулись в процессе работы, сообщали и другие исследователи при клональном размножении гибрида *Ae. crassa* × *H. vulgare* [41] и *Agropyron repens* × *Bromus inermis* [44]. Есть сообщения о формировании альбиносных растений в культуре молодых колосьев [45], однако в нашем исследовании таких растений не обнаружено. Несмотря на то, что часть донорных растений относилась к озимой форме, регенеранты, полученные с молодых колосьев, не требовали яровизации, что ранее описано С. Чу и др. [43].

На основе полученных результатов разработанный нами протокол клонального микроразмножения стерильных растений, апробированный на 8 генотипах, можно рассматривать как эффективный инструмент для сохранения ценных генотипов, представляющих интерес в селекции злаков.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 21-16-00121) для исследований, связанных с твердой и мягкой пшеницей, и Государственного задания (FGUM-2022-0001) для исследований, связанных с тритикале.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Куперман Ф.М. Биологические основы культуры пшеницы. Второе издание, Москва: Издательство МГУ, 1953, 298 с.
2. Zadoks J.C., Chang T.T., Konzak C.F. A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed Res.*, 1974, 14, 415–421.
3. Humphreys D.G., Knox R.E. Doubled haploid breeding in cereals. In: *Advances in Plant Breeding Strategies: Breeding, Biotechnology and Molecular Tools*. Eds J. Al-Khayri, S. Jain, D. Johnson. Cham: Springer, 2015, 241–290.
4. Begheyn R.F., Lübberstedt T., Studer B. Haploid and doubled haploid techniques in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) to advance research and breeding. *Agronomy*, 2016, 6(4), 60. <https://doi.org/10.3390/agronomy6040060>
5. Tadesse W., Sanchez-Garcia S., Tawkaz S. Doubled haploid production in wheat. In: *Advances in Breeding Techniques for Cereal Crops*. Eds F. Ordon, W. Friedt. Cambridge: Burleigh Dodds Science Publishing, 2019, 93–116.
6. Kanbar O.Z., Lantos C., Chege P.K., Kiss E., Pauk J. Generation of doubled haploid lines from winter wheat (*Triticum aestivum* L.) breeding material using *in vitro* anther culture. *Czech J. Genet. Plant Breed.*, 2020, 56(4), 150–158. <https://doi.org/10.17221/113/2019-CJGPB>
7. Ferrie A.M.R., Polowick L.P. Acceleration of the breeding program for winter wheat. In: *Accelerated Plant Breeding*, vol. 1. Eds S. Gosal & S. Wani. Cham: Springer, 2020, 191–215.
8. Li Z., Li B., Tong Y. The contribution of distant hybridization with decaploid *Agropyron elongatum* to wheat improvement in China. *J. Genet. Genom.*, 2008, 35(8), 451–456. [https://doi.org/10.1016/S1673-8527\(08\)60062-4](https://doi.org/10.1016/S1673-8527(08)60062-4)
9. Liu D., Zhang H., Zhang L., Yuan Z., Hao M., Zhen Y. Distant hybridization: a tool for interspecific manipulation of chromosomes. In: *Alien Gene Transfer in Crop Plants*, vol. 1. Eds A. Pratap & J. Kumar. NY: Springer, 2014, 25–42.
10. Plamenov D., Spetsov P. Synthetic hexaploid lines are valuable resources for biotic stress resistance in wheat improvement. *J. Plant Pathol.*, 2011, 93(2), 251–262.
11. Kumar K., Neelam K., Singh G., Mathan J., Ranjan A., Brar D.S., Singh K. Production and cytological characterization of a synthetic amphiploid derived from a cross between *Oryza sativa* and *Oryza punctata*. *Genome*, 2019, 62(11), 705–714. <https://doi.org/10.1139/gen-2019-0062>
12. Stoyanov H.P. New amphidiploid wheat species (nothosp. nov.) as a result of artificial hybridization. *Scientific Papers. Series A. Agronomy*, 2014, 57, 331–338.
13. Sadasivaiah R.S., Perkovic S.M., Pearson D.C., Postman B., Beres B.L. Registration of “AC Andrew” wheat. *Crop Sci.*, 2004, 44(2), 696–697.
14. Elhaddoury J., Lhaloui S., Udupa S.M., Moatassim B., Taiq R., Rabeih M., Kamlaoui M., Hammadi M. Registration of “Kharoba”: a bread wheat cultivar developed through doubled haploid breeding. *J. Plant Regist.*, 2012, 6(2), 169–173. <https://doi.org/10.3198/jpr2011.07.0385crc>
15. Săulescu N.N., Ittu G., Giura A., Mustățea P., Ittu M. Results of using Zea method for doubled haploid production in wheat breeding at Nardi Fundulea–Romania. *Rom. Agric. Res.*, 2012, 29(29), 3–8.
16. Haley S.D., Johnson J.J., Peairs F.B., Stromberger J.A., Hudson-Arns E.E., Seifert S.A., Anderson V.A., Bai G., Chen X., Bowden R.L., Jin Y., Kolmer J.A., Chen M., Seabourn B.W. Registration of “Avery” hard red winter wheat. *J. Plant Regist.*, 2018, 12(3), 362–366. <https://doi.org/10.3198/jpr2017.11.0080crc>
17. Barro F., Fernandez-Escobar J., De La Vega M., Martin A. Doubled haploid lines of *Brassica carinata* with modified erucic acid content through mutagenesis by EMS treatment of isolated microspores. *Plant Breed.*, 2001, 120(3), 262–264. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0523.2001.00602.x>
18. Åhman I., Bengtsson T. Introgression of resistance to *Rhopalosiphum padi* L. from wild barley into cultivated barley facilitated by doubled haploid and molecular marker techniques. *Theor. Appl. Genet.*, 2019, 132(5), 1397–1408. <https://doi.org/10.1007/s00122-019-03287-3>

19. Grewal S., Guwela V., Newell C., Yang C., Ashling S., Scholefield D., Hubbart-Edwards S., Burridge A., Stride A., King I.P., King J. Generation of doubled haploid wheat-*Triticum urartu* introgression lines and their characterisation using chromosome-specific KASP markers. *Front. Plant Sci.*, 2021, 12, 643636. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.643636>
20. Asif M.A., Schilling R.K., Tilbrook J., Brien C., Dowling K., Rabie H., Short L., Trittermann C., Garcia A., Barrett-Lennard E.G., Berger B., Mather D.E., Gilliam M., Flury D., Tester M., Roy S.J., Pearson A.S. Mapping of novel salt tolerance QTL in an *Excalibur* × *Kukri* doubled haploid wheat population. *Theor. Appl. Genet.*, 2018, 131(10), 2179–2196. <https://doi.org/10.1007/s00122-018-3146-y>
21. Shamasbi V.F., Jamali S.H., Sadeghzadeh B., Mandoulakani B.A. Genetic mapping of quantitative trait loci for yield-affecting traits in a barley doubled haploid population derived from *Clipper* × *Sahara 3771*. *Front. Plant Sci.*, 2017, 8, 688. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00688>
22. Afanasenko O.S., Kozjakov A.V., Hedlay P.E., Lashina N.M., Anisimova A.V., Manninen O., Jalli M., Potokina E.K. Mapping of the loci controlling the resistance to *Pyrenophora teres* f. *teres* and *Cochliobolus sativus* in two double haploid barley populations. *Russ. J. Genet. Appl. Res.*, 2015, 5(3), 242–253. <https://doi.org/10.1134/S2079059715030028>
23. Hoffie R.E., Otto I., Perovic D., Budhagatapalli N., Habekuß A., Ordon F., Kumlehn J. Targeted knockout of eukaryotic translation initiation factor 4E confers bymovirus resistance in winter barley. *Front. Plant Sci.*, 2021, 3, 784233. <https://doi.org/10.3389/fgeed.2021.784233>
24. Bhowmik P., Ellison E., Polley B., Bollina V., Kulkarni M., Ghanbarnia K., Song H., Gao C., Voytas D.F., Kagale S. Targeted mutagenesis in wheat microspores using CRISPR/Cas9. *Sci. Rep.*, 2018, 8(1), 6502. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24690-8>
25. Bilichak A., Luu J., Jiang F., Laurie J. Delivery of Cas9/sgRNA RNP into wheat microspores using synthetic CPP for genome editing and gene expression modulation. In: *CRISPR-Cas Methods*. Eds M.T. Islam, P.K. Bhowmik, K.A. Molla. NY: Springer, 2020, 191–202.
26. Nemtsev B.F., Nemtsev A.B., Goncharov N.P., Kurkova S.V. Spring common wheat breeding lines produced on the basis of distant hybridization: ecological strain testing in Bagan. *Curr. Challenges Plant Genet. Genom. Bioinform. Biotechnol.*, 2019, 30–33. <https://doi.org/10.18699/ICG-PlantGen2019-07>
27. Wang Y., Long D., Wang Y., Wang C., Liu X., Zhang H., Tian Z., Chen C., Ji W. Characterization and evaluation of resistance to powdery mildew of wheat-*Aegilops geniculata* Roth 7Mg (7A) alien disomic substitution line W16998. *Int. J. Mol. Sci.*, 2020, 21(5), 1861. <https://doi.org/10.3390/ijms21051861>
28. Cui L., Ren Y., Murray T.D., Yan W., Guo Q., Niu Y., Sun Y., Li H. Development of perennial wheat through hybridization between wheat and wheatgrasses: a review. *Engineering*, 2018, 4(4), 507–513. <https://doi.org/10.1016/j.eng.2018.07.003>
29. Mergoum M., Sapkota S., Eldoliéfy A.E.A., Naraghi S.M., Pirseyedi S., Alamri M.S., AbuHammad W. Triticale (× *Triticosecale* Wittmack) breeding. In: *Advances in Plant Breeding Strategies: Cereals*. Eds J. Al-Khayri, S. Jain, D. Johnson. Cham: Springer, 2019, 405–451.
30. Ávila C.M., Rodríguez-Suárez C., Atienza S.G. Tritordeum: creating a new crop species – the successful use of plant genetic resources. *Plants*, 2021, 10(5), 1029. <https://doi.org/10.3390/plants10051029>
31. Kwiatek M.T., Nawracała J. Chromosome manipulations for progress of triticale (× *Triticosecale*) breeding. *Plant Breed.*, 2018, 137(6), 823–831. <https://doi.org/10.1111/pbr.12652>
32. Molnár-Láng M., Linc G. Wheat-barley hybrids and introgression lines. In: *Alien Introgression in Wheat*. Eds M. Molnár-Láng, C. Ceoloni, J. Doležel. Cham: Springer, 2015, 315–345.
33. Lopes M.S., Reynolds M.P. Drought adaptive traits and wide adaptation in elite lines derived from resynthesized hexaploid wheat. *Crop Sci.*, 2011, 51(4), 1617–1626. <https://doi.org/10.2135/cropsci2010.07.0445>
34. Apolinarska B., Wiśniewska H., Wojciechowska B. Aegilops-rye amphiploids and substitution rye used for introgression of genetic material into rye (*Secale cereale* L.). *J. Appl. Genet.*, 2010, 51(4), 413–420. <https://doi.org/10.1007/BF03208871>
35. Rey M.D., Ramírez C., Martín A.C. Wheat, rye, and barley genomes can associate during meiosis in newly synthesized trigeneric hybrids. *Plants*, 2021, 10(1), 113. <https://doi.org/10.3390/plants10010113>
36. Ślusarkiewicz-Jarzina A., Pudelska H., Woźna J., Pniewski T. Improved production of doubled haploids of winter and spring triticale hybrids via combination of colchicine treatments on anthers and regenerated plants. *J. Appl. Genet.*, 2017, 58(3), 287–295. <https://doi.org/10.1007/s13353-016-0387-9>
37. Ahmadi B., Ebrahimzadeh H. *In vitro* androgenesis: spontaneous vs. artificial genome doubling and characterization of regenerants. *Plant Cell Rep.*, 2020, 39(3), 299–316. <https://doi.org/10.1007/s00299-020-02509-z>
38. Broughton S., Castello M., Liu L., Killen J., Hepworth A., O’Leary R. The effect of caffeine and trifluralin on chromosome doubling in wheat anther culture. *Plants*, 2020, 9(1), 105. <https://doi.org/10.3390/plants9010105>
39. Nanda Kumar P.B.A., Shivanna K.R. *In vitro* multiplication of a sterile interspecific hybrid, *Brassica fruticulosa* × *B. campestris*. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, 1991, 26(1), 17–22. <https://doi.org/10.1007/BF00116604>
40. Kim J.Y., Adhikari P.B., Ahn C.H., Dong H.K., Young C.K., Jung Y.H., Subramanyam K., Yong E.C. High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration of interspecific ginseng hybrid between *Panax ginseng* and *Panax quinquefolius*. *J. Ginseng Res.*, 2019, 43(1), 38–48. <https://doi.org/10.1016/j.jgr.2017.08.002>
41. Nakamura C., Keller W.A., Fedak G. *In vitro* propagation and chromosome doubling of a *Triticum crassum* × *Hordeum vulgare* intergeneric hybrid. *Theor. Appl. Genet.*, 1981, 60(2), 89–96. <https://doi.org/10.1007/BF00282423>

42. Chu C.C., Sun C.S., Chen X., Zhang W.X., Du Z.H. Somatic embryogenesis and plant regeneration in callus from inflorescences of *Hordeum vulgare* × *Triticum aestivum* hybrids. *Theor. Appl. Genet.*, 1984, 68(4), 375–379.
<https://doi.org/10.1007/BF00267892>
43. Sharma H.C., Gill B.S., Sears R.G. Inflorescence culture of wheat-Agropyron hybrids: callus induction, plant regeneration, and potential in overcoming sterility barriers. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, 1984, 3(3), 247–255.
<https://doi.org/10.1007/BF00040344>
44. Gyulai G., Janovszky J., Kiss E., Lelik L., Csillag A., Heszky L.E. Callus initiation and plant regeneration from inflorescence primordia of the intergeneric hybrid *Agropyron repens* (L.) Beauv. × *Bromus inermis* Leyss. cv. nanus on a modified nutritive medium. *Plant Cell Rep.*, 1992, 11(5), 266–269.
<https://doi.org/10.1007/BF00235079>
45. Jørgensen R.B., Jensen C.J., Andersen B., Bothmer R.V. High capacity of plant regeneration from callus of interspecific hybrids with cultivated barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, 1986, 6(3), 199–207.
<https://doi.org/10.1007/BF00040005>
46. Акинина В.Н., Дьячук Т.И., Жилин С.В., Калашникова Э.В. Методы культуры ткани *in vitro* для создания исходного материала для селекции тритикале в Поволжье. *Зерновое хозяйство России*, 2020, 1(67), 64–68.
<https://doi.org/10.31367/2079-8725-2020-67-1-64-68>
47. Benkirane H., Sabounji K., Chlyah A., Chlyah H. Somatic embryogenesis and plant regeneration from fragments of immature inflorescences and coleoptiles of durum wheat. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, 2000, 61(2), 107–113.
<https://doi.org/10.1023/A:1006464208686>
48. Bennaceur M. Callus formation and plant regeneration from young wheat spikes: effect of genotypes. In: *Durum Wheat Improvement in the Mediterranean Region: New Challenges*. Eds C. Royo, M. Nachit, N. Di Fonzo, J.L. Araus. Zaragoza: Cineam, 2000, 121–124.
49. Janakirama V., Steinau M., McCoy S.B., Trick H.N. Recent advances in wheat transformation. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.*, 2002, 38(5), 404–414.
<https://doi.org/10.1079/IVP2002320>
50. Huo X., Wei J., Xu C., Mi F., Yun J. Plant regeneration from immature inflorescence culture and genetic transformation of wheatgrass (*Agropyron cristatum* × *A. desertorum* cv. Hycrest-Mengnong). *Agr. Sci. China*, 2006, 5(9), 648–654.
[https://doi.org/10.1016/S1671-2927\(06\)60106-5](https://doi.org/10.1016/S1671-2927(06)60106-5)
51. Blinkov A.O. The use of cell biotechnologies in creation of initial material for breeding and genome editing of cereals. In: *Proceedings of the Second International Scientific and Practical Conference “Genomics and Modern Biotechnologies in Plant Propagation, Breeding and Preservation”*, Yalta, 13–15 October 2021, 114, Simferopol: PP “Arial”.
<https://doi.org/10.36305/2021-2-113-114>
52. Barnabás B. Protocol for producing doubled haploid plants from anther culture of wheat (*Triticum aestivum* L.) In: *Doubled Haploid Production In Crop Plants*. Eds M. Maluszynski, K.J. Kasha, B.P. Forster, I. Szarejko. Dordrecht: Springer, 2003, 65–70.
53. Oleszczuk S., Grzechnik N., Mason A.S., Zimny J. Heritability of meiotic restitution and fertility restoration in haploid triticale. *Plant Cell Rep.*, 2019, 38(12), 1515–1525.
<https://doi.org/10.1007/s00299-019-02462-6>
54. Alikina O., Chernobrovkina M., Dolgov S., Miroshnichenko D. Tissue culture efficiency of wheat species with different genomic formulas. *Crop Breed. Appl. Biotechnol.*, 2016, 16, 307–314.
<https://doi.org/10.1590/1984-70332016v16n4a46>
55. Pellegrineschi A., Brito R.M., McLean S., Hoisington D. Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and NaCl on the establishment of callus and plant regeneration in durum and bread wheat. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, 2004, 77(3), 245–250.
<https://doi.org/10.1023/B:TICU.0000018389.99656.d8>
56. Miroshnichenko D.N., Filippov M.V., Dolgov S.V. Medium optimization for efficient somatic embryogenesis and *in vitro* plant regeneration of spring common wheat varieties. *Russ. Agricult. Sci.*, 2013, 39, 24–28.
<https://doi.org/10.3103/S1068367413010175>
57. Dhar U., Joshi M. Efficient plant regeneration protocol through callus for *Saussurea obvallata* (DC.) Edgew. (Asteraceae): effect of explant type, age and plant growth regulators. *Plant Cell Rep.*, 2005, 24(4), 195–200.
<https://doi.org/10.1007/s00299-005-0932-1>
58. Sharma S., Kumar N., Reddy M.P. Regeneration in *Jatropha curcas*: factors affecting the efficiency of *in vitro* regeneration. *Ind. Crops Prod.*, 2011, 34(1), 943–951.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.02.017>
59. Cardoso J.C., Habermann G. Adventitious shoot induction from leaf segments in *Anthurium andreanum* is affected by age of explant, leaf orientation and plant growth regulator. *Hortic. Environ. Biotechnol.*, 2014, 55(1), 56–62.
<https://doi.org/10.1007/s13580-014-0022-9>
60. Famiani F., Ferradini N., Staffolani P., Standardi A. Effect of leaf excision time and age, BA concentration and dark treatments on *in vitro* shoot regeneration of M.26 apple rootstock. *J. Hortic. Sci.*, 1994, 69(4), 679–685.
<https://doi.org/10.1080/14620316.1994.11516500>
61. Dai W., Castillo C. Factors affecting plant regeneration from leaf tissues of *Buddleia* species. *HortScience*, 2007, 42(7), 1670–1673.
<https://doi.org/10.21273/HORTSCI.42.7.1670>
62. Zhao Y., Stiles A.R., Saxena P.K., Liu C.Z. Dark preincubation improves shoot organogenesis from *Rhodiola crenulata* leaf explants. *Biol. Plant.*, 2013, 57(1), 189–192.
<https://doi.org/10.1007/s10535-012-0261-5>
63. Carvalho M.A.F., Paiva R., Stein V.C., Herrera R.C., Porto J.M.P., Vargas D.P., Alves E. Induction and morpho-ultrastructural analysis of organogenic calli of a wild passionfruit. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, 2014, 57(6), 851–859.
<https://doi.org/10.1590/S1516-8913201402555>
64. Herman D.E., Hess C.E. The effect of etiolation upon the rooting of cuttings. *Proc. Int. Plant Prop. Soc.*, 1963, 13, 42–62.

***In vitro* Propagation of Wheat-Rye Hybrids
and Haploid Plants of the \times *Triticosecale* Wittmack Genus**

**A. O. Blinkov^{a, #}, M. Alkubesi^{a, b}, D. S. Ulyanov^a, V. S. Rubets^b,
N. V. Zlobnova^a, G. I. Karlov^a, P. N. Kharchenko^a, and M. G. Divashuk^a**

^a*All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology, Moscow, 127550 Russia*

^b*Russian State Agrarian University—Moscow Timiryazev Agricultural Academy, Moscow, 127434 Russia*

[#]*e-mail: aoblinkov@gmail.com*

Abstract—Distant hybridization, and production of doubled haploids and amphidiploids are widespread methods for the creation of starting material in cereal breeding. However, these approaches are associated with problems of plant sterility and difficulties in obtaining seeds from self-pollination or backcrossing, which leads to the loss of unique genetic materials in breeding processes. Clonal micropropagation can be a specific tool for the propagation and conservation of such plants. Due to the fact that cell technologies are highly dependent on such factors as genotype, medium composition, and cultivation conditions, an important task is to create more universal approaches to plant regeneration. In this work, the influence of the development phase of the initial explant and cultivation conditions on the successful production of regenerated plants in the *in vitro* culture of young spikes has been shown. The highest morphogenetic potential of young spikes at the 5th–6th stages of organogenesis according to Kuperman [1] or the 31st–36th phases according to Zadoks *et al.* [2] was demonstrated experimentally. The optimal conditions for callus induction were the incubation of young spikes in the dark at 25°C on Murashige–Skoog medium supplemented with 2 mg/L 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) for 4 weeks, followed by stimulation of somatic embryogenesis on MS medium with the addition of 1-Naphthaleneacetic acid (0.5 mg/L) and kinetin (0.5 mg/L). The reproduction and conservation of sterile plants was confirmed in 8 wheat-rye hybrids and triticale haploids.

Keywords: amphihaploids, haploids, cereals, clonal micropropagation, distant hybridization