

5 Lin X., Liu B., Weller L., Abe J., Kong F. Molecular mechanisms for the photoperiodic regulation of flowering in soybean. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2020, vol. 63, no. 6, pp. 981–994. DOI: 10.1111/jipb.13021.

6 Yang W.Y., Wu T.T., Zhang X.Y., Song W.W., Xu C.L., Sun S., Hou W.S., Jiang B.J., Han T.F., Wu C.X. Critical photoperiod measurement of soybean varieties in different maturity groups. *Crop Science*, 2019, vol. 59, DOI:10.2135/cropsci2019.03.0170/

7 Jiang B., Nan H., Gao Y., Tang L., Yue Y., Lu S., Ma L., Cao D., Sun S., Wang J., Wu C., Yuan X., Hou W., Kong F., Han T., Liu B. Allelic combinations of soybean maturity loci E1, E2, E3 and E4 result in diversity of maturity and adaptation to different latitudes. *PLoS ONE*, 2014. vol. 9(8). DOI: 10.1371/journal.pone.0106042.

8. Cober E.R., Voldeng H.D. A new soybean maturity and photoperiod-sensitivity locus linked to E1 and T. *Crop Sci.*, 2001. vol. 41, No. 3. pp. 698–701. DOI: 10.2135/cropsci2001.413698x

9 Bernard R.L. and Weiss M.G. Qualitative genetics. In B.E. Galdwell (ed) Soybeans, improvement, and uses Agronomy, *Am. Soc. Agron., Madison*, 1973, vol. 16, pp. 117-154

10 Walker, A. K., Cianzio, S. R., Bravo, J. A., & Fehr, W. R. (1979). Comparison of Emasculation and Nonemasculation for Hybridization of Soybeans 1. *Crop Science*, vol. 19(2), pp. 285-286.

11 Патент №31427 на изобретение «Способ гибридизации сои», авторы: Дидоренко С.В., Карягин Ю.Г., Булатова К.М.// ТОО «Казахский НИИ земледелия и растениеводства», заявка № 2011/0010.1 подано 06.01.2011, опубликовано 21.07.2016

12 Fehr, W. R. Cavines CE Stages of Soybean Development. *Cooperative Extension Service. Ames, Iowa: Iowa State Univ.* 1979.

13 Вишнякова, М. А., Сеферова, И. В., Буравцева, Т. В., Бурляева, М. О., Семенова, Е. В., Филипенко, Г. И., ... & Другова, Е. В. Коллекция мировых генетических ресурсов зерновых бобовых ВИР: пополнение, сохранение и изучение: методические указания. Санкт-Петербург: Мин. науки и высшего образования РФ, 2018. 143 с. DOI: [10.30901/978-5-905954-79-5](https://doi.org/10.30901/978-5-905954-79-5)

14 Murray M.G., Thompson W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA // *Nucleic Acids Res.* 1980. vol. 8. pp. 4321–4325. DOI: 10.1093/nar/8.19.4321.

15 Molnar S.J., Rai, S., Charette M., Cober E.R. Simple sequence repeat (SSR) markers linked to E1, E3, E4, and E7 maturity genes in soybean. *Genome*. 2003. vol. 46 (6). pp. 1024–1036. DOI: 10.1139/g03-079.

16 Liu B., Kanazawa A., Matsumura H., Takahashi R., Harada K., & Abe, J. Genetic redundancy in soybean photoresponses associated with duplication of the phytochrome A gene. *Genetics*, 2008. vol. 180(2), pp.995-1007. DOI: 10.1534/genetics.108.092742

УДК 575.22.085:631.527

**Внутрикallусная генетическая изменчивость андрогенных удвоенных гаплоидов риса  
*Oryza sativa* L.**

**Марина Владиславовна Илюшко**

ФГБНУ «Федеральный научный центр агробиотехнологий Дальнего Востока им. А.К.  
Чайки», г. Уссурийск

Изучалась частота возникновения внутрикallусной изменчивости в андрогенезе *in vitro* риса с целью определения степени генетической однородности удвоенных гаплоидов одного пыльника. Исследования проведены среди удвоенных гаплоидов, полученных в андрогенезе *in vitro* гибридов риса *Oryza sativa* L. Проведен молекулярно-генетический анализ 855 растений (56 кallусных линий) на наличие аллелей устойчивости/восприимчивости следующих генов устойчивости риса к *Pyricularia oryzae* Cav. [*Magnaporthe grisea* (Hebert Barr.)]: *Pi-z*, *Pi-b*, *Pi-1*, *Pi-2*, *Pi-ta*<sup>2</sup>. Среди удвоенных гаплоидов проводили детекцию одного-трех генов в зависимости от наличия их в исходных гибридах. Выявлены кallусные линии с

регенерантами идентичными по одному из генов, а также обладающие двумя аллелями изученных генов. У четверти (26%) каллусных линий наблюдается изменчивость среди удвоенных гаплоидов. Таким образом, выявлена внутрикаллусная генетическая изменчивость удвоенных гаплоидов риса в андрогенезе *in vitro*, обусловленная гаметоклональной вариабельностью. На одной каллусной линии представлена одна или две комбинации аллелей генов устойчивости к пирикуляриозу риса. Существует истинное клонирование удвоенных гаплоидов риса в пределах каллусной линии в андрогенезе *in vitro*.

**Ключевые слова:** *Oryza sativa*, андрогенез *in vitro*, удвоенные гаплоиды, внутрикаллусная генетическая изменчивость.

### **Intra-callus gene variability of rice *Oryza sativa* L. androgenic doubled haploids**

*Marina Vladislavovna Ilyushko*

FSBSI «Chaika A.K. Federal Research Center of Agricultural Biotechnology of the Far East»,  
Ussuriysk

We studied the intracallus variability in rice androgenesis *in vitro* in order to determine the genetic uniformity degree of doubled haploids from one anther. The studies were performed among doubled haploids generated through androgenesis *in vitro* of rice *Oryza sativa* L. hybrids. Molecular genetic analysis of 855 plants (56 callus lines) for the presence of resistance or susceptibility alleles to the following rice resistance genes to *Pyricularia oryzae* Cav. [*Magnaporthe grisea* (Hebert Barr.)]: *Pi-z*, *Pi-b*, *Pi-1*, *Pi-2*, *Pi-ta*<sup>2</sup>. Among the doubled haploids, one or three genes were detected depending on their presence in the initial hybrids. Callus lines with identical regenerants in one of the genes, as well as possessing two alleles of the studied genes, were revealed. A quarter (26%) of the callus lines show variation among doubled haploids. Thus, intracallus genetic variation of rice doubled haploids in androgenesis *in vitro* due to gametoclonal variability was revealed. On one callus line, one or two combinations of resistance alleles to *P. oryzae* genes are presented. There is proper cloning of doubled haploids within the callus lines in androgenesis *in vitro*.

**Keywords:** *Oryza sativa*, androgenesis *in vitro*, doubled haploids, intra-callus gene variability.

**Введение.** Культивирование *in vitro* клеток и тканей сельскохозяйственных культур по назначению условно можно разделить на две группы: для получения генетически измененного исходного селекционного материала и для массового клонирования уже существующих форм и сортов. Культура пыльников (андрогенез *in vitro*) позволяет переключить программу развития микроспоры с гаметофитного пути на спорофитный, в результате спонтанного удвоения формируются удвоенные гаплоиды у диплоидных видов, либо фиксируются дигаплоиды (полигаплоиды) у тетраплоидных видов, которые широко применяются в селекции растений [Germana, 2011]. Вариабельность среди растений, регенерированных из гамет, принято называть «гаметоклональной изменчивостью» [Germana, 2011; Evans et al., 1984]. Формально говоря, эти регенеранты не являются клонами одного генотипа растения-донора, из-за отсутствия полной генетической идентичности с ним, вследствие рекомбинации при формировании микроспор. По сути, каждая микроспора – это новый генотип, пусть и с прежней комбинацией генов. Кроме этого, изменчивость может быть индуцирована самим процессом культивирования *in vitro* [Evans et al., 1984].

Вариабельность растений, полученных в культуре пыльников или микроспор с одного растения-донора, в большей степени изучена на геномном и хромосомном уровне, поскольку исследователей в первую очередь интересует спонтанное удвоение хромосом и, как следствие, полностью гомозиготные фертильное потомство.

В культуре пыльников *in vitro* рис *Oryza sativa* L. проходит дополнительную стадию формирования каллуса, из которого образуются растения-регенеранты [Tripathy et al., 2019]. Теоретически каллусная линия может быть сформирована одним или несколькими микроспорами. У риса в пыльнике созревает более 1000 пыльцевых зерен. Изучение частоты возникновения внутрикаллусной изменчивости может пролить свет на число микроспор-

основоположников каллуса. **Цель работы:** определить степень генетической однородности удвоенных гаплоидов одного пыльника.

**Материалы и методы.** Исследования проведены среди удвоенных гаплоидов, полученных в андрогенезе *in vitro* гибридов F<sub>1</sub> риса *Oryza sativa* L. подвида *japonica* Kato, следующих комбинаций: Луговой×Марателли 5А – Л×5А; Рассвет×(Окси 2х×Дарий 23) – Р×О×23; Алмаз×[(Марателли 5А×Боярин)× Марателли 5А] – 4Р; 242-01×Рассвет – 242×Р; Долинный×Магнат – Д×М; Дубрава×Виола – Дб×В; Ханкайский 52×242-01 – Х×242; Долинный×Дон 4237 – Д×Д4237 и гибрида F<sub>2</sub> Рассвет×Окси 2х – Р×О. Исходные растения гибридов выращивали на вегетационной площадке в сосудах до периода сбора метелок. Методика холодной обработки пыльников, культивирование пыльников, каллусов и регенерантов в условиях *in vitro* приведена ранее [Пушкo, 2015].

Под термином «калусная линия» понимали все калусные агрегаты, сформированные на одном пыльнике. Калусные агрегаты (калусы) размером 2-5 мм пересаживали с индукционной питательной среды на регенерационную с интервалом в семь дней с присвоением порядкового номера.

Регенеранты R<sub>0</sub> с развитой корневой системой высаживали в горшечную культуру и продолжали выращивать в условиях культуральной комнаты до образования семян. После этого использовали зеленые листья для выделения ДНК. Методика выделения ДНК и режимы амплификации ДНК приводились ранее [Илюшко и др., 2017]. В качестве контроля использовали растения сортов-дифференциаторов и сортов с известными генами. Амплификацию проводили в трехкратной повторности.

**Результаты.** На пыльниках десяти гибридных растений образовалось 56 калусных линий с тремя и более удвоенным гаплоидами. Восемь калусных линий образовали два-четыре калусных агрегата с зелеными регенерантами. Анализ данных калусной линии 415.2 гибрида Л×5А показал, что аллели устойчивости двух генов *Pi-z* и *Pi-ta*<sup>2</sup> есть у всех удвоенных гаплоидов калусного агрегата 415.2.1, а на калусном агрегате 415.2.2 присутствует только аллель устойчивости гена *Pi-z*. Это означает, что калусные агрегаты инициированы разными незрелыми микроспорами риса, т.е. представлено явление гаметоклональной вариабельности. Это дало основание в дальнейшем рассматривать каждый калусный агрегат в качестве отдельной калусной линии.

В работе проведен молекулярно-генетический анализ 855 растений. Среди них встречаются как калусные агрегаты с регенерантами идентичными по одному из генов, так и обладающие двумя аллелями изученных генов. У четверти (26%) калусных агрегатов наблюдается изменчивость среди удвоенных гаплоидов (таблица).

Таблица. Доля калусных линий риса *Oryza sativa* L. с внутрикалусной генетической вариабельностью среди удвоенных гаплоидов, полученных в андрогенезе *in vitro*

Гибрид	Изученный ген	Число калусных линий, шт.		
		только с аллелем устойчивости	только без аллеля устойчивости	вариабельных
Луговой× Марателли 5А	<i>Pi-ta</i> <sup>2</sup>	2	3	2
	<i>Pi-z</i>	2	0	0
Рассвет×(Окси 2х×Дарий 23)	<i>Pi-ta</i> <sup>2</sup>	0	1	2
Алмаз×[(Марателли 5А ×Боярин)×Марателли 5А]	<i>Pi-2</i>	7	4	2
242-01×Рассвет	<i>Pi-1</i>	0	2	2
	<i>Pi-2</i>	2	0	2
	<i>Pi-z</i>	0	1	0
Долинный×Магнат	<i>Pi-ta</i> <sup>2</sup>	1	0	1

	<i>Pi-1</i>	2	0	0
	<i>Pi-2</i>	0	2	0
Алмаз×Магнат	<i>Pi-1</i>	2	1	0
	<i>Pi-2</i>	0	2	1
Дубрава×Виола	<i>Pi-ta<sup>2</sup></i>	0	0	2
	<i>Pi-1</i>	1	0	1
	<i>Pi-2</i>	0	0	2
Ханкайский 52×242-01	<i>Pi-1</i>	0	2	0
	<i>Pi-2</i>	2	0	0
Долинный×Дон 4237	<i>Pi-ta<sup>2</sup></i>	5	0	1
Рассвет×Окси 2х	<i>Pi-b</i>	7	10	4
Доля каллусных линий, %		40	34	26

Анализ каллусных линий, полученных с гибридов Д×М и Дб×В, которые обладают аллелями устойчивости трех генов, выявил не более двух комбинаций аллелей среди удвоенных гаплоидов одной каллусной линии из возможных восьми. Так, например, на каллусной линии 610.2.1 сформировалось семь удвоенных гаплоидов. У шести растений идентифицированы аллели устойчивости генов *Pi-1* и *Pi-2*, и у одного регенеранта – аллели устойчивости генов *Pi-1* и *Pi-ta<sup>2</sup>*. С одинаковой комбинацией аллелей устойчивости двух генов сформировалось до 28 растений, а с одинаковой комбинацией трех генов – до 18 растений.

**Выводы.** Выявлена внутрикалусная генетическая изменчивость удвоенных гаплоидов риса в андрогенезе *in vitro*, обусловленная гаметоклональной вариабельностью. Частота появления вариабельных каллусных линий составляет четверть (26%) от всех изученных каллусов. На одной каллусной линии представлена одна или две комбинации аллелей генов устойчивости к пирикулярриозу риса. Существует истинное клонирование удвоенных гаплоидов риса в пределах каллусной линии в андрогенезе *in vitro*.

#### Список литературы

1. Илюшко, М.В. Идентификация генов устойчивости к пирикулярриозу в сортах риса дальневосточной селекции с использованием ДНК-маркеров / М.В. Илюшко, П.В. Фисенко, Т.В. Суницкая, С.С. Гученко, Ц.-М. Чжан, Л.-В. Дэн, П.И. Костылев // *Зерновое хозяйство России*, 2017. – № 4 (52). – С. 41-45.
2. Evans, D.A. Somaclonal and gametoclonal variation / D.A. Evans, W.R. Sharp, H.P. Medina-Filho // *Amer. J. Bot.*, 1984. – Vol. 71 (2). – P. 759-774. DOI: 10.2307/2443467.
3. Germana, M.A. Gametic embryogenesis and haploid technology as valuable support to plant breeding / M.A. Germana // *Plant Cell. Rep.*, 2011. – Vol. 30. – P. 839-857. DOI: 10.1007/s00299-011-1061-7.
4. Pyushko, M.V. Effect of growing conditions of rice donor plants on anther culture *in vitro* / M.V. Pyushko // *Journal of Agricultural Science and Technology A*, 2015. – No 5. – P. 686-694. DOI: 10.17265/2161-6256/2015.08.007.
5. Tripathy, S.K. Exploring factors affecting anther culture in rice (*Oryza sativa* L.) / S.K. Tripathy, D. Swain, P.M. Mohapatra, A.M. Prusti, B. Sahoo, S. Panda, M. Dash, B. Chakma, S. Behera // *Journal of Applied Biology and Biotechnology*, 2019. – Vol. 7 (02). – P. 87-92. DOI: 10.7324/JABB.2019.70216.

УДК:633.11:632.4

**Результаты генетических исследований по повышению устойчивости мягкой пшеницы к грибным заболеваниям в Нечерноземной зоне**

***Инна Федоровна Лапочкина<sup>1</sup>, Ирина Юрьевна Макарова<sup>1</sup>,  
Наиль Рифкатович Гайнуллин<sup>1</sup>, Андрей Васильевич Нардит,***