

УДК 633.112.9:[631.527 + 573.6]

**ЭФФЕКТИВНОСТЬ МЕТОДА КУЛЬТУРЫ ПЫЛЬНИКОВ
ДЛЯ УСКОРЕННОГО СОЗДАНИЯ ГОМОЗИГОТНЫХ ЛИНИЙ ТРИТИКАЛЕ****Дьячук Т.И., Акинина В.Н., Хомякова О.В., Кибкало И.А., Поминов А.В.***ФГБНУ «Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Юго-Востока», Саратов,
e-mail: raiser_saratov@mail.ru*

Метод культуры пыльников был использован для ускоренного получения гомозиготных линий озимого тритикале. Проведены цитологические исследования, подтверждающие спорофитное развитие микроспор в культуре пыльников. Изучена эффективность гаплопродукции у шести гибридов тритикале. Установлена генотипическая зависимость основных этапов получения гаплоидных растений. Выход эмбрионных структур составил 9,0–145,4% к числу культивируемых пыльников, регенерация растений – 4,3–18,4%. Высокая частота хлорофиллдефектных регенерантов (альбиносов) является уязвимым местом этой гаплоидной биотехнологии тритикале. Всего в опыте получено 1129 растений, среди которых 309 зеленых и 820 – хлорофиллдефектных. Соотношение зеленых растений к альбиносам у разных гибридов колебалось от 2:1 до 1:20. Применение двухфакторного дисперсионного анализа позволило выявить долю влияния генотипа, питательной среды и их взаимодействия на основные параметры гаплопродукции тритикале. Формирование эмбрионных структур обусловлено в основном влиянием генотипа (75%). Доля влияния состава питательной среды была незначительной (3,2%), взаимодействие факторов составило 20,1%. На показатель «регенерация растений» наибольшее влияние оказали генотип (45,5%) и взаимодействие генотип x питательная среда (51,7%). Вклад питательной среды был статистически недостоверным. Для показателя «регенерация зеленых растений» наибольшей была доля влияния взаимодействия факторов (69,8%). Вклад генотипа и питательной среды был менее значимым, но статистически достоверным. Созданные на основе культуры пыльников ДН-линии включены в селекционный процесс озимого тритикале. В то же время необходимо отметить, что генотипическая зависимость всех этапов получения гаплоидных растений и высокий процент альбинизма все еще ограничивают возможность широкого использования этой гаплоидной биотехнологии в селекции тритикале.

Ключевые слова: тритикале, культура пыльников, гомозиготность, ДН-линии**EFFECTIVENESS OF THE ANTHER CULTURE METHOD FOR ACCELERATED
DEVELOPMENT OF TRITICALE HOMOZYGOUS LINES****Dyachuk T.I., Akinina V.N., Khomyakova O.V., Kibkalo I.A., Pominov A.V.***Agricultural Research Institute for South-East Regions, Saratov,
e-mail: raiser_saratov@mail.ru*

The anther culture method was used for accelerated development of triticales homozygous lines. Conducted cytological studies confirmed the sporophytic microspore development in anther culture. Effectiveness of haploid production among 6 triticales hybrids was studied. The genotypic dependence of different stages of haploid plants development was showed. Effectiveness of embryo like structures formation was 9,0–145,4% per anthers cultivated, plant regeneration – 4,3–18,4%. In general, 1129 haploid plants were received, among which 309 plants were green and 820 – albino. The ratio of green plants to albino was ranged from 2:1 to 1:20. The effect of medium, genotype and their interactions was investigated with application of two-ways variance analysis. The formation of embryo like structures was influenced in principal by the genotype (75%). The part of the nutrient medium composition was inconsiderable (3,2%), interaction of factors was 20,1%. The index «plant regeneration» was influenced both by genotype (45,5%) and interaction genotype x nutrient medium (51,7%). Contribution of the nutrient medium was statistically unreliable. The index «green plant regeneration» was influenced mainly by interaction of factors (69,8%). The investment of genotype and nutrient medium was less important but statistically significant. Based on anther culture, DH-lines are included in the selection process of winter triticales. At the same time it should be noted that genotype dependence of all stages of haploid production and high percent of albino plants still restrict the broad application of haploid biotechnology in plant breeding.

Keywords: triticales, anther culture, homozygosity, DH-line

Залогом успешного и стабильного производства зерна в Поволжье является биоразнообразие возделываемых культур. Среди зерновых культур тритикале является наиболее стрессоустойчивой [1]. Мировые площади под этой культурой достигли 4,14 млн га [2]. Одним из главных ее преимуществ является высокий потенциал продуктивности. Большой интерес к культуре

основан и на многоцелевом использовании зерна. Круг отраслей, применяющих зерно тритикале, достаточно широк. Оно востребовано в животноводстве, хлебопекарной, кондитерской и спиртовой промышленности. Нарращивание объемов производства зерна в современных условиях возможно только за счет создания принципиально новых сортов этой культуры, адаптированных

к жестким условиям региона, что требует достаточно большого генетически разнообразного и адаптированного исходного материала. На создание новых сортов методами традиционной селекции требуется 12–15 лет, из которых 5–7 лет затрачивается для достижения гомозиготности, обеспечивающей отличимость будущего сорта и стабильность его признаков. Биотехнологические методы, основанные на получении гаплоидных растений *in vitro*, позволяют получать гомозиготы одноэтапно и сокращать сроки создания сортов, отвечающие всем требованиям современного рынка. В различных лабораториях мира гаплоидные биотехнологии являются интегральной частью селекционного процесса у экономически значимых видов растений. На сегодняшний день зарегистрировано около 300 сортов, полученных с использованием различных ДН-протоколов, 150 из которых принадлежат *Poaceae* и их число постоянно увеличивается [3]. Культура пыльников является одним из методов массового получения гаплоидных растений у злаков [4]. Его разновидностью является культура изолированных микроспор [5]. Микроспоровый эмбриогенез (андрогенез) основан на спорофитном развитии микроспор (в отличие от гаметофитного), их делении и формировании эмбриоподобных структур. Регенерация растений из последних приводит к получению растений с гаплоидным числом хромосом. Последующая диплоидизация числа хромосом обеспечивает получение гомозиготных линий (ДН-линий). Известны лишь единичные факты получения гаплоидных растений тритикале методом селективной элиминации хромосом при использовании в качестве опылителя кукурузы [6] и дикой злаковой травы *Imperata cylindrica* [7]. В селекции ржи и тритикале гаплоидия менее востребована из-за низкой частоты получения зеленых растений.

Цель настоящего исследования – изучить эффективность метода культуры пыльников для создания селекционно ценных линий тритикале для условий Поволжья.

Материалы и методы исследования

Для получения гаплоидных растений и ДН-линий служили 6 гибридов от скрещивания элитных линий озимого тритикале. № 1 – F2 АД-1//МАГ/Эллада; № 2 – F2 Студент/Патриот//Эллада; № 3 – F2 Валентин/ДН-25//МАГ/Корнет; № 4 – F2 МАГ/АД1//Саратовская 8, оз. мягкая пшеница; № 5 – F2 МАГ/АД1//МАГ/Эллада; № 6 – F2 Устинья/

ДН-30. Донорные растения отбирали на стадии вакуолизированной микроспоры, и срезы побегов хранили в холодильнике при температуре + 2...5 °С в течение 7–10 суток. Все работы по вычленению и культивированию пыльников проводили в условиях асептики. Колосья стерилизовали раствором коммерческого препарата «Белизна» в течение 8 минут с последующей трехкратной промывкой стерильной дистиллированной водой. По каждому гибриду культивировали около 2 тысяч пыльников. В качестве индукционной питательной среды служили С-17 с добавлением в качестве регуляторов роста 2,4-Д (2 мг/л) и кинетин (0,5 мг/л). Через 6 недель культивирования ЭС размером более 1 мм были помещены на среду для регенерации растений, содержащей в качестве регуляторов роста ИУК (1,0 мг/л) и кинетин (0,5 мг/л). Для сравнительного анализа влияния состава питательных сред были использованы две прописи – №6 и С-17. Цитологический контроль за спорофитным развитием микроспор проводили на временных препаратах с окраской ацетокармином. Эффективность отдельных этапов гаплопродукции оценивали по следующим параметрам: выход эмбриогенных структур (ЭС, как % к общему числу пыльников *in vitro*), регенерация растений (% от общего количества эмбриогенных структур), выход зеленых и альбиносных растений (% от общего количества регенерантов). Гаплоидные растения были обработаны раствором колхицина (0,2%) с добавлением 8–10 капель ДМСО в качестве мембранотропного агента при комнатной температуре в течение 5 часов для получения удвоенных гаплоидов (ДН-линий). Полученные данные обрабатывали методом дисперсионного анализа с применением программ статистического и биометрико-генетического анализа в растениеводстве и селекции «AGROS-2» (версия 09).

Результаты исследования и их обсуждение

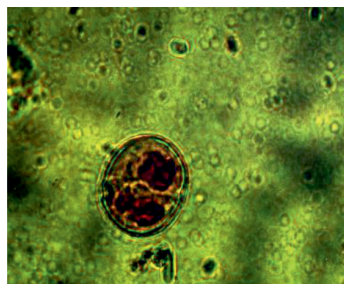
Проведенные цитологические исследования установили возможность различных событий при культивировании изолированных пыльников. Основная их часть гибнет на 7-й день культивирования, часть микроспор продолжает гаметофитную программу с последующей дегенерацией вегетативного и генеративного ядер, и лишь немногочисленная популяция клеток переходит на спорофитный путь развития. Последний реализуется на основе различных цитологических возможностей. При равном делении

микроспоры расположение поры и двух образующихся ядер соответствует равно-стороннему треугольнику (рисунок, а). Некоторые микроспоры делятся с формированием вегетативной и генеративной клеток с последующей митотической активностью вегетативной клетки (рисунок, б). В результате серии делений формируются многоклеточные структуры, которые какое-то время

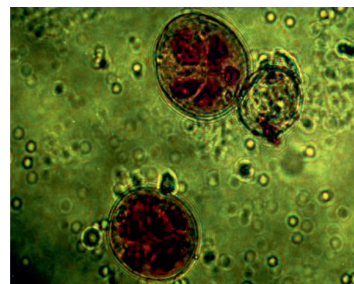
находятся внутри оболочки микроспоры (рисунок, в). Интенсивный рост многоклеточных новообразований способствует растяжению и разрыву оболочки микроспоры (рисунок, г) с последующим формированием эмбриоподобных структур (рисунок, д). Последующее культивирование ЭС на среде для регенерации приводит к формированию гаплоидных растений (рисунок, ж, з).



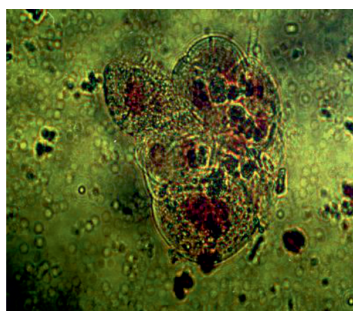
а



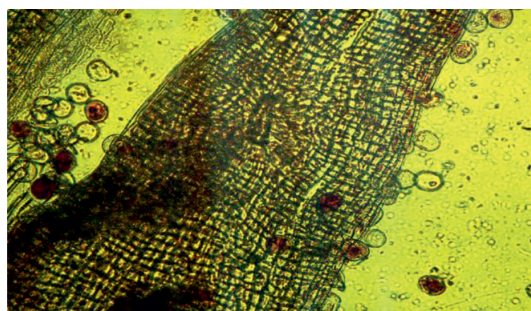
б



в



г



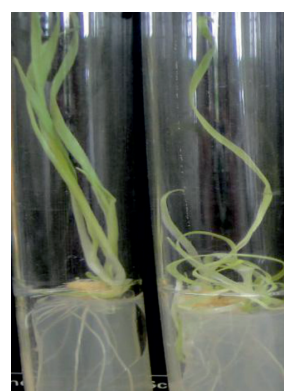
д



е



ж



з

*Последовательные этапы получения гаплоидных растений в культуре пыльников тритикале:
а – равное деление микроспоры, б – деление вегетативной клетки,
в – многоклеточные структуры, г – разрыв оболочки, д – общий вид пыльника
со спорофитно развивающимися микроспорами, е – эмбриоподобные структуры,
ж, з – последовательные стадии регенерации растений*

Изучение эффективности получения гаплоидных растений у шести гибридов озимого тритикале показало, что статистически значимые различия между ними наблюдаются как на промежуточных этапах, так и на основном – регенерации зеленых растений. Широкий спектр изменчивости у гибридов выявлен по показателю «выход эмбрионных структур» – он колебался от 9,0 до 145,4% с наибольшим значением у межвидового гибрида № 4 – F2 МАГ/АД1// Саратовская 8, оз. мягкая пшеница и № 6 – F2 Устинья/ДН-30. На одном пыльнике формировалось от 4,12 до 7,7 шт. эмбриоидов.

Успешность регенерации растений варьировала от 1,9 до 18,4%, Необходимо отметить, что ранжир гибридов по показателю «выход эмбрионных структур» и «успешность регенерации растений» не совпадает. Так, у гибрида № 4 – F2 МАГ/АД1// Саратовская 8, с высоким уровнем формирования эмбрионных структур успешность регенерации растений была самой низкой (1,9%). Напротив, у гибрида № 1 F2 АД-1//МАГ/Эллада при самой низкой частоте индукции новообразований (2,2%) успешность регенерации составила 8,1% и выход зеленых растений был наибольшим (табл. 1).

Генотипическая зависимость основных параметров андрогенеза при культивировании пыльников тритикале была отмечена и в других исследованиях [8]. Полученные данные подтверждают различный генетический контроль индукции андрогенетических структур и регенерации из них растений. Установлено, что по крайней мере три независимых генетических компонента вовле-

каются в отзывчивость генотипа – индукция эмбрионных структур, регенерация растений и регенерация зеленых растений. Эти три составляющие андрогенеза наследуются независимо и имеют полигенный контроль [9, 10]. Идентификация локусов количественных признаков (QTLs) позволила определить области генома, связанные с андрогенетической отзывчивостью тритикале. Индукция эмбрионных структур контролируется генами на хромосомах 5A, 4R, 5R и 7R. Наиболее высокий процент фенотипической изменчивости (17%) обусловлен локусом QARSsm-5R-1. Дополнительные маркеры обнаружены на хромосомах 5R, 2B, 7B и 5R. Регенерация как зеленых, так и хлорофиллдефектных растений контролируется генами 4A хромосомы [11].

Всего в опыте получено 1129 гаплоидных растений, в том числе 309 зеленых и 820 хлорофиллдефектных (альбиносных). Степень проявления альбинизма зависела от генотипа. У гибрида № 5 – F2 МАГ/АД1//МАГ/Эллада соотношение зеленых и альбиносных растений составило 1:20 (из 210 полученных регенерантов только 10 были зелеными). В то же время у гибрида № 1 – F2 АД-1//МАГ/Эллада выход зеленых растений был в два раза больше по сравнению с альбиносными. Высокая частота формирования альбиносных растений (31,3–95,2%) является одним из сдерживающих факторов получения гаплоидных растений в культуре пыльников тритикале. Как известно, альбинизм регенерантов *in vitro* является общим феноменом для различных видов злаков, у некоторых генотипов до 100% гаплоидов являются альбиносами [12].

Таблица 1

Эффективность этапов получения гаплоидных растений в культуре пыльников гибридов тритикале

Гибрид	Эмбрионных структур, шт. %	Регенерация растений			Соотношение зеленых растений к альбиносным
		Всего, шт. (%)	Зеленых, шт. (%)	Альбиносных, шт. (%)	
1	198(9,0)	16(8,1)	11(68,7)	5(31,3)	2:1
2	701(32,8)	45(6,4)	9(20,0)	36(80,0)	1:4
3	1267(53,9)	54(4,3)	13(24,1)	41(75,9)	1:4
4	2735(141,2)	151(1,9)	13(8,6)	138(91,4)	1:10
5	1624(77,7)	210(12,9)	10(4,8)	200(95,2)	1:20
6	3547(145,4)	653(18,4)	253(38,7)	400(61,3)	1:1,6
Всего	10072	1129(11,2)	309(27,4)	820(72,6)	1:2,1
Ффакт.	61843,8*	718,4*	96546,5*	13858,8*	
НСР	0,7	0,8	0,3	0,7	

Примечание. № 1 – F2 АД-1//МАГ/Эллада; № 2 – F2 Студент/Патриот//Эллада; № 3 – F2 Валентин/ДН-25//МАГ/Корнет; № 4 – F2 МАГ/АД1// Саратовская 8, оз. мягкая пшеница; № 5 – F2 МАГ/АД1//МАГ/Эллада; № 6 – F2 Устинья/ДН-30.

Таблица 2

Влияние состава питательных сред, генотипа и их взаимодействия на основные параметры гаплопродукции тритикале

Источник изменчивости	Выход эмбрионных структур			Регенерация растений			Регенерация зеленых растений		
	Доля влияния, %	F _{факт} *	HCP ₀₅	Доля влияния, %	F _{факт} *	HCP ₀₅	Доля влияния, %	F _{факт} *	HCP ₀₅
Генотип	75,0	42,3*	2,9	45,5	158,5*	1,2	17,5	3,9*	6,4
Питательная среда	3,2	106,8*	1,6	–	–	–	7,7	12,1*	6,4
Взаимодействие генотип x питательная среда	20,1	113,5*	4,2	51,7	183,6*	1,6	69,8	22,3*	12,8
Прочие факторы	2,7			2,8			5		

Для выявления роли минерального состава питательных сред N-6 и C-17, используемых в большинстве лабораторий для культивирования пыльников тритикале, был использован двухфакторный дисперсионный анализ, который позволил выявить вклад генотипа, питательной среды и их взаимодействия на основные параметры гаплопродукции тритикале.

Формирование эмбрионных структур обусловлено в основном влиянием генотипа (75%). Доля влияния состава питательной среды была незначительной (3,2%), взаимодействие факторов составило 20,1%.

На показатель «регенерация растений» наибольшее влияние оказали генотип (45,5%) и взаимодействие генотип x питательная среда (51,7%). Этот факт свидетельствует о том, что генотипы реагируют различно на состав питательной среды. Вклад питательной среды был статистически недостоверным. Для показателя «регенерация зеленых растений» наибольшей была доля влияния взаимодействия факторов (69,8%). Вклад генотипа и питательной среды был менее значимым, но статистически достоверным (табл. 2).

Использование метода культуры пыльников позволило за короткий срок создать гомозиготные линии и сформировать на их основе исходный материал для селекции тритикале в засушливых условиях Поволжья. Широкий спектр изменчивости селектуемых признаков отражает многочисленные типы рекомбинаций в микроспорах и дает возможность проведения отборов для ускоренного создания сортов с необходимыми свойствами. На различных этапах селекции изучаются ДН-линии, обладающие комплексом селекционно ценных

признаков. В то же время необходимо отметить, что генотипическая зависимость всех этапов получения гаплоидных растений и высокий процент альбинизма все еще ограничивают возможность широкого использования этой гаплоидной биотехнологии в селекции.

Выводы

1. Выявлена генотипическая зависимость основных этапов получения гаплоидных растений тритикале. Выход эмбрионных структур составил 9,0 до 145,4% от числа культивируемых пыльников, успешность регенерации – 1,9–18,4%, Главными лимитирующими факторами при получении гомозиготных линий тритикале является низкая частота регенерации растений и высокий процент альбинизма среди регенерантов.

2. Применение двухфакторного дисперсионного анализа позволило выявить долю влияния генотипа, питательной среды и их взаимодействия на основные параметры гаплопродукции тритикале. Формирование эмбрионных структур обусловлено в основном влиянием генотипа (75%). Доля влияния состава питательной среды была незначительной (3,2%), взаимодействие факторов составило 20,1%. На показатель «регенерация растений» наибольшее влияние оказали генотип (45,5%) и взаимодействие генотип x питательная среда (51,7%). Вклад питательной среды был статистически недостоверным. Для показателя «регенерация зеленых растений» наибольший процент фенотипической изменчивости обусловлен взаимодействием факторов (69,8%). Вклад генотипа и питательной среды был менее значимым, но статистически достоверным.

3. Использование метода гаплоидии позволило за короткий срок создать гомозиготные линии тритикале в качестве исходного материала для селекции тритикале в засушливых условиях Поволжского региона.

Список литературы

1. Грабовец А.И. Селекция тритикале при усилении засух: методы и результаты / А.И. Грабовец // Тритикале. Генетика, селекция и семеноводство: сб. тр. междунар. науч.-практ. конф. – Ростов н/Д, 2016. – С. 28–41.
2. Food and agriculture organization of the United Nations [электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://faostat.fao.org> (дата обращения: 20.09.2017).
3. Игнатова С.А. Клеточные биотехнологии в растениеводстве, генетике и селекции: задачи, возможности, разработки систем in vitro / С.А. Игнатова. – Одесса: Астропринт, 2011. – 224 с.
4. Gametic Cells and Molecular Breeding for Crop Improvement [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.scri.sari.ac.uk/assoc/COST851/> (дата обращения: 20.09.2017).
5. Ferrie A.M.R., Caswell K.L. Isolated microspore culture techniques and recent progress for haploid and doubled haploid plant production // Plant Cell Tissue Organ Cult. – 2011. – Vol. 114. – P. 301–309.
6. Pratap A., Sethi G.S., Chaudhary H.K. Relative efficiency of anther culture and chromosome elimination techniques for haploid induction in triticales x wheat and triticales x triticales hybrids // Euphytica. – 2006. – Vol. 150. – P. 339–345.
7. Chaudhary H.K., Sethi H.K., Singh S. Efficient haploid production in wheat by using pollen of Imperata cylindrica // Plant Breed. – 2005. – Vol. 124. – P. 96–98.
8. Wurschum T., Tucker M.R., Maurer H.P. Stress treatments influence efficiency of microspore embryogenesis and green plant regeneration in hexaploid triticales (x Triticosecale Wittmack L.) // In vitro Cell Biol. – 2014. – V. 50. – P. 143–148.
9. Charmet G., Bernard S. Diallel analysis of androgenetic plant production in hehaploid Triticales (x triticosecale, Wittmack) // Theor. Appl. Genet. – 1984. – Vol. 69. – P. 55–61.
10. Sanchez-Diaz R.A., Castillo A.M., Valles M.P. Microspore embryogenesis in wheat: new marker genes for early, middle and late stages of embryo development // Plant Reprod. – 2013. – Vol. 26. – P. 287–296.
11. Krzewska M., Czyczyło-Mysza I., Dubas E., Gole G., Golemic E., Stojalowski S., Chrupek M. Quantitative trait loci associated with androgenic responsiveness in triticales (Triticosecale Wittm.) anther culture // Plant Cell Rep. 2012.
12. Echavarri B., Cistue L. Enhancement in androgenesis efficiency in barley (Hordeum vulgare L.) and bread wheat (Triticum aestivum L.) by the addition of dimethyl sulfoxide to the mannitol pretreatment medium // Plant Cell Tiss. Organ Cult. – 2016. – Vol. 125. – P. 11–22.

(Triticum aestivum L.) by the addition of dimethyl sulfoxide to the mannitol pretreatment medium // Plant Cell Tiss. Organ Cult. – 2016. – Vol. 125. – P. 11–22.

References

1. Grabovec A.I. Selekcija tritikale pri usilenii zasuh: metody i rezultaty / A.I. Grabovec // Tritikale. Genetika, selekcija i semenovodstvo: sb. tr. mezhdunar. nauch.-prakt. konf. Rostov n/D., 2016. pp. 28–41.
2. Food and agriculture organization of the United Nations [jelektronnyj resurs]. Rezhim dostupa: <http://faostat.fao.org> (data obrashhenija: 20.09.2017).
3. Ignatova S.A. Kletochnye biotehnologii v rastenievodstve, genetike i selekcii: zadachi, vozmozhnosti, razrabotki sistem in vitro / S.A. Ignatova. Odessa: Astroprint, 2011. 224 p.
4. Gametic Cells and Molecular Breeding for Crop Improvement [jelektronnyj resurs]. Rezhim dostupa: <http://www.scri.sari.ac.uk/assoc/COST851/> (data obrashhenija: 20.09.2017).
5. Ferrie A.M.R., Caswell K.L. Isolated microspore culture techniques and recent progress for haploid and doubled haploid plant production // Plant Cell Tissue Organ Cult. 2011. Vol. 114. pp. 301–309.
6. Pratap A., Sethi G.S., Chaudhary H.K. Relative efficiency of anther culture and chromosome elimination techniques for haploid induction in triticales x wheat and triticales x triticales hybrids // Euphytica. 2006. Vol. 150. pp. 339–345.
7. Chaudhary H.K., Sethi H.K., Singh S. Efficient haploid production in wheat by using pollen of Imperata cylindrica // Plant Vreed. 2005. Vol. 124. pp. 96–98.
8. Wurschum T., Tucker M.R., Maurer H.P. Stress treatments influence efficiency of microspore embryogenesis and green plant regeneration in hexaploid triticales (x Triticosecale Wittmack L.) // In vitro Cell Biol. 2014. V. 50. pp. 143–148.
9. Charmet G., Bernard S. Diallel analysis of androgenetic plant production in hehaploid Triticales (x triticosecale, Wittmack) // Theor. Appl. Genet. 1984. Vol. 69. pp. 55–61.
10. Sanchez-Diaz R.A., Castillo A.M., Valles M.P. Microspore embryogenesis in wheat: new marker genes for early, middle and late stages of embryo development // Plant Reprod. 2013. Vol. 26. pp. 287–296.
11. Krzewska M., Czyczyło-Mysza I., Dubas E., Gole G., Golemic E., Stojalowski S., Chrupek M. Quantitative trait loci associated with androgenic responsiveness in triticales (Triticosecale Wittm.) anther culture // Plant Cell Rep. 2012.
12. Echavarri B., Cistue L. Enhancement in androgenesis efficiency in barley (Hordeum vulgare L.) and bread wheat (Triticum aestivum L.) by the addition of dimethyl sulfoxide to the mannitol pretreatment medium // Plant Cell Tiss. Organ Cult. 2016. Vol. 125. pp. 11–22.