

УДК 631 527.41:631.11: 633.14

СПОСОБНОСТЬ К АНДРОГЕНЕЗУ ЭУПЛАЗМАТИЧЕСКИХ ЛИНИЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ И АЛЛОПЛАЗМАТИЧЕСКИХ РЕКОМБИНАНТНЫХ ЛИНИЙ (*H. vulgare*)-*T. aestivum* С ТРАНСЛОКАЦИЯМИ 1RS.1BL И 7DL-7Ai И ПОЛУЧЕНИЕ ДИГАПЛОИДНЫХ ЛИНИЙ

© 2014 г. Т.С. Осадчая¹, Л.А. Першина^{1,2}, Н.В. Трубачеева¹,
И.А. Белан³, Л.П. Россеева³, Э.П. Девяткина¹

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск,
Россия, e-mail: pershina@bionet.nsc.ru;

² Новосибирский национальный исследовательский государственный университет,
Новосибирск, Россия, кафедра цитологии и генетики;

³ Сибирский научно-исследовательский институт сельского хозяйства
Россельхозакадемии, Омск, Россия

Поступила в редакцию 1 сентября 2014 г. Принята к публикации 10 октября 2014 г.

Изучена способность к андрогенезу в культуре пыльников эуплазматических линий мягкой пшеницы и аллоплазматических рекомбинантных линий (*H. vulgare*)-*T. aestivum*, несущих транслокации 1RS.1BL и 7DL-7Ai. У эуплазматических линий, имеющих обе эти транслокации, способность к образованию андрогенных структур и регенерации проростков подавлена. Аллоплазматические рекомбинантные линии (*H. vulgare*)-*T. aestivum*, как носители двух транслокаций 1RS.1BL и 7DL-7Ai, так и аллоплазматические линии с транслокацией 1RS.1BL, характеризуются повышенной способностью к образованию андрогенных структур, включая полиэмбриоиды, и к регенерации проростков по сравнению с эуплазматическими линиями. Обсуждается индуцирующее взаимное влияние цитоплазмы ячменя и хромосомы ржи 1RS на андрогенетическую способность линий (*H. vulgare*)-*T. aestivum*, несущих транслокации 1RS.1BL и 7DL-7Ai. От андрогенных растений со спонтанным удвоенным числом хромосом и восстановленной фертильностью сформированы дигаплоидные линии. Для использования в селекции выделены наиболее перспективные по проявлению хозяйственно ценных признаков и устойчивости к грибным патогенам линии-носители транслокаций.

Ключевые слова: культура пыльников, андрогенез, аллоплазматические линии (*H. vulgare*)-*T. aestivum*, транслокации 1RS.1BL, 7DL-7Ai.

ВВЕДЕНИЕ

Линии гаплоидов с удвоенным числом хромосом широко используются в фундаментальных исследованиях (Chu *et al.*, 2009) и селекции растений, поскольку такие линии являются гомозиготными и в работе с ними сокращается время отбора генотипов с нужными признаками и ускоряется селекционный процесс (Germana, 2011). Дигаплоидные (ДГ) линии используют в работах по интрогрессивной гибридизации при создании генотипов культурных растений

с устойчивостью к абиотическим (Humphreys *et al.*, 2007) и биотическим (Zhang *et al.*, 2001; Joshi, Nayak, 2010) факторам, а также как способ фиксации в одном генотипе сочетания серии целевых генов, перенесенных от разных родителей (пирамидирование генов), например, для закрепления гетерозиса (Maluszynski *et al.*, 2001).

Для получения ДГ-линий у пшеницы и ее гибридов наиболее часто используют гибридизацию с гаплопродюсерами (Ishii *et al.*, 2010), культуру изолированных микроспор (Shariatpanahi

et al., 2006) и пыльников (Barnabas *et al.*, 2001). Эффективность методов культивирования пыльников и микроспор оценивается по частоте получения жизнеспособных зеленых растений, на основе которых можно сформировать необходимые для дальнейшей работы ДГ-линии (Oleszczuk *et al.*, 2011).

Несмотря на возможность оптимизации всего комплекса методов, реакция пыльников на условия культивирования определяется влиянием генотипа растений (Konieczny *et al.*, 2003). Это обусловлено тем, что каждый из основных этапов андрогенеза (образование эмбриоидов; индукция эмбриоидов к регенерации проростков; развитие зеленых проростков и проростков-альбиносов) находится под независимым генетическим контролем со стороны ядерного генома (Agache *et al.*, 1989; Krzewska *et al.*, 2012) и цитоплазмы (Sági, Barnabás, 1989; Hernandez *et al.*, 2001). Отдельные хромосомы пшеницы (Toyr *et al.*, 2001) и интрогрессированные в ее геном чужеродные хромосомы (Добровольская и др., 2001, 2003) и их сегменты (Henry, Buysen, 1985; Agache *et al.*, 1989; Sibikeeva, Sibikeev, 1996; Schlegel *et al.*, 2000) могут в зависимости от генотипической среды оказывать существенное влияние на реакцию пыльников при культивировании.

В данной работе была поставлена задача – изучить способность к андрогенезу в культуре пыльников эуплазматических линий мягкой пшеницы и аллоплазматических рекомбинантных линий (*H. vulgare*)-*T. aestivum*, несущих транслокации 1RS.1BL и 7DL-7Ai, и получить дигаплоидные линии – носители этих транслокаций.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исходный материал

В работу включены эуплазматические линии (Л-27, Л-31, Л-35), носители пшенично-ржаной (1RS.1BL) и пшенично-пырейной (7DL-7Ai) транслокаций, аллоплазматические рекомбинантные линии (*H. vulgare*)-*T. aestivum* ($2n = 42$) с одной 1RS.1BL транслокацией (*H.v*-40, *H.v*-61, *H.v*-70) и двумя транслокациями 1RS.1BL и 7DL-7Ai (*H.v*-40 × Л-27, *H.v*-61 × Л-31, *H.v*-70 × Л-35). Эуплазматические линии (Л-27, Л-31, Л-35) ранее выделены из сорта яровой мяг-

кой пшеницы Омская 37, сочетающего транслокации 1RS.1BL и 7DL-7Ai, и идентифицированы на наличие пшенично-чужеродных транслокаций в наших предыдущих работах (Трубачеева и др., 2011; Белан и др., 2012). Аллоплазматические рекомбинантные линии мягкой пшеницы (*H. vulgare*)-*T. aestivum* ($2n = 42$) (*H.v*-40 × Л-27, *H.v*-61 × Л-31, *H.v*-70 × Л-35) выделены из популяции F₂ трех соответствующих гибридных комбинаций, где отцовскими линиями служили эуплазматические линии Л-27, Л-31, Л-35. В качестве материнских генотипов при получении гибридов были взяты линии, сформированные на основе отдельных растений ранее созданной и используемой в селекционном процессе аллоплазматической рекомбинантной формы Л-311/00-22 (Belan *et al.*, 2012), в родословной которой по материнской линии присутствует культурный ячмень *H. vulgare* (*H.v*). Форма Л-311/00-22 является носителем транслокации 1RS.1BL (Першина и др., 2013). (По предварительным результатам, пшенично-ржаные транслокации у всех изучаемых линий имеют общее происхождение.)

Культивирование пыльников

Все генотипы растений, включенные в эксперименты по культивированию пыльников, выращивали в гидропонной теплице в один и тот же вегетационный период. Условия предобработки пыльников, их вычленение, составы культуральных сред и условия культивирования были оптимизированы ранее для генотипов пшеницы, носителей пшенично-чужеродных транслокаций (Першина и др., 2013). Пыльники культивировали на среде ПИ (Chuang *et al.*, 1978) с добавлением 0,75 мг/л 2,4-Д, сахарозы и мальтозы (по 45 г/л), агара Vacto Difco (8 г/л) при $t = 29^\circ\text{C}$ без освещения. Эмбриоподобные структуры диаметром около 1 мм культивировали на среде Гамборга (B5) (Gamborg, Eveleigh, 1968) без фитогормонов при $t = 24^\circ\text{C}$ и при непрерывном освещении. Проростки на стадии трех листьев пересаживали в вегетационные сосуды.

Изучение андрогенеза

Особенности андрогенеза оценивали по частоте продуктивных пыльников (образовавших

эмбриоподобные структуры (ЭС)); частоте ЭС к 100 пыльникам; частоте ЭС с регенерацией всех проростков (альбиносов и зеленых); частоте всех проростков к общему числу ЭС; доле всех проростков к числу ЭС с регенерацией проростков; числу единичных зеленых проростков и кластеров зеленых проростков; варьированию числа зеленых проростков на один кластер; частоте зеленых проростков к общему числу ЭС; частоте зеленых проростков к общему числу проростков. Число отдельных проростков и их кластеров учитывали при пересадке регенерантов в вегетационные сосуды. Во время уборки оценивали число растений на кластер и растений, завязавших семена. Данные обработаны с помощью программы Statistica v.7.0.61.0.

ПЦР-анализ

Для подтверждения присутствия транслокации 1RS.1BL у аллоплазматических линий *H.v-40* × Л-27, *H.v-61* × Л-31, *H.v-70* × Л-35 и полученных на их основе дигиплоидных линий использован SCAR-маркер *iag95*, сцепленный с генами *Lr26*, *Sr31*, локализованными на коротком плече хромосомы 1R ржи (Mago *et al.*, 2002). (Структура праймеров: F: CTCTGTGGATAGTTACTTGATCGA; R: CCTAGAACATGCATGGCTGTTACA.) Для идентификации пшенично-пырейной транслокации 7DL-7Ai использован SCAR-маркер *scm265*, сцепленный с геном *Lr19*, локализованным на хромосоме 7AgL пырея *Ag. elongatum* (Host.) Beauv (Gupta *et al.*, 2006). (Структура праймеров: F: GGCGGATAAGCAGAGCAGAG; R: GGCGGATAAGTGGGTATGG.) Для подтверждения принадлежности изученных линий к аллоплазматическим генотипам (*H. vulgare*)-*T. aestivum* наличие цитоплазмы ячменя *H. vulgare* L. детектировали с помощью ПЦР-ПДРФ анализа маркера хлоропластной ДНК *ucf5* по ранее описанной методике (Першина и др., 2014).

Отбор и изучение дигиплоидных линий

Дигиплоидные линии формировали на основе каждого андрогенного растения, завязавшего семена, и размножали в гидропонной теплице.

Выделяли цитогенетически стабильные линии. Препараты для цитологического анализа готовили по стандартной методике с окрашиванием хромосом по Фельгену. Часть дигиплоидных линий изучали при выращивании на полях ГНУ СибНИИСХ (южная лесостепь) в 2014 г. Посев, выращивание, анализ хозяйственно ценных признаков и устойчивости к грибным патогенам выполнены по рекомендациям В.А. Зыкина с соавт. (2004). Стандартом при изучении дигиплоидных линий являлся сорт яровой мягкой пшеницы Омская 38 (носитель транслокаций 1RS.1BL и 7DL-7Ai).

РЕЗУЛЬТАТЫ

При культивировании пыльников всех генотипов на индукционной среде из них развивались эмбриоподобные структуры (одиночные эмбриоиды и полиэмбриоиды) и каллусы. При культивировании на регенерационной среде, как правило, каллусы и часть эмбриоподобных структур оставались без изменения. У некоторых ЭС развивались корни, а у части ЭС развивались одиночные проростки или кластеры проростков.

Способность линий к андрогенезу

У эуплазматических линий Л-27, Л-31, Л-35, носителей пшенично-ржаной 1RS.1BL и пшенично-пырейной 7DL-7Ai транслокаций, способность к андрогенезу в культуре пыльников на всех его этапах подавлена (табл. 1, 2). Каждая из этих линий характеризуется низкими значениями частоты продуктивных пыльников (пыльников с эмбриоподобными структурами), частоты образования эмбриоподобных структур к 100 культивированным пыльникам, частоты эмбриоподобных структур с регенерацией всех проростков (альбиносов и зеленых), частоты регенерации всех проростков и зеленых проростков к общему числу эмбриоподобных структур.

Линии (*H. vulgare*)-*T. aestivum* *H.v-40* × Л-27, *H.v-61* × Л-31, *H.v-70* × Л-35, носители транслокаций 1RS.1BL и 7DL-7Ai, характеризуются более высокой способностью как к образованию эмбриоподобных структур, так и к регенерации из эмбриоидов проростков, в том числе зеленых, по сравнению с эуплазматическими линиями

Таблица 1

Результаты культивирования пыльников аллоплазматических и эуплазматических линий мягкой пшеницы с транслокациями 1RS.1BL и 7DL-7A_i на среде Р-II

Линии	Число культивированных пыльников	Число и частота продуктивных пыльников, %	Общее число ЭС и их частота к 100 культивированным пыльникам, %	Число и частота ЭС с регенерацией всех проростков, %	# Общее число проростков и их частота к общему числу ЭС, %
Аллоплазматические 1RS.1BL					
Н.в.-40	472	126 26,7***	739 156***	332 44,9***	657 88,9***
Н.в.-61	270	46 17,0/**/ ***/	257 95,1***	87 33,8***	267 103,8***
Н.в.-70	387	73 18,8***	288 74,4***	56 19,4	229 79,5***
Эуплазматические 1RS.1BL+7DL-7A _i					
Л-27	378	25 6,6	31 8,2	3 9,6	8 25,8
Л-31	360	31 8,6	64 17,7	8 12,5	21 32,8
Л-35	313	23 7,3	50 15,9	7 14,0	14 28,0
Аллоплазматические 1RS.1BL+7DL-7A _i					
Н.в.-40 × Л-27	354	74 20,9(*)***	215 60,7(***)***	98 45,5***	203 94,4(**)***
Н.в.-61 × Л-31	276	42 15,2***	103 37,3(***)***	45 43,6***	314 304,8(***)***
Н.в.-70 × Л-35	292	57 19,5***	188 64,3(**)***	77 40,9(***)***	187 99,4(***)***

Примечание. ЭС – эмбриоподобные структуры; # альбиносы и зеленые проростки. Разница по сравнению с линиями Л-27, Л-31 и Л-35 достоверна при *** $p < 0,001$, по сравнению с линией Л-31 при ***/ $p < 0,01$, с линиями Л-27 и Л-35 при ***/ $p < 0,01$; по сравнению с линиями Н.в.-40, Н.в.-61, Н.в.-70 достоверна при (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$ и (***) $p < 0,001$.

Л-27, Л-31, Л-35 с транслокациями 1RS.1BL+7DL-7A_i.

Источниками цитоплазмы аллоплазматических рекомбинантных линий Н.в.-40 × Л-27, Н.в.-61 × Л-31, Н.в.-70 × Л-35 с транслокациями 1RS.1BL+7DL-7A_i были соответствующие аллоплазматические рекомбинантные линии Н.в.-40, Н.в.-61, Н.в.-70 – носители транслокации 1RS.1BL. Сравнение значений показателей андрогенеза у каждой из аллоплазматических рекомбинантных линий Н.в.-40 × Л-27, Н.в.-61 × Л-31, Н.в.-70 × Л-35, несущих две транслокации,

1RS.1BL и 7DL-7A_i, с их материнскими линиями Н.в.-40, Н.в.-61 и Н.в.-70, носителями одной транслокации 1RS.1BL, выявило следующие особенности.

Значения таких показателей, как частота продуктивных пыльников и частота эмбриоподобных структур к 100 пыльникам, у аллоплазматических рекомбинантных линий с двумя транслокациями, 1RS.1BL+7DL-7A_i, были ниже или на уровне значений этих показателей андрогенеза у аллоплазматических рекомбинантных линий, несущих только пшенично-ржаную

Таблица 2

Развитие зеленых проростков и кластеров зеленых проростков из эмбриоподобных структур аллоплазматических и эуплазматической линий мягкой пшеницы с транслокациями 1RS.1BL и 1RS.1BL+7DL-7Ai на регенерационной среде

Линии	Соотношение всех проростков к числу ЭС с регенерацией проростков	Число единичных зел. пр./число кластеров зел. пр. и варьирование зел. пр. в кластере	Зеленые проростки			Число и частота фертильных растений, %
			Всего	Частота к общему числу ЭС, % [#]	Частота к общему числу проростков, % [#]	
Аллоплазматические 1RS.1BL						
<i>H.v.</i> -40	1,97	9/14 2–28	161	21,7***	24,5/***/	64 39,7
<i>H.v.</i> -61	3,06	5/6 2–2	136	52,9***	50,9/***/	22 16,1
<i>H.v.</i> -70	4,08	2/6 3–15	87	30,2***	37,9/***/	20 22,9
Эуплазматические 1RS.1BL+7DL-7Ai						
Л-27	2,66	0/0	0	0	0	0
Л-31	2,62	2/0	2	3,1	9,5	0
Л-35	2,0	0/1	6	12,0	42,8	4 66,6
Аллоплазматические 1RS.1BL+7DL-7Ai						
<i>H.v.</i> -40 × Л-27	2,07	0/7 5–26	97	45,1(***)***	47,7(***)/***/	42 43,3
<i>H.v.</i> -61 × Л-31	6,97	1/14 3–30	213	206,7(***)***	67,8(***)/***/	32 15,0
<i>H.v.</i> -70 × Л-35	2,42	2/6 8–33	105	55,8(***)***	56,1(***)	21 20,0

Примечание. [#]Число ЭС и общее число проростков (альбиносы + зеленые) представлены в табл. 1. Разница по сравнению с линиями Л-27, Л-31, Л-35 достоверна при *** $p < 0,001$; по сравнению с линиями Л-27 и Л-31 при *** $p < 0,001$; по сравнению с линиями *H.v.*-40, *H.v.*-61, *H.v.*-70 при *** $p < 0,001$.

транслокацию 1RS.1BL (табл. 1). Что касается таких показателей андрогенеза, как частота эмбриоподобных структур к 100 пыльникам; частота эмбриоподобных структур с регенерацией всех проростков (альбиносов и зеленых); частота всех регенерировавших проростков к общему числу эмбриоподобных структур (табл. 1), а также частота зеленых проростков к общему числу эмбриоподобных структур (табл. 2), то у аллоплазматических рекомбинантных линий *H.v.*-40 × Л-27, *H.v.*-61 × Л-31, *H.v.*-70 × Л-35, носителей транслокаций 1RS.1BL и 7DL-7Ai, они достоверно выше, чем у их материнских

аллоплазматических рекомбинантных линий с транслокацией 1RS.1BL.

Особенности регенерации проростков

При культивировании эмбриоподобных структур (отдельных эмбриоидов и полиэмбриоидов) на регенерационной среде не все из них проявили способность к регенерации проростков. Однако, как следует из данных, представленных в табл. 2, у всех генотипов в среднем из одной эмбриоподобной структуры развитие получало более одного проростка (табл. 2). Так,

минимальная величина соотношения числа проростков к числу эмбриоподобных структур, проявивших способность к регенерации, составила 1,97 (линия *H.v.-40*), а максимальная – 6,97 (линия *H.v.-61* × *Л-31*).

На примере изучения развития зеленых проростков выявлено, что у всех аллоплазматических рекомбинантных линий *H.v.-40* × *Л-27*, *H.v.-61* × *Л-31*, *H.v.-70* × *Л-35*, носителей двух транслокаций, 1RS.1BL и 7DL-7Ai, и линий *H.v.-40*, *H.v.-61*, *H.v.-70*, носителей одной транслокации 1RS.1BL, преимущественно развивались не единичные проростки, а кластеры проростков (табл. 2). Источниками кластеров проростков являются полиэмбриониды (андрогенные полиэмбрионы). Минимальное число проростков в кластерах ряда линий составляло два, а максимальное, выявленное у линии *H.v.-61*, – 42 проростка. Среди эуплоидных линий, носителей транслокаций 1RS.1BL и 7DL-7Ai, только у линии *Л-35* наблюдали развитие одного кластера зеленых проростков.

Преимущественное развитие более одного проростка из одной эмбриоподобной структуры объясняет тот факт, что для некоторых показателей андрогенеза их значения составили более 100 %. Так, частота всех регенерировавших проростков к числу эмбриоподобных структур у линии *H.v.-61* × *Л-31* и линии *H.v.-61* составила соответственно 304,7 и 103,8 % (табл. 1).

Формирование и изучение дигаплоидных линий

Среди андрогенных растений, достигших колосения, были выявлены стерильные растения, растения, завязавшие единичные зерна, и растения с полным восстановлением фертильности. По частоте андрогенных растений, проявивших частичную или полную фертильность, нет достоверных различий между аллоплазматическими рекомбинантными линиями, носителями одной транслокации 1RS.1BL и носителями двух транслокаций, 1RS.1BL и 7DL-7Ai (табл. 2). Источниками дигаплоидных линий стало каждое растение, завязавшее семена. На данном этапе в работу по формированию дигаплоидных линий были включены только 42-хромосомные цитогенетически стабильные растения, сформированные на основе андрогенных растений

с полным восстановлением фертильности. На основании ПЦР-анализа выделяли растения, носители генов *Lr26* и *Lr19*. В селекционные испытания было включено 12 сформированных дигаплоидных линий.

По результатам первого года испытаний для дальнейшего селекционного процесса отобрано четыре линии, носители транслокаций 1RS.1BL и 7DL-7Ai (табл. 3).

Эти линии характеризуют высокая полевая устойчивость к полеганию (высший балл – 5), урожайность на уровне стандарта или превышающая его и устойчивость к бурой ржавчине. Данные по устойчивости к стеблевой ржавчине не приведены, поскольку в год испытания ее распространения не наблюдали. Генотипы с пшенично-ржаной транслокацией 1RS.1BL характеризуются повышенной урожайностью, но не устойчивы к бурой ржавчине.

ОБСУЖДЕНИЕ

Как следует из результатов, полученных в настоящей работе, между аллоплазматическими рекомбинантными линиями (*H. vulgare*)-*T. aestivum* и эуплазматическими линиями мягкой пшеницы, носителями двух транслокаций 1RS.1BL и 7DL-7Ai, сильно выражены различия по проявлению признаков андрогенеза в культуре пыльников. У эуплазматических линий в отличие от аллоплазматических рекомбинантных линий образование эмбриоподобных структур и развитие проростков сильно подавлены. Это согласуется с ранее полученными данными (Першина и др., 2013) о низкой способности к андрогенезу у сорта пшеницы Омская 38 и его сестринского сорта Омская 37, – источника эуплазматических линий *Л-27*, *Л-31*, *Л-35*, использованных в настоящей работе. При этом низкая способность к андрогенезу у этих сортов не зависела от условий выращивания растений (Наши неопубл. данные).

Показано, что у генотипов мягкой пшеницы с пшенично-пырейной транслокацией 7DL-7Ai образование андрогенных эмбрионидов и регенерация зеленых проростков подавлены (Sibikeeva, Sibikeev, 1996; Сибикеева и др., 2004). Для генотипов мягкой пшеницы с пшенично-ржаной транслокацией 1RS.1BL, напротив, во многих случаях проявляется

Таблица 3

Результаты отбора перспективных дигаплоидных линий

Обозначение ДГ-линии	Урожайность, т/га	Вегетационный период, сут	Высота растений, см	Устойчивость к полеганию, балл	Поражаемость патогенами к концу вегетации, %		Наличие генов, определяющих устойчивость к бурой ржавчине
					МР	БР	
Стандарт Омская 38	3,0	100	105	5	70	5	<i>Lr26+Lr19</i>
ДГ35-1	3,01	98	95	5	40	0	<i>Lr26+Lr19</i>
ДГ35-2	3,43	97	95	5	40	15	<i>Lr26+Lr19</i>
ДГ(<i>H.v.</i> -40 × Л-27)-1	3,77	98	95	5	50	0	<i>Lr26+Lr19</i>
ДГ(<i>H.v.</i> -40 × Л-27)-2	2,91	104	95	5	40	0	<i>Lr26+Lr19</i>
ДГ (<i>H.v.</i> -40)-2	3,86	97	100	5	40	60	<i>Lr26</i>
ДГ (<i>H.v.</i> -40)-3	4,45	98	110	5	30	70	<i>Lr26</i>

Примечание. МР – мучнистая роса, БР – бурая ржавчина.

повышенная способность к образованию эмбриоидов и развитию проростков (Henry *et al.*, 1985; Schlegel *et al.*, 2000), в том числе зеленых проростков (Schlegel *et al.*, 2000).

Из этого следует, что у изученных в наших работах эуплазматических линий Л-27, Л-31, Л-35 и сортов пшеницы Омская 37, Омская 38, несущих транслокации 1RS.1BL и 7DL-7Ai, в проявлении признаков андрогенеза доминирует негативное влияние пшенично-пырейной транслокации 7DL-7Ai.

Однако, как следует из результатов настоящей работы, изменение генотипической среды, в которой функционируют эти транслокации, приводит к изменению реакции пыльников к условиям культивирования: у аллоплазматических рекомбинантных линий (*H. vulgare*)-*T. aestivum* – носителей транслокаций 1RS.1BL и 7DL-7Ai – негативное влияние пшенично-пырейной транслокации подавлено. Об аналогичном эффекте изменения генотипической среды на супрессирующее влияние транслокации 7DL-7Ai на андрогенез известно и из другого примера: у генотипов пшеницы, у которых помимо транслокации 7DL-7Ai функционируют гены (*Pro1+Pro2*) (определяющие высокое содержание белка в зерне), увеличивается частота образования андрогенных эмбриоидов и регенерации зеленых проростков (Сибикеева и др., 2004).

В предыдущих наших работах показано, что аллоплазматические рекомбинантные линии

(*H. vulgare*)-*T. aestivum* при разных условиях культивирования пыльников проявляют повышенную способность к андрогенезу (Першина и др., 1999; 2013). У всех аллоплазматических линий (*H. vulgare*)-*T. aestivum*, изученных в настоящей работе, основным источником регенерировавших проростков являются полиэмбриоиды (андрогенные полиэмбрионы). Образование андрогенных полиэмбрионов отмечали и в культуре пыльников мягкой пшеницы (Сельдиминова и др., 2009) и тритикале (Oleszczuk *et al.*, 2014).

По нашим данным (Першина и др., 2005, 2007), в условиях *in vivo* проявление полиэмбрионии является одним из фенотипических признаков, обусловленных взаимодействием цитоплазмы ячменя *H. vulgare* и хромосомы ржи 1R. Это согласуется с данными об аналогичном контроле проявления полиэмбрионии и в другой системе взаимодействия между цитоплазмой и хромосомой ржи: у аллоплазматической линии мягкой пшеницы Salmon – носителя цитоплазмы *Aegilops kotschy* Boiss. и хромосомы ржи 1RS – происходит развитие близнецов (Tsunewaki, 1996).

По-видимому, у аллоплазматических рекомбинантных линий (*H.v.*-40 × Л-27, *H.v.*-61 × Л-31, *H.v.*-70 × Л-35), несущих транслокации 1RS.1BL и 7DL-7Ai, определяющим фактором повышенной способности к андрогенезу в культуре пыльников является взаимное влияние цитоплазмы ячменя и хромосомы ржи 1RS.

Интерес к генотипам мягкой пшеницы, в том числе и дигапloidным линиям, в геноме которых присутствуют две транслокации – пшенично-ржаная 1RS.1BL и пшенично-пырейная 7DL-7Ai – обусловлен тем, что они являются носителями генов, определяющих устойчивость к грибным патогенам. На хромосоме 1RS локализован кластер сцепленных генов *Lr26/Sr31/Yr9/Pm8* (Singh *et al.*, 1990), а на сегменте хромосомы пырея в транслокации 7DL-7Ai – кластер генов *Lr19/Sr25* (Liu *et al.*, 2010). И если каждый из генов, *Lr26* и *Lr19*, ответственных за устойчивость к бурой ржавчине, к настоящему времени практически утратил эффективность, то их комбинация обеспечивает высокую устойчивость к популяциям листовой ржавчины (Сюков, Зубов, 2008).

Это подтверждают и результаты, полученные в настоящей работе. Из данных, приведенных в табл. 3, видно, что при выращивании в поле дигапloidные линии, носители комбинации генов *Lr26+Lr19*, устойчивы к популяциям бурой ржавчины, а дигапloidные линии, носители только гена *Lr26*, – неустойчивы. Более того, ген *Sr25* является одним из немногих генов, который определяет устойчивость пшеницы к патогенам стеблевой ржавчины, в том числе и появившейся в последние годы агрессивной расе Ug99 + Sr24 (ТТКСТ) (Jin *et al.*, 2007). Сорты яровой мягкой пшеницы селекции СибНИИСХ с транслокациями 1RS.1BL и 7DL-7Ai, т. е. сочетающие гены *Sr31* и *Sr25*, также устойчивы к этой расе стеблевой ржавчины (Белан и др., 2012). Это, по-видимому, обусловлено доминирующим влиянием гена *Sr25*, поскольку сорта с транслокацией 1RS.1BL, длительное время защищенные от стеблевой ржавчины функционированием гена *Sr31*, поражаются агрессивной расой стеблевой ржавчины Ug99 (Pretorius *et al.*, 2000).

Получение в настоящей работе дигапloidных линий, сформированных на основе растений, регенерировавших из разных типов эмбриоподобных структур и проявивших неодинаковый уровень фертильности, предполагает как возможность отбора новых линий для селекционных испытаний, так и необходимость их дальнейшего изучения для выяснения возможных проявлений гаметоклональной изменчивости, индуцированной условиями *in vitro* в культуре пыльников.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Живая природа; современное состояние и проблемы развития» № 30.36 и РФФИ (проект № 14-04-00674).

ЛИТЕРАТУРА

- Белан И.А., Россеева Л.П., Россеев В.М., Бадаева Е.Д., Зеленский Ю.И., Блохина Н.П., Шепелев С.С., Першина Л.А. Изучение хозяйственно ценных и адаптивных признаков у линий сорта яровой мягкой пшеницы Омская 37, несущих транслокации 1RS.1BL и 7DL-7Ai // Вавилов. журн. генет. и селекции. 2012. Т. 16. № 1. С. 178–186.
- Добровольская О.Б., Першина Л.А., Кравцова Л.А., Щапова А.И. Влияние хромосом ржи на особенности андрогенеза у пшенично-ржаных замещенных линий *Triticum aestivum* L. сорта Саратовская 29/*Secale cereale* L., сорта Онохойская и тритикале // Генетика. 2001. Т. 37. № 5. С. 624–630.
- Добровольская О.Б., Першина Л.А., Кравцова Л.А., Щапова А.И. Сравнение эффекта хромосом ржи 1R и 5R на особенности андрогенеза при культивировании пыльников пшенично-ржаных замещенных линий в зависимости от происхождения линий // Генетика. 2003. Т. 39. № 3. С. 570–574.
- Зыкин В.А., Россеева Л.П., Белан И.А., Кадиков Р.К. Методика оценки селекционных форм и сортов мягкой пшеницы при испытании на отличимость, однородность и устойчивость к факторам среды // Метод. рекомендации. СО РАСХН, СибНИИСХ, ФГОУ ВПО БГАУ, УФА, 2004. 39 с.
- Першина Л.А., Белова Л.И., Девяткина Э.П., Нумерова О.М., Шумный В.К. Эффективность получения гапloidных растений в культуре пыльников и при отдаленных скрещиваниях злаков // Физиология и биохимия культурных растений. 1999. Т. 31. № 3. С. 196–202.
- Першина Л.А., Белова Л.И., Девяткина Э.П., Раковцева Т.С., Кравцова Л.А., Щапова А.И. Особенности скрещиваемости, проявления гапloidии и полиэмбрионии в гибридных комбинациях между культурным ячменем *H. vulgare* L. ($2n = 14$) и пшенично-ржаными замещенными линиями *Triticum aestivum* L. сорта Саратовская 29/*Secale cereale* L. сорта Онохойская // Генетика. 2005. Т. 40. № 6. С. 784–792.
- Першина Л.А., Осадчая Т.С., Бадаева Е.Д., Белан И.А., Россеева Л.П. Изучение особенностей андрогенеза в культуре пыльников сортов и перспективной формы яровой мягкой пшеницы западносибирской селекции, различающихся наличием или отсутствием пшенично-чужеродной транслокации // Вавилов. журн. генет. и селекции. 2013. Т. 17. № 1. С. 40–49.
- Першина Л.А., Раковцева Т.С., Белова Л.И., Девяткина Э.П., Силкова О.Г., Кравцова Л.А., Щапова А.И. Влияние хромосом ржи *Secale cereale* L. 1R и 3R на проявление полиэмбрионии в гибридных комбинациях между аллоплазматическими рекомбинантными линиями (*Hordeum* L.)-*Triticum* и пшенично-ржаными замещенными линиями *Triticum aestivum* L./*Secale*

- cereale* L. // Генетика. 2007. Т. 43. № 7. С. 955–962.
- Першина Л.А., Трубочеева Н.В., Синявская М.Г., Девяткина Э.П., Кравцова Л.А. Ядерно-цитоплазматическая совместимость и изучение состояния районов митохондриальной и хлоропластной ДНК у аллоплазматических рекомбинантных и интрогрессивных линий (*H. vulgare*)-*T. aestivum* // Генетика. 2014. Т. № 10. С. 196–202.
- Сельдиминова О.А. Формирование полиэмбрионов в культуре *in vitro* пыльников пшеницы // Физиология и биохимия культурных растений. 2009. Т. 41. № 6. С. 531–538.
- Сибикеева Ю.Е., Сибикеев С.Н., Крупнов В.А. Влияние *Lr19*-транслокации на андрогенез *in vitro* и наследование устойчивости к листовой ржавчине в популяциях DH_3 -линий и F_2 гибридов мягкой пшеницы // Генетика. 2004. Т. 40. № 9. С. 1224–1228.
- Сюков В.В., Зубов Д.Е. Генетическая коллекция мягкой пшеницы по устойчивости к бурой листовой ржавчине // Методические рекомендации. Самара: СамНЦ РАН, 2008. 24 с.
- Трубочеева Н.В., Россеева Л.П., Белан И.А., Осадчая Т.С., Кравцова Л.А., Колмаков Ю.В., Блохина Н.П., Першина Л.А. Особенности сортов яровой мягкой пшеницы Западной Сибири, несущих пшенично-ржаную транслокацию 1RS.1BL // Генетика. 2011. Т. 47. № 1. С. 18–24.
- Agache S., Bacheller B., Buysse J., Henry Y., Snape J. Genetic control of anther culture response in wheat using aneuploid, chromosome substitution and translocation lines // Theor. Appl. Genet. 1989. V. 77. P. 7–11.
- Barnabas B., Szakacs É., Karsai I., Bedő Z. *In vitro* androgenesis of wheat: from fundamental to practical application // Euphytica. 2001. V. 119. P. 211–216.
- Belan I.A., Rosseva L.P., Rosseev V.M., Morgounov A.I., Zelenskiy Y.I., Gulyaeva E.I., Baranova O.A., Badaeva E.D., Pershina L.A. Using of alien genetic material in spring bread wheat breeding in Western Siberia // Eur. Cereals Genet. Co-operative Newslett. 2012. P. 113–115.
- Chu C.-G., Friesen T.L., Xu S.S., Faris J.D., Kolmer J.A. Identification of novel QTL for seedling and adult resistance in a wheat doubled haploid population // Theor. Appl. Genet. 2009. V. 119. P. 263–269.
- Chuang C.C., Ouyang J.W., Chia H., Chou S.M., Ching C.K. A set of potato media for wheat anther culture // Proc. Symp. Plant Tissue Culture. Peking: Sci. Press., 1978. P. 51–56.
- Gamborg O.L., Eveleigh D.E. Culture methods and detection of glucanases in suspension cultures of wheat and barley // Can. J. Biochem. 1968. V. 46. P. 417–421.
- Germana M.A. Gametic embryogenesis and haploid technology as valuable support to plant breeding // Plant Cell Rep. 2011. V. 30. P. 839–857.
- Gupta S.K., Charpe A., Prabhu K.V., Haque Q.M. Identification and validation of molecular markers linked to the leaf rust resistance gene *Lr19* in wheat // Theor. Appl. Genet. 2006. V. 113. P. 1027–1036.
- Henry Y., Buysse J. Effect of the 1B/1R translocation on anther-culture ability in wheat // Plant Cell Rep. 1985. V. 4. P. 307–310.
- Hernandez P., Barcelo P., Martin A., Cabrera A. The effect of *Hordeum chilense* and *Triticum* cytoplasm on anther culture response of tritirdeum // Plant Cell Rep. 2001. V. 20. P. 542–546.
- Humphreys M.W., Gasior D., Lesniewska-Bocianowska A., Zwierzykowski Z., Rapacz M. Androgenesis as a means of dissecting complex genetic and physiological controls: selecting useful gene combinations for breeding freezing tolerant grasses // Euphytica. 2007. V. 158. P. 337–345.
- Ishii T., Ueda T., Tanaka H. Chromosome elimination by wide hybridization between Triticeae or oat plant and pearl millet: pearl millet chromosome dynamics in hybrid embryo cell // Chromosome Res. 2010. V. 18. P. 821–831.
- Jin Y., Singh R.P., Ward R.W., Wanyera R., Kinyua M., Njau P., Pretorius Z.A. Characterization of seedling infection types and adult plant infection responses of monogenic *Sr* gene lines to race TTKS of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* // Plant Disease. 2007. V. 91. P. 1096–1099.
- Joshi R.K., Nayak S. Gene pyramiding – a broad spectrum technique for developing durable stress resistance in crop // Biotechnol. and Mol. Biol. Rev. 2010. V. 5. P. 51–60.
- Konieczny R., Czaplicki A.Z., Golczyk H., Przywara L. Two pathways of plant regeneration in wheat anther culture // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 2003. V. 73. P. 177–187.
- Krzewska M., Czyczyło-Mysza I., Dubas E., Golebiowska-Pikania G., Golemic E., Stojalowski S., Chrupek M., Zur I. Quantitative trait loci associated with androgenic responsiveness in triticale (*× Triticosecale* Wittm.) anther culture // Plant Cell Rep. 2012. V. 31. P. 2099–2108.
- Liu S., Yu L.-X., Singh R.P., Jin Y., Sorrells M.E., Anderson J.A. Diagnostic and co-dominant PCR markers for wheat stem rust resistance genes *Sr25* and *Sr26* // Theor. Appl. Genet. 2010. V. 120. P. 691–697.
- Mago R., Spielmeyer W., Lawrence J., Lagudah S., Ellis G., Pryor A. Identification and mapping of molecular markers linked to rust resistance genes located on chromosome 1RS of rye using wheat-rye translocation lines // Theor. Appl. Genet. 2002. V. 104. P. 1317–1324.
- Maluszynski M., Szarejko I., Barriga P., Balcerzyk A. Heterosis in crop mutant crosses and production of high yielding lines using doubled haploid systems // Euphytica. 2001. V. 120. P. 387–398.
- Oleszczuk S., Rabiza-Swider J., Zimny J., Lukaszewski A.J. Aneuploidy among androgenic progeny of hexaploid triticale (*× Triticosecale* Wittmack) // Plant Cell Rep. 2011. V. 30. P. 575–586.
- Oleszczuk S., Tyrka M., Zimny J. The origin of clones among androgenic regenerants of hexaploid triticale // Euphytica. 2014. V. 198. P. 325–336.
- Pretorius Z.A., Singh R.P., Wagoire W.W., Patne T.S. Detection of virulence to wheat stem rust resistance gene *Sr31* in *Puccinia triticina* f. sp. *tritici* in Uganda // Plant Disease. 2000. V. 84. P. 203.
- Sági L., Barnabás B. Evidence for cytoplasmic control of *in vitro* microspore embryogenesis in the anther culture of wheat (*Triticum aestivum* L.) // Theor. Appl. Genet. 1989. V. 78. P. 867–872.
- Schlegel R., Belchev I., Kostov K., Atanasova M. Inheritance of high anther culture response in hexaploid wheat,

- Triticum aestivum* L. var. 'Svilena' // Bulg. J. Agric. Sci. 2000. No. 6. P. 261–270.
- Shariatpanahi M.E., Belogradova K., Hessamvaziri L., Heberle-Bors E., Touraev A. Efficient embryogenesis and regeneration in freshly isolated and cultured wheat (*Triticum aestivum* L.) microspores without stress pretreatment // Plant Cell Rep. 2006. V. 25. No. 12. P. 1294–1299.
- Sibikeeva Yu.E., Sibikeev S.N. Genetic analysis of anther culture response in wheat carrying alien translocations // Theor. Appl. Genet. 1996. V. 92. P. 782–785.
- Singh N.K., Shepherd K.W., McIntosh R.A. Linkage mapping of genes for resistance to leaf, stem and stripe rust and ω -secalins on the short arm of rye chromosome 1R // Theor. Appl. Genet. 1990. V. 80. P. 609–616.
- Torp A.M., Hansen A.L., Andersen S.B. Chromosomal regions associated with green plants regeneration in wheat (*Triticum aestivum* L.) anther culture // Euphytica. 2001. V. 119. P. 377–387.
- Tsunewaki K. Plasmon analysis as the counterpart of genome analysis // Methods of Genome Analysis in Plant / Ed. P.P. Jauhar. Boca Raton, N.Y.: a.o. CRC Press, 1996. P. 271–299.
- Zhang X.Q., Wang X.P., Ross K., Hu H., Gustafson J.P. Rapid introduction of disease resistance from rye into common wheat by anther culture of a 6x triticales \times nulli-tetrasomic wheat // Plant Breeding. 2001. V. 120. P. 39–42.

**ANDROGENESIS ABILITY IN COMMON WHEAT EUPLASMIC LINES
AND ALLOPLASMIC RECOMBINANT LINES (*H. VULGARE*)-*T. AESTIVUM*
POSSESSING 1RS.1BL AND 7DL-7Ai TRANSLOCATIONS
AND PRODUCTION OF DOUBLE HAPLOID LINES**

**T.S. Osadchaya¹, L.A. Pershina^{1,2}, N.V. Trubacheeva¹,
I.A. Belan³, L.P. Rosseeva³, E.P. Devyatkina¹**

¹ Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia, e-mail: pershina@bionet.nsc.ru;

² Novosibirsk National Research State University, Novosibirsk, Russia,
Cytology and Genetics Department;

³ Siberian Agricultural Research Institute Siberian Branch of the Russian Academy
of Agricultural Sciences, Omsk, Russia

Summary

Androgenesis ability was studied in anther cultures of euplasmic lines of common wheat and alloplasmic recombinant lines (*H. vulgare*)-*T. aestivum* with 1RS.1BL and 7DL-7Ai translocations. The ability to produce androgenic structures and plantlet regeneration are suppressed in lines carrying both translocations. Alloplasmic recombinant lines (*H. vulgare*)-*T. aestivum* with 1RS.1BL and 7DL-7Ai translocations, as well as alloplasmic lines with 1RS.1BL translocation, are characterized by increased ability to create androgenic structures, including polyembryos, and plantlet regeneration as compared to euplasmic lines. The inducing reciprocal influence of barley cytoplasm and rye chromosome 1RS on the androgenesis ability of lines (*H. vulgare*)-*T. aestivum* with 1RS.1BL and 7DL-7Ai translocations is discussed. Double haploid lines were developed from androgenic plants with spontaneously doubled chromosome numbers and restored fertility. Of the lines carrying the translocations, the most promising with regard to the manifestation of commercially valuable traits and resistance to diseases were selected in order to utilize them in breeding programs.

Key words: anther culture, androgenesis, alloplasmic lines (*H. vulgare*)-*T. aestivum*, 1RS.1BL and 7DL-7Ai translocations.