

УДК 631 527.41:631.11: 633.14

## ИЗУЧЕНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ АНДРОГЕНЕЗА В КУЛЬТУРЕ ПЫЛЬНИКОВ СОРТОВ И ПЕРСПЕКТИВНОЙ ФОРМЫ ЯРОВОЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ ЗАПАДНОСИБИРСКОЙ СЕЛЕКЦИИ, РАЗЛИЧАЮЩИХСЯ НАЛИЧИЕМ ИЛИ ОТСУТСТВИЕМ ПШЕНИЧНО-ЧУЖЕРОДНЫХ ТРАНСЛОКАЦИЙ

© 2013 г. Л.А. Першина<sup>1,2</sup>, Т.С. Осадчая<sup>1</sup>,  
Е.Д. Бадаева<sup>3</sup>, И.А. Белан<sup>4</sup>, Л.П. Россеева<sup>4</sup>

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

<sup>2</sup> Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия;

<sup>3</sup> Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, Россия;

<sup>4</sup> Сибирский научно-исследовательский институт сельского хозяйства Россельхозакадемии, Омск, Россия

Поступила в редакцию 26 февраля 2013 г. Принята к публикации 6 марта 2013 г.

Изучены особенности андрогенеза при культивировании пыльников у 8 сортов и перспективной формы яровой мягкой пшеницы, созданных в Западной Сибири (СибНИИСХ Россельхозакадемии, г. Омск). Изученные сорта близки по происхождению, но отличаются между собой наличием или отсутствием пшенично-чужеродных транслокаций (пшенично-ржаной 1RS.1BL и пшенично-пырейной 7DL-7Ai). Перспективная форма Л-311/00-22 несет транслокацию 1RS.1BL и цитоплазму культурного ячменя *Hordeum vulgare* L. Основная цель работы – определить методические возможности для получения дигаплоидных линий у изученных генотипов, несущих пшенично-чужеродные транслокации. Выявлена неодинаковая реакция на условия культивирования пыльников разных сортов в зависимости от концентрации в инициальной среде 2.4-Д. Оптимальными оказались условия для реализации андрогенеза и получения дигаплоидных линий у формы Л-311/00-22. Обсуждается зависимость влияния чужеродно-пшеничных транслокаций на особенности андрогенеза от генотипической среды пшеницы.

**Ключевые слова:** культура пыльников, особенности андрогенеза, транслокации 1RS.1BL, 7DL-7Ai, дигаплоидные линии.

### ВВЕДЕНИЕ

Один из подходов к увеличению генетического разнообразия мягкой пшеницы с целью улучшения ее хозяйственно ценных и адаптивных признаков основан на интрогрессии в ее геном чужеродного генетического материала с кластерами генов, определяющими проявление этих признаков, от других культурных злаков и

дикорастущих сородичей (Friebe *et al.*, 1996; Ji *et al.*, 2012). Полученные таким образом генотипы могут продолжительное время использоваться в качестве доноров этих генов при создании большого разнообразия сортов мягкой пшеницы (Rabinovich, 1998). Интерес представляют сорта и перспективные формы яровой мягкой пшеницы, созданные в Западной Сибири, которые несут чужеродный генетический материал

и характеризуются сочетанием хозяйственно ценных признаков с устойчивостью к грибным патогенам. Эти сорта и формы, как правило, гетерогенные и проявляют полиморфизм по ряду морфологических и физиологических признаков (Белан и др., 2010, 2012; Лайкова и др., 2013). Чтобы повысить эффективность их дальнейшего использования в селекционном процессе, необходимо выделить из них отдельные линии, а после отбора в работу включить наиболее ценные линии.

С этой целью, как правило, используют два подхода: формируют линии от отдельных зерен, отобранных из элитных растений, – метод «single seed descent» (SSD) (Thiemt, Oettler, 2008) или получают дигаплоидные линии, сформированные на основе гаплоидных растений с удвоенным числом хромосом, которые по сути являются гомозиготными (Barnabas *et al.*, 2001; Сибикеева и др., 2004). У гомозиготных организмов действие рецессивных генов проявляется наряду с доминантными, поэтому при работе с ними значительно сокращается время отбора нужных генотипов (Kasha, Maluszynsky, 2003). Кроме того, получение гомозиготных линий – это способ фиксации в одном генотипе сочетания серии целевых генов, перенесенных от разных родителей (пирамидирования генов), что дает возможность создания «идеальных» генотипов (Servin *et al.*, 2004; Ye, Smith, 2008), например с долговременной устойчивостью к биотическим факторам (Joshi, Nayak, 2010) или закрепленным гетерозисом (Maluszynski *et al.*, 2001).

Для получения дигаплоидных линий используют методы культивирования пыльников (Barnabas *et al.*, 2001), изолированных микроспор (Oleszczuk *et al.*, 2004), завязей и семян (Dunwell, 1986), скрещивания с гаплопродюсерами (Guzy-Wröbelska, Szarenko, 2003). В работах с мягкой пшеницей и ее гибридами наиболее часто используют методы культивирования пыльников, предусматривающие создание условий для проявления андрогенеза – развития растений из гаплоидных клеток – микроспор (Hu *et al.*, 1983).

Разделяют три основных этапа андрогенеза *in vitro*: образование эмбриоидов; индукция эмбриоидов к регенерации проростков; развитие зеленых и хлорофилл-дефектных растений

(альбиносов) (Henry, Buysler, 1985). Каждый из этих этапов находится под независимым генетическим контролем как ядерного генома (Agache *et al.*, 1988), так и цитоплазмы (Sági, Barnabás, 1989).

Установлена роль отдельных хромосом в процессе андрогенеза пшеницы. Так, на индукцию эмбриоидов стимулирующее влияние оказывает хромосома пшеницы 4В, а на регенерацию зеленых растений – хромосомы 2А, 2В, 3А, 5В (Torg *et al.*, 2001). Интрогрессия чужеродных хромосом в геном мягкой пшеницы приводит к изменениям в проявлении особенностей андрогенеза. Так, у пшенично-ржаных замещенных линий хромосомы ржи 1R, 3R и 7R оказывают стимулирующее влияние на образование андрогенных эмбриоидов, а хромосома 5R – супрессирующее; хромосома 1R негативно влияет на регенерацию зеленых проростков, а хромосома ржи 3R, напротив, положительно (Добровольская и др., 2001, 2003). Сорта мягкой пшеницы, несущие пшенично-ржаную транслокацию 1RS.1BL, во многих случаях характеризуются повышенной способностью к образованию андрогенных эмбриоидов в культуре пыльников (Henry, Buysler, 1985; Agache *et al.*, 1989; Foroughi-Wehr, Zeller, 1990). Присутствие в геноме мягкой пшеницы пшенично-пырейной транслокации 7DL-7Ai, носителя гена *Lr19*, определяющего устойчивость растений пшеницы к листовой ржавчине, и пшенично-эгилопной транслокации, носителя гена *Lr9*, подавляет процессы образования андрогенных эмбриоидов и регенерации зеленых растений (Sibikeeva, Sibikeev, 1996; Сибикеева и др., 2004).

Эффективность метода культивирования пыльников в конечном счете определяется тем, насколько много будет получено необходимых для дальнейшей работы дигаплоидных линий (Oleszczuk *et al.*, 2011), что в свою очередь зависит от частоты образования зеленых растений со спонтанно или индуцированно (в результате обработки колхицином) удвоенным числом хромосом. На результативность андрогенеза оказывают влияние условия выращивания исходных растений и методы предобработки пыльников (Hu *et al.*, 1983). Однако определяющим является влияние генотипа на способность пыльников к андрогенезу в условиях оптимизации состава индукционной среды (Tersi *et al.*, 2006).

В настоящей работе была поставлена задача изучить особенности андрогенеза при культивировании пыльников у сортов яровой мягкой пшеницы западносибирской селекции, близких по происхождению, но различающихся наличием или отсутствием пшенично-чужеродных транслокаций, и определить методические возможности для получения дигамплоидных линий у сортов и перспективной формы, имеющих такие транслокации.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве исходного материала использовано 8 сортов яровой мягкой пшеницы (Омская 20, Омская 29, Омская 30, Омская 33, Омская 35, Омская 37, Омская 38, Казанская Юбилейная) и перспективная форма Л-311/00-22. Включенные в работу сорта являются близкими по происхождению (Трубачеева и др., 2011). Так, сорт Омская 20, происхождение которого (Скала × Саратовская 36) × (Грекум 114 × Кавказ) входит в родословную других изученных сортов, кроме сорта Омская 29 (табл. 1). При создании сорта Омская 29 была использована сестринская линия сорта Омская 20. Сорта Омская 29, Омская 37, Омская 38 являются носителями пшенично-ржаной транслокации 1RS.1BL (Трубачеева и др., 2011), унаследованной от сорта Кавказ. Кроме того, у сестринских по происхождению сортов, среднепозднего сорта

Омская 37 и среднеспелого сорта Омская 38, помимо пшенично-ржаной транслокации 1RS.1BL, присутствует и пшенично-пырейная транслокация 7DL-7Ai (Белан и др., 2010; Belan *et al.*, 2012).

Перспективная форма Л-311/00-22 имеет происхождение: (аллоплазматическая дигамплоидная линия Л-17Д) × (Lai3302 × Дружина). Линия Л-17Д получена в результате культивирования пыльников аллоплазматической рекомбинантной линии Л-17 (Першина и др., 1999а), сформированной на основе растения, выделенного среди беккроссных потомков ВС<sub>3</sub>-поколения ячменно-пшеничного гибрида *H. vulgare* L. ( $2n = 14$ ) (сорт Неполегающий) × *T. aestivum* L. ( $2n = 42$ ) (сорт Саратовская 29). При беккроссировании ячменно-пшеничного гибрида в качестве рекуррентных родителей были использованы сорта яровой мягкой пшеницы Мироновская 808 (дважды) и Саратовская 29 (Perishina *et al.*, 1998; Першина и др., 1999б). Ранее на основании изучения генов, определяющих устойчивость формы Л-311/00-22 к патогенам бурой ржавчины, предположили, что в геноме этой формы присутствует пшенично-ржаная транслокация (Е.И. Гультеяева. Личн. сообщ.). Это предположение было подтверждено с применением С-окрашивания хромосом в соответствии с методикой (Badaeva *et al.*, 1994); пшенично-ржаная транслокация была идентифицирована как 1RS.1BL (рис. 1).

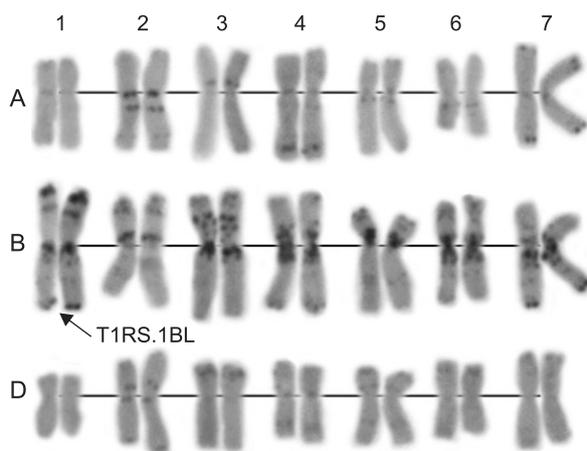
Таблица 1

Родословные сортов яровой мягкой пшеницы, созданных в СибНИИСХ СО РАСХН с привлечением сорта озимой пшеницы Кавказ

Сорта	Родословные сортов
<b>Омская 20</b>	Скала / Саратовская 36 /3/ Грекум 114 // Кавказ
Омская 29	(Дружина // Грекум 114) / Кавказ /4/ (Скала / Саратовская 36 /3/ Грекум 114 // Кавказ)*
Омская 30	<b>Омская 20</b> /3/ Дружина // Грекум 114 / Кавказ
Омская 33	<b>Омская 20</b> /3/ Дружина // Грекум 114 / Кавказ /4/ Омская 28
Омская 35	Омская 29 / Омская 30 = Омская 29 / <b>Омская 20</b> /3/ Дружина // Грекум 114 / Кавказ
Омская 37	Кавказ / Грекум 114 // Венец /3/ Бургас /4/ Тайфун /5/ <b>Омская 20</b> / Омская 24
Омская 38	Кавказ / Грекум 114 // Венец /3/ Бургас /4/ Тайфун /5/ <b>Омская 20</b> / Омская 24
Казанская Юбилейная	<b>Омская 20</b> /3/ Дружина // Грекум 114 / Кавказ /4/ Лютесценс 3/88-6

Примечание. / – первое скрещивание; // – второе скрещивание; номера всех последующих скрещиваний обозначены цифрами, заключенными в //.

\* В скобках приведено происхождение сестринской линии сорта мягкой пшеницы Омская 20.



**Рис. 1.** Результат С-окрашивания хромосом формы Л-311/00-22.

1–7 – гомеологические группы; А, В, D – геномы. Стрелкой указана пшенично-ржаная транслокация T1RS.1BL.

Исходные растения для культивирования пыльников выращивали в гидропонной теплице. По достижении микроспорами одноядерной стадии колосья из первых побегов срезали и помещали на 5–8 суток в холодильную камеру при  $t = 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ . В асептических условиях колосья обрабатывали 98° спиртом. Пыльники вычленили из 8–10 колосков средней части колоса. Вычлененные пыльники помещали на агаризованную картофельную среду РП (Chuang *et al.*, 1978) без регуляторов роста и с разным содержанием 2,4-Д (0,5, 0,75, 1,0 мг/л). В качестве источника углеводов использовали сахарозу (90 г/л). Агар Vasto Difco брали в концентрации 8 г/л. После пересадки пыльники культивировали в темноте при  $t = 29\text{ }^{\circ}\text{C}$ , а с появлением первых эмбрио-подобных структур – при  $t = 24\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Эмбриоподобные структуры (ЭС), достигшие в диаметре примерно 1 мм, переносили на среду Гамборга (B5) (Gamborg, Eveleigh, 1968) без фитогормонов и культивировали при  $t = 24\text{ }^{\circ}\text{C}$  и непрерывном освещении. Развившиеся зеленые проростки на стадии трех листьев высаживали в вегетационные сосуды, наполненные мелким керамзитом, и прикрывали стаканами для поддержания влажности. В течение трех недель проростки подкармливали жидкой средой Гамборга B5, наполовину разбавленной водой.

Особенности андрогенеза оценивали по частоте пыльников, образовавших ЭС; частоте

образования ЭС; частоте образования всех и зеленых проростков к 100 культивированным пыльникам; частоте зеленых растений со спонтанным удвоением числа хромосом к общему числу образовавшихся проростков. Число хромосом у зеленых растений-регенерантов определяли по ранее описанному методу (Першина и др., 1999б). Полученные данные обрабатывали статистически (Лакин, 1980).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Особенности андрогенеза у сортов яровой мягкой пшеницы, не имеющих чужеродного генетического материала (табл. 1), и близкого к ним по происхождению сорта Омская 29, носителя транслокации 1RS.1BL (табл. 2), изучали при культивировании пыльников на среде РП с разным содержанием 2,4-Д. Появление первых эмбриоподобных структур (ЭС) отмечали через 19–21 день с начала культивирования независимо от концентрации 2,4-Д в инициальной среде и сорта пшеницы. К ЭС относили плотные или слегка прозрачные, хорошо различимые структуры (рис. 2).

Как следует из приведенных данных, все сорта проявили способность к образованию ЭС независимо от содержания 2,4-Д в среде. Однако оценка частоты продуктивных, т. е. образовавших ЭС пыльников показывает неодинаковую реакцию разных сортов на условия культивирования пыльников в зависимости от концентрации 2,4-Д. Так, у сортов Омская 33 и Омская 35 изменение концентрации 2,4-Д в инициальной среде существенно не влияло на изменение частоты продуктивных пыльников. У сортов Омская 30 и Казанская Юбилейная частота продуктивных пыльников достоверно увеличивалась на среде с повышением содержания 2,4-Д (начиная с 0,75 мг/л и 0,5 мг/л соответственно). У сорта Омская 20, напротив, с увеличением концентрации 2,4-Д до 1 мг/л отмечалось достоверное снижение частоты продуктивных пыльников. Среда, не содержащая 2,4-Д, как и среды с добавлением 0,5 и 0,75 мг/л 2,4-Д, были одинаково эффективными для культивирования пыльников сорта Омская 20. Сравнение средних значений частоты продуктивных пыльников показало, что лучшая реакция на условия культивирования среди сортов, не содержащих чужеродного гене-

Таблица 2

Результаты культивирования пыльников сортов яровой мягкой пшеницы, не содержащих чужеродный генетический материал, на среде Р-II с разной концентрацией 2,4-Д

Генотип	Содержание в среде 2,4-Д (мг/л)	Число культивируемых пыльников	Продуктивные пыльники#		ЭС#		Всего проростков&		Зеленые проростки#	
			Число	Частота, %	Число	Частота, %	Число	Частота, %	Число	Частота, %
Омская 20	0	225	36	16,0 a	191	84,8 a	14		3	1,3
	0,5	260	37	14,2 a	135	51,9 c	8		0	–
	0,75	299	41	13,7 a	199	66,5 b	8		0	–
	1,0	102	6	5,8 b	37	36,2 d	0		–	
<b>Всего</b>		<b>886</b>	<b>120</b>	<b>13,5</b>	<b>562</b>	<b>63,4</b>	<b>30</b>	<b>5,3</b>	<b>3</b>	<b>0,3</b>
Омская 30	0	223	11	4,9 b	87	39,0 b	1		0	–
	0,5	112	5	4,4 b	24	21,4 c	3		0	–
	0,75	155	18	11,6 a	54	34,8 b	1		0	–
	1,0	153	16	10,4 a	101	66,0 a	3		3	1,9
<b>Всего</b>		<b>643</b>	<b>50</b>	<b>7,7***</b>	<b>266</b>	<b>41,3***</b>	<b>8</b>	<b>3,0</b>	<b>3</b>	<b>0,4</b>
Омская 33	0	386	20	5,1 a	40	10,3 a	1		0	–
	0,5	142	6	4,2 a	19	13,3 a	1		0	–
	0,75	217	10	4,6 a	15	6,9 b	0		–	–
	1,0	198	11	5,5 a	22	11,1 a	0		–	–
<b>Всего</b>		<b>943</b>	<b>47</b>	<b>4,9***/**</b>	<b>96</b>	<b>10,1***/**</b>	<b>2</b>	<b>2,0</b>	<b>0</b>	
Омская 35	0	284	20	7,0 a	38	13,3 b	2		0	
	0,5	136	8	5,8 a	20	14,7 b	0		–	
	0,75	345	32	9,2 a	105	30,4 a	3		0	
	1,0	157	9	5,7 a	30	19,1 b	0		–	
<b>Всего</b>		<b>922</b>	<b>69</b>	<b>7,4***</b>	<b>193</b>	<b>20,9***</b>	<b>5</b>	<b>2,5</b>	<b>0</b>	
Казанская юбилейная	0	185	10	5,4 b	45	24,3 bc	7		0	–
	0,5	158	21	13,3 a	108	68,3 a	5		0	–
	0,75	205	30	14,6 a	69	33,6 b	3		1	0,5
	1,0	271	32	11,8 a	52	19,1 c	3		1	0,4
<b>Всего</b>		<b>819</b>	<b>93</b>	<b>11,3</b>	<b>274</b>	<b>33,4***</b>	<b>18</b>	<b>6,5</b>	<b>2</b>	<b>0,2</b>

Примечание. ЭС – эмбриоподобные структуры. Значения, отмеченные одинаковыми латинскими буквами в отдельных колонках для каждого генотипа, значимо не различаются ( $p < 0,05$ ). Разница по сравнению со значениями сорта Омская 20 достоверна при \*\*\*  $p < 0,001$ . Разница по сравнению со значениями сорта Омская 35 достоверна при /\*/  $p < 0,05$  и /\*\*\*/  $p < 0,001$ . # к 100 культивированным пыльникам. & к числу ЭС.

тического материала, была у сортов Омская 20 и Казанская Юбилейная (значения этих показателей составили соответственно 13,5 и 11,3 %). Сорт Омская 20 достоверно превосходит другие сорта и по частоте образования эмбриоподобных структур (ЭС) (табл. 2). При этом наибольшее значение этого показателя (84,8 %) у сорта Ом-

ская 20 отмечалось при культивировании пыльников на среде, не содержащей 2,4-Д.

Проведено сравнение особенностей андрогенеза в культуре пыльников сорта Омская 20 с сортом Омская 29, который является носителем пшенично-ржаной транслокации 1RS.1BL. Выявлено, что средний показатель частоты продук-

Таблица 3

Результаты культивирования пыльников сортов яровой мягкой пшеницы и перспективной формы Л-311/00-22, несущих пшенично-чужеродные транслокации, на среде Р-II с разной концентрацией 2,4-Д

Генотип	Содержание в среде 2,4-Д (мг/л)	Число культивируемых пыльников	Продуктивные пыльники#		ЭС#		Всего проростков&		Зеленые проростки#	
			Число	Частота, %	Число	Частота, %	Число	Частота, %	Число	Частота, %
Омская 29	0	301	22	7,3 a	101	33,5 a	18	17,8 b	1	0,3 a
	0,5	170	11	6,4 a	79	46,4 b	2	2,5 a	1	0,5 a
	0,75	897	110	12,2 b***	471	52,5 b***	137	29,0 c***	36	4,0 b***
	1,0	318	51	16,0 b	101	31,7 a	8	7,9 a	2	0,6 a
<b>Всего</b>		<b>1686</b>	<b>194</b>	<b>11,5</b>	<b>752</b>	<b>44,6/****/</b>	<b>165</b>	<b>21,9/****/</b>	<b>40</b>	<b>2,3/****/</b>
Омская 37	0	307	13	4,2 a	28	9,1 a****\	0	–	–	–
	0,75	1513	193	12,7 b***	393	29,9 b***	203	51,6***	66	4,3***
Омская 38	0	267	10	3,7 a*\	5	1,8 a****\	0	–	–	–
	0,75	1048	59	5,6 a***(***)	109	10,4***(***)	18	16,5***(***)	0	–
Л-311/00-22	0	185	5	2,7 a**\	20	10,8 a****\	0	–	–	–
	0,75	1223	209	17,1 b	960	78,4 b	685	71,3	198	16,1

Примечание. ЭС – эмбриоподобные структуры. Значения, отмеченные одинаковыми латинскими буквами в отдельных колонках для каждого отдельного генотипа, значимо не различаются ( $p < 0,05$ ). Разница по сравнению с формой Л-311/00-22 достоверна при \*\*\*  $p < 0,001$ , по сравнению с сортом Омская 37 достоверна при (\*\*\*)  $p < 0,001$ , по сравнению с сортом Омская 20 (см. табл. 2) достоверна при \*\*\*\*/  $p < 0,001$ , по сравнению с сортом Омская 29 достоверна при \*\  $p < 0,05$ , \*\*\  $p < 0,01$  и \*\*\*\*\  $p < 0,001$ . # к 100 культивированным пыльникам. & к числу ЭС.

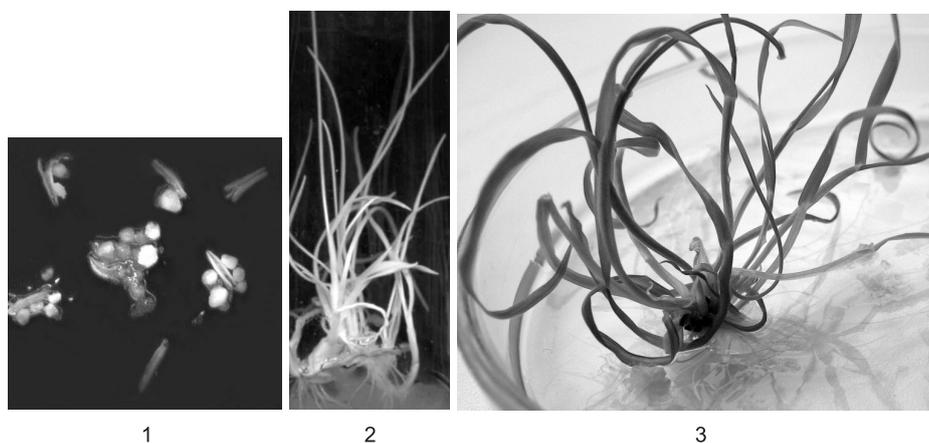


Рис. 2. Эмбриоподобные структуры, образовавшиеся при культивировании пыльников (1), хлорофилл-дефектные проростки (2) и нормальные проростки (3), развившиеся в результате культивирования эмбриоподобных структур.

тивных пыльников у сорта Омская 29 (11,5 %) (табл. 3) достоверно не отличается от значения этого показателя у сорта Омская 20 (13,5 %), а частота образования ЭС у сорта Омская 29 (44,6%) достоверно ниже, чем у сорта Омская 20

(63,4 %). Можно предположить, что генотипическая среда сорта Омская 29 не способствовала стимулирующему влиянию пшенично-ржаной транслокации 1RS.1BL на образование андрогенных эмбриоидов в культуре пыльников, как

это было отмечено у многих ранее изученных сортов мягкой пшеницы – носителей этой же транслокации (Henry, Buysen, 1985; Agache *et al.*, 1989; Foroughi-Wehr, Zeller, 1990).

Что касается регенерационной способности эмбриоподобных структур (ЭС), охарактеризованной по частоте образования всех проростков (зеленых и альбиносов) (рис. 2), то у всех сортов, не имеющих чужеродного генетического материала, включая и сорт Омская 20, значения этого показателя были достоверно ниже, чем у сорта Омская 29 (табл. 2, 3).

У сорта Омская 29 частота продуктивных пыльников была наиболее высокой при культивировании на средах с 0,75 мг/л и 1,0 мг/л 2,4-Д. Однако, если судить по таким показателям андрогенеза, как частота образования ЭС и частота образования всех и зеленых проростков, то следует, что для сорта Омская 29 оптимальной является инициальная среда, содержащая 0,75 мг/л 2,4-Д (табл. 3). Таким образом, в результате проведения этой части работы для сорта Омская 29, носителя пшенично-ржаной транслокации, оптимизированы условия культивирования для получения зеленых растений.

При культивировании пыльников сортов яровой мягкой пшеницы Омская 37 и Омская 38 и формы Л-311/00-22 – носителей пшенично-чужеродных транслокаций использовали два состава индукционной среды – безгормональную и с добавлением 0,75 мг/л 2,4-Д. Установлено, что инициальная среда, не содержащая 2,4-Д, не является эффективной для индукции эмбриоподобных структур из пыльников у этих генотипов по сравнению с сортом Омская 29 (табл. 3). Более того, те немногочисленные ЭС структуры, которые образовались на среде без 2,4-Д у сортов Омская 37 и Омская 38 и формы Л-311/00-22 в отличие от сорта Омская 29 не проявили способности к регенерации проростков. Вместе с тем известно, что при культивировании изолированных микроспор тритикале безгормональная инициальная среда наиболее эффективна как для индукции эмбриоидов, так и для регенерации зеленых растений (Pauk *et al.*, 2000).

Благоприятной для культивирования пыльников сортов Омская 37 и Омская 38 и формы Л-311/00-22 оказалась инициальная среда с добавлением 7,5 мг/л 2,4-Д. Вместе с тем обращает на себя внимание разная реакция двух

сестринских сортов яровой мягкой пшеницы, среднепозднего сорта Омская 37 и среднеспелого сорта Омская 38 на условия культивирования пыльников. У сорта Омская 38 все изученные показатели андрогенеза были достоверно ниже, чем у сорта Омская 37, а все регенерировавшие проростки у сорта Омская 38 были хлорофилл-дефектными (альбиносами) (табл. 3). Оба сорта несут по две транслокации – пшенично-ржаную 1RS.1BL и пшенично-пырейную 7DL-7A1. Уже подчеркивалось, что короткое плечо хромосомы 1RS в составе транслокации 1RS.1BL несет гены, стимулирующие образование эмбриодов в культуре пыльников (Henry, Buysen, 1985; Agache *et al.*, 1989; Foroughi-Wehr, Zeller, 1990), а присутствие транслокации 7DL-7A1 в геноме пшеницы приводит к подавлению процессов андрогенеза (Sibikeeva, Sibikeev, 1996; Сибикеева и др., 2004). Учитывая различия, выявленные при изучении особенностей реакции сортов Омская 37 и Омская 38, носителей одних и тех же транслокаций, на условия культивирования пыльников, можно говорить о разной степени влияния генотипической среды у среднепозднего сорта Омская 37 и среднеспелого сорта Омская 38 на проявление признаков андрогенеза.

Известно, что эмбриогенная способность пыльников и регенерационная способность андрогенных эмбриоидов зависят не только от генотипа, но и от условий выращивания растений-доноров. Например, при выращивании растений-доноров в искусственных условиях (теплицы, оранжереи, ростовые камеры, где нарушено освещение) во многих случаях не удавалось индуцировать образование эмбриоидов из пыльников (Жоносарь, 2009) или регенерацию проростков из эмбриоидов (Иванов, 2006). Это наиболее актуально для генотипов, чувствительных к качеству освещения и продолжительности светового дня (Жоносарь, 2009), поскольку при изменении условий освещения в тканях растений происходит нарушение соотношения и уровня эндогенных фитогормонов. В свою очередь, это затрудняет оптимизацию состава культуральных сред за счет введения экзогенных фитогормонов. По-видимому, в нашей работе условия выращивания растений-доноров сорта Омская 38 в теплице явились одной из причин негативной реакции этого сорта на условия культивирования пыльников.

Другая реакция на условия культивирования пыльников отмечена у формы Л-311/00-22, также выращенной в условиях гидропонной теплицы, при использовании инициальной среды, содержащей 0,75 мг/л 2,4-Д (табл. 3). У этой формы наиболее высокими по сравнению с изученными сортами оказались значения всех показателей андрогенеза (частота продуктивных пыльников, частота образования ЭС, регенерационная способность ЭС и частота образования зеленых проростков). В результате культивирования пыльников на среде с 0,75 мг/л 2,4-Д у формы Л-311/00-22 было получено 198 зеленых проростков (16,1 % к числу культивированных пыльников), что достоверно выше, чем у сортов Омская 29 – 40 зеленых проростков (4 %) и Омская 37 – 66 зеленых проростков (4,3 %) (табл. 3). Следует подчеркнуть, что форма Л-311/00-22, несущая пшенично-ржаную транслокацию 1RS.1BL, является аллоплазматической (имеет цитоплазму культурного ячменя) (Першина и др., 1999б). Ранее в наших работах было показано, что пыльники аллоплазматических линий мягкой пшеницы *Hordeum vulgare*-(*Triticum aestivum*) в условиях *in vitro* характеризуются высокой эмбриогенной способностью (Першина и др., 1993, 1999а). Таким образом, у формы Л-311/00-22 имеются два генетических фактора, которые могут оказывать положительное влияние на проявление признаков андрогенеза.

Что касается частоты образования спонтанных дигаметоидов ( $2n = 42$ ), характеризующихся в отличие от стерильных гаплоидов ( $2n = 21$ ) фертильностью, то достоверных различий между значениями этого показателя андрогенеза у сортов Омская 37 и Омская 38 и формы Л-311/00-22 не выявлено. Так, у формы Л-311/00-22 получено 62 фертильных дигаметоидов ( $31,3 \pm 3,2$  %), у сорта Омская 29 – 9 ( $22,5 \pm 6,6$  %), а у сорта Омская 37 – 16 дигаметоидных фертильных растений ( $24,2 \pm 5,2$  %). Можно предположить, что на процесс спонтанного удвоения числа хромосом у андрогенных растений влияние генотипического разнообразия не значительно, как это отмечалось ранее (Першина и др., 1999а; Добровольская и др., 2001).

На основе полученных андрогенных растений формы Л-311/00-22 и сортов Омская 29 и Омская 37, у которых произошло удвоение хромосом, сформированы дигаметоидные линии.

Эти линии включены в работу по изучению проявления хозяйственно ценных и адаптивных признаков, в исследования по изучению передачи пшенично-чужеродных хромосом в процессе андрогенеза и характеристик цитоплазматических геномов после действия стрессовых условий культивирования *in vitro*.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (11-04-00806а; 11-04-00126а); Интеграционной программы СО РАН совместно с СО РАСХН № 60; программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Биологическое разнообразие» № 30.36.

## ЛИТЕРАТУРА

- Белан И.А., Россеева Л.П., Трубочеева Н.В. и др. Особенности хозяйственно ценных признаков линий сорта яровой мягкой пшеницы Омская 37, несущих пшенично-ржаную транслокацию 1RS.1BL // Информ. вестник ВОГиС. 2010. Т. 14. № 4. С. 632–640.
- Белан И.А., Россеева Л.П., Россеев В.М. и др. 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. и др. 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 // Генетика. 2003. Т. 39. № 4. С. 570–574.
- Жоносарь М.В. Оптимизация технологии получения удвоенных гаплоидов мягкой пшеницы, различающихся по генам фотопериодической чувствительности (*Ppd*) и продолжительности яровизации (*Vrd*): Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Одесса, 2009. 20 с.
- Иванов Г.И. Биотехнологические аспекты создания исходного материала для селекции зерновых колосовых культур: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. Краснодар, 2006. 45 с.
- Лайкова Л.И., Белан И.А., Бадаева Е.Д. и др. Создание и изучение сорта яровой мягкой пшеницы «Памяти Майстренко» с интрогрессивной генетической материальной от синтетического гексаплоида *Triticum timopheevii* Zhuk. Ч *Aegilops tauschii* Coss. // Генетика. 2013. Т. 49. № 1. С. 103–112.
- Лакин Г.Ф. Биометрия. М.: Высш. шк., 1980. 294 с.
- Першина Л.А., Белова Л.И., Девяткина Э.П. и др. Эффективность получения гаплоидных растений в культуре пыльников и при отдаленных скрещиваниях злаков //

- Физиология и биохимия культурных растений. 1999а. Т. 31. № 3. С. 196–202.
- Першина Л.А., Нумерова О.М., Белова Л.И. и др. Особенности андрогенеза у мягкой пшеницы межвидовых и межродовых гибридов // Сиб. биол. журнал. 1993. С. 3–8.
- Першина Л.А., Нумерова О.М., Белова Л.И. и др. Восстановление фертильности у беккроссных потомков ячменно-пшеничных гибридов *Hordeum vulgare* L. ( $2n = 14$ ) × *Triticum aestivum* L. ( $2n = 42$ ) в зависимости от генотипов пшеницы, введенных в возвратные скрещивания // Генетика. 1999б. Т. 35. № 2. С. 228–236.
- Сибикеева Ю.Е., Сибикеев С.Н., Крупнов В.А. Влияние *Lr19*-транслокации на андрогенез *in vitro* и наследование устойчивости к листовой ржавчине в популяциях  $DN_3$ -линий и  $F_2$  гибридов мягкой пшеницы // Генетика. 2004. Т. 40. № 9. С. 1224–1228.
- Трубачеева Н.В., Россеева Л.П., Белан И.А. и др. Особенности сортов яровой мягкой пшеницы Западной Сибири, несущих пшенично-ржаную транслокацию 1RS.1BL // Генетика. 2011. Т. 47. С. 18–24.
- Agache S., Bacheller B., Buysse J. *et al.* Genetic control of anther culture response in wheat using aneuploid, chromosome substitution and translocation lines // Theor. Appl. Genet. 1989. V. 77. P. 7–11.
- Agache S., Buysse J., Snape J. Studies of the genetic relationship between anther culture and somatic tissue culture abilities in wheat // Plant Breed. 1988. V. 100. P. 26–33.
- Badaeva E.D., Badaev N.S., Gill B.S., Filatenko A.A. Intraspecific karyotype divergence in *Triticum araraticum* // Plant Syst. Evol. 1994. V. 192. No. 1. P. 117–145.
- 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., Rosseeva L.P., Rosseev V.M. *et al.* Using of alien genetic material in spring bread wheat breeding in Western Siberia // Eur. Cereals Genet. Co-op. Newslett. 2012. P. 113–115.
- Chuang C.C., Ouyang J.W., Chia H. *et al.* A set of potato media for wheat anther culture // Proc. Symp. Plant Tissue Culture. Peking: Sci. Press., 1978. P. 51–56.
- Dunwell J.M. Pollen, ovule and embryo culture as tools in plant breeding // Plant Tissue Culture and its Agricultural Applications / Eds L.A. Withes, P.G. Alderson. London; Butterworths, 1986. P. 375–404.
- Friebe B., Jiang J., Raupp W.J. *et al.* Characterization of wheat-alien translocations conferring resistance to diseases and pests: current status // Euphytica. 1996. V. 91. P. 59–87.
- Foroughi-Wehr B., Zeller F.J. *In vitro* microspore reaction of different German wheat cultivar // Theor. Appl. Genet. 1990. V. 79. P. 79–80.
- 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.
- Guzy-Wróbelska J., Szarenko I. Molecular and agronomic evaluation of wheat doubled haploid lines obtained through maize pollination and anther culture methods // Plant Breeding. 2003. V. 122. P. 305–313.
- 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.
- Hu D., Tang Y., Yuan Z., Wang J. The induction of pollen sporophytes of winter wheat and the development of the new variety 'Jiughua No 1' // Sci. Agric. Sin. 1983. V. 1. P. 29–35.
- Ji J., Zhang A., Wang Z. *et al.* A wheat-*Thinopyrum ponticum*–rye trigeneric germplasm line with resistance to powdery mildew and stripe rust // Euphytica. 2012. V. 188. P. 199–207.
- Joshi R.K., Nayak S. Gene pyramiding – a broad spectrum technique for developing durable stress resistance in crop // Biotechnol. Mol. Biol. Rev. 2010. V. 5. P. 51–60.
- Kasha K.J., Maluszynski M. Production of doubled haploids in crop plants // Doubled Haploid Production in Crop Plants / Eds M. Maluszynski, K.J. Kasha, B.P. Forster, I. Szarejko. Dordrecht: Kluwer Acad. Publ., 2003. P. 1–4.
- 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., Sowa S., Zimny J. Direct embryogenesis and green plant regeneration from isolated microspores of hexaploid triticale (× *Triticosecale* Wittmack) cv. Bogo // Plant Cell Rep. 2004. V. 22. P. 885–893.
- Pauk J., Puolimatka M., Lökök T., Monostori T. *In vitro* androgenesis of triticale in isolated microspore culture // Plant Cell Tissue Organ Cult. 2000. V. 61. P. 221–229.
- Pershina L.A., Numerova O.M., Belova L.I., Devyatkina E.P. Biotechnological and cytogenetic aspects of producing new wheat genotypes using hybrids // Euphytica. 1998. V. 100. No. 1/3. P. 239–244.
- Rabinovich S.V. Importance of wheat-rye translocations for breeding modern cultivar of *Triticum aestivum* L. // Euphytica. 1998. V. 100. P. 323–340.
- 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.
- Servin B., Martin O.C., Mezard M., Hospital F. Toward a theory of marker-assisted pyramiding // Genetics. 2004. V. 168. P. 513–523.
- 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.
- Tersi M., Xynias I.N., Gouli-Vadinoudi E., Roupakias D.G. Anther culture response of  $F_1$  durum × bread wheat hybrids after colchicines // Plant Breed. 2006. V. 125. P. 457–460.
- Thiemt E.M., Oettler G. Agronomic performance of anther-derived haploid and single seed descent lines in crosses between primary and secondary winter triticale // Plant Breed. 2008. V. 127. P. 476–479.
- Torp A.M., Hansen A.L., Andersen S.B. Chromosomal regions associated with green plant regeneration in wheat (*Triticum aestivum* L.) anther culture // Euphytica. 2001. V. 119. P. 377–387.
- Ye G., Smith K.F. Marker-assisted gene pyramiding for inbred lines development: basic principles and practical guidelines // Intern. J. Plant Breed. 2008. V. 2. No. 1. P. 1–10.

**FEATURES OF ANDROGENESIS IN ANTHHER CULTURES OF VARIETIES  
AND A PROMISING ACCESSION OF SPRING COMMON WHEAT BRED  
IN WEST SIBERIA DIFFERING IN THE PRESENCE OR ABSENCE  
OF WHEAT-ALIEN TRANSLOCATIONS**

**L.A. Pershina<sup>1,2</sup>, T.S. Osadchaya<sup>1</sup>, E.D. Badaeva<sup>3</sup>, I.A. Belan<sup>4</sup>, L.P. Rosseeva<sup>4</sup>**

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

<sup>2</sup> Novosibirsk National Research State University, Novosibirsk, Russia;

<sup>3</sup> Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia;

<sup>4</sup> Siberian Research Institute of Agriculture, Russian Academy of Agricultural Sciences, Omsk, Russia

**Summary**

Androgenesis has been studied in anther cultures of eight cultivars and one promising accession of spring common wheat raised in West Siberia (Siberian Research Institute of Agriculture, Omsk, Russia). The varieties are close in origin but vary in the presence or absence of wheat-alien translocations (wheat-rye 1RS.1BL and wheat-couch grass 7DL-7Ai). The promising accession L-311/00-22 bears the 1RS.1BL translocation and the cytoplasm of cultivated barley *Hordeum vulgare* L. The main task of the study is to assess the possibility of obtaining dihaploid lines in the genotypes examined bearing wheat-alien translocations. It has been found that different accessions respond differently to anther culture conditions depending on the concentration of 2,4-D in the initial medium. Accession L-311/00-22 is best for androgenesis experiments and raise of dihaploid lines. The dependence of the effect of the genotypic environment of wheat on the effect of wheat-alien translocation on androgenesis features, is discussed.

**Key words:** anther culture, androgenesis, translocations 1RS.1BL and 7DL-7Ai, doubled haploid lines.