

УДК 57.085.2

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОИСХОЖДЕНИЯ РАСТЕНИЙ-РЕГЕНЕРАНТОВ В КУЛЬТУРЕ ПЫЛЬНИКОВ ЛЬНА

© 2013 г. А.И. Сорока<sup>1</sup>, В.А. Лях<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Институт масличных культур Национальной академии аграрных наук Украины,  
Запорожье, Украина, e-mail: bvryffy@hotmail.com;

<sup>2</sup> Запорожский национальный университет, Запорожье, Украина,  
e-mail: genetika@znu.edu.ua

Поступила в редакцию 27 марта 2013 г. Принята к публикации 14 июня 2013 г.

Изучали возможность прогнозирования плоидности клеток, являющихся источниками растений-регенерантов в культуре пыльников *in vitro*. На примере льна масличного показано, что таким способом может быть проведение анализа популяции растений-регенерантов на наличие расщепления по маркерному признаку с простым генетическим контролем. Если источником происхождения регенерантов являются микроспоры, то в их потомстве наблюдается расщепление по маркерному признаку, совпадающее с расщеплением по этому признаку на уровне гамет. В случае если источником происхождения растений-регенерантов являются спорофитные ткани, то расщепление не наблюдается. Предлагаемый подход может быть применим при культивировании не только пыльников, но и семян, а также на любом виде растений, у которых эти структуры используются для получения удвоенных гаплоидов.

**Ключевые слова:** плоидность, культура пыльников, удвоенный гаплоид, расщепление, маркерный признак, лен масличный.

### ВВЕДЕНИЕ

Такой биотехнологический прием, как культура пыльников, уже давно и успешно используется для получения константного генетического материала (Ницше, Венцель, 1980). При этом создание линий на базе гибридов  $F_1$  с применением биотехнологии достигается в течение одного поколения, тогда как при традиционной селекции на это уходит обычно 4–6 лет. Культура пыльников нашла применение и для получения удвоенных гаплоидов льна, который является важной культурой во многих странах с умеренным климатом и возделывается как для получения натуральных волокон, так и для производства льняного масла (Bergmann, Friedt, 1997; Поляков, 1998).

При получении дигаплоидных линий в культуре пыльников, независимо от изучаемого объекта, важно знать плоидность клеток, являющихся источником их происхождения. Появляющиеся на пыльниках новообразования либо

в виде каллуса, либо в виде эмбриоидов могут образовываться как из гаметофитной ткани, так и из спорофитной (Ницше, Венцель, 1980; Rajender, Vaidyanath, 1999). Новообразования, полученные из спорофитной ткани, не представляют практического интереса в плане создания дигаплоидных линий, поскольку повторяют генетические свойства исходного родителя. При получении регенерантов в культуре пыльников важны растения, ведущие происхождение от гаплоидных структур (микроспор), поскольку именно они являются генетически уникальными и в случае удвоения набора хромосом обладают полной гомозиготностью.

В настоящее время путей определения плоидности растений, получаемых при культивировании пыльников, значительно больше, чем способов выявления плоидности клеток, являющихся источником новообразований и получаемых из них растений. Для установления плоидности растений-регенерантов используют как прямые, так и косвенные методы. В первом

случае непосредственно подсчитывают количество хромосом на метафазных пластинках (Ницше, Венцель, 1980; Паушева, 1988) или определяют количество ДНК в клетках на соответствующем оборудовании (Bohanec, 2003; Claveria *et al.*, 2005), а во втором – используют различные характеристики клеток, тканей и растения в целом, тесно коррелирующие с плоидностью растительного организма. К таковым относят количество хлоропластов в замыкающих клетках устьиц и в клетках основных тканей (Qin, Rotino, 1995; Давыдова, 2008), размер клеток тканей, а также их количество на единицу площади (Котлярова, 2010; Сорока, 2013), морфологию цветка и целого растения (Муравлев, Кривошеева, 1999; Малецкая и др., 2009), размер семян и зародышей (Bouvier *et al.*, 1992; Kita *et al.*, 2001), флотацию в растворе соляной кислоты или в культуральной среде (Aalders, 1958; Lotfi, Salehi, 2008).

Отчасти вышеперечисленные методы оценки плоидности растений-регенерантов могут быть использованы и для выяснения природы клеток, из которых эти растения были получены. Однако однозначный ответ может быть дан лишь в случае гаплоидности растения-регенеранта. Когда же растения, полученные в культуре пыльников, имеют удвоенный набор хромосом, даже метод подсчета количества хромосом в клетках тканей не позволяет выяснить плоидность клетки, давшей начало новообразованию. Это объясняется тем, что часто растения, источником происхождения которых были гаплоидные микроспоры, на момент проведения цитологического анализа уже имеют удвоенный набор хромосом за счет спонтанного удвоения их количества в условиях *in vitro*, и эти растения с помощью такого анализа уже невозможно отличить от растений-регенерантов, инициированных из спорофитных тканей. Например, при культивировании пыльников рапса в определенных условиях лишь 10–15 % растений-регенерантов являются гаплоидами, остальные же растения – уже спонтанные удвоенные гаплоиды (Муравлев, Кривошеева, 1999). Использование же цитологического анализа на самых ранних этапах формирования новообразований ограничено высокой вероятностью их повреждения или гибели из-за малого размера этих структур.

Ограниченность подходов, позволяющих определять плоидность клеток, являющихся источниками растений-регенерантов в культуре пыльников, предполагает поиск других путей решения этого вопроса. Одним из таких путей, по нашему мнению, мог бы быть анализ популяции растений-регенерантов на наличие расщепления по какому-либо маркерному признаку с простым генетическим контролем. Этот подход основывается на том, что регенеранты, развившиеся из спорофитной ткани пыльника, представленной диплоидными клетками, фенотипически не отличаются по маркерному признаку от растения-донора пыльников. В отличие от диплоидной клетки спорофитной ткани микроспора имеет гаплоидный набор хромосом, получая в процессе мейоза лишь по одной из каждой пары гомологичных хромосом. Это приводит к тому, что из разных по генотипу микроспор образуются и разные по генотипу растения-регенеранты. Вследствие этого среди растений-регенерантов наблюдается расщепление по маркерному признаку на несколько классов – два класса растений выявляют в случае детерминирования данного признака одной парой генов, четыре класса – двумя парами генов (при их независимом наследовании) и т. д. Таким образом, если источником происхождения популяции растений-регенерантов являются гаплоидные структуры (микроспоры), то среди данных растений наблюдается расщепление по маркерному признаку, совпадающее с расщеплением по этому признаку на уровне гамет, а в случае если источником происхождения растений-регенерантов являются спорофитные ткани, расщепления не наблюдается.

Целью данной работы являлось изучение возможностей установления плоидности клеток, являющихся источниками растений-регенерантов в культуре пыльников *in vitro*, по анализу расщепления по маркерному признаку в образующейся популяции удвоенных гаплоидов.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве материала для выяснения плоидности клеток, являющихся источниками новообразований в культуре пыльников, использовали гибриды F<sub>1</sub> льна масличного (*Linum humile* Mill.) двух комбинаций скрещивания –

MP485 × Авангард и M12 × M24. Родители гибрида MP485 × Авангард отличались окраской цветка: один из них (линия MP485) характеризовался цветками синей окраски, а другой (линейный сорт Авангард) – белой, рецессивной по отношению к синей. Обе родительские линии гибрида M12 × M24 имели цветки белой окраски. Однако одна и та же окраска этих линий детерминировалась разными (неаллельными) генами с комплементарным типом взаимодействия (Лях, Сорока, 2008).

С целью получения растений-регенерантов пыльники данных гибридов культивировали на искусственной питательной среде LMA-1, модифицированной нами путем увеличения в ней количества сахарозы (Поляков, Пролетова, 1998; Лях, Сорока, 2008). При культивировании пыльников проводили учет новообразований относительно места их появления. Новообразования из нити и связника пыльника доращивали отдельно от новообразований, сформированных из самого пыльника. Соответственно этому образующиеся растения-регенеранты высаживали в почву в виде двух отдельных популяций (популяции № 1 и № 2) по каждому гибриду.

Для определения источника происхождения новообразований (такими источниками могут быть микроспоры или спорофитные ткани пыльника) в культуре *in vitro* пыльников гибридов F<sub>1</sub> использовали анализ генетической структуры популяции полученных растений льна по морфологическому признаку окраски цветка. Этот признак использовался как маркерный, поскольку легко визуально идентифицировался на соответствующей стадии развития растения. Вывод об источнике происхождения новообразований делали на основании наличия или отсутствия расщепления среди растений-регенерантов по изучаемому маркерному признаку.

Для выяснения соответствия расщепления в популяции растений-регенерантов предполагаемому расщеплению на уровне гамет использовали метод  $\chi^2$  (Griffiths, 1996).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При культивировании пыльников обоих гибридов было получено по две популяции (№ 1 и № 2) растений-регенерантов. Популяция № 1 была представлена растениями, развившимися

из новообразований, сформированных из самого пыльника. Популяция № 2 состояла из растений, полученных из новообразований, возникших на месте связника или тычиночной нити.

Одна из родительских линий гибрида F<sub>1</sub> MP485 × Авангард имела белую окраску цветка, тогда как другая характеризовалась синими цветками. Признак белоцветковости, присущий линейному сорту Авангард, был рецессивным и наследовался моногенно в скрещиваниях с синецетковыми генотипами. В силу этого гибридные растения имели синюю окраску цветка, но продуцировали гаметы как с геном синей, так и белой окраски цветка в равном соотношении.

В популяции № 1, полученной при культивировании пыльников данного гибрида, было 24 растения-регенеранта. Эта популяция состояла из 13 синецетковых и 11 белоцветковых растений, т. е. наблюдалось расщепление, близкое к 1 : 1 с высокой вероятностью (табл.). Такое расщепление у гибрида должно происходить и на уровне гамет. Это свидетельствовало о том, что растения проанализированной популяции образованы именно из гаплоидных микроспор, а не из диплоидных клеток спорофитных тканей пыльника.

Результаты анализа всех четырех популяций растений-регенерантов, полученных при культивировании пыльников гибридов F<sub>1</sub> MP485 × Авангард и M12 × M24, приведены в табл.

Популяция растений № 2, полученная в культуре пыльников гибрида MP485 × Авангард, состояла лишь из 17 синецетковых растений, тогда как белоцветковые полностью отсутствовали (табл.). Отсутствие расщепления по признаку окраски цветка свидетельствовало о том, что данная популяция растений-регенерантов была образована из клеток, имеющих спорофитную, то есть диплоидную природу.

Гибрид F<sub>1</sub> M12 × M24 был получен от скрещивания двух мутантных линий с белой окраской цветка. В данном случае окраску цветка контролировали два неаллельных гена (обозначенных *A* и *B*) с комплементарным типом взаимодействия (Лях, Сорока, 2008). Гибридные растения (*AaBb*), полученные от скрещивания этих двух белоцветковых линий (*AAbb* и *aaBB*), характеризовались синей окраской цветка и продуцировали четыре класса гамет в соотношении 1 часть *AB*

Таблица

Расщепление по окраске цветка в популяциях растений-регенерантов льна масличного, полученных при культивировании пыльников гибридов F<sub>1</sub>

Номер популяции	Фенотип родителей		Фенотип гибридов F <sub>1</sub> , у которых взяты пыльники	Соотношение растений-регенерантов по окраске цветка		Модель расщепления
	P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>		синий	белый	
MP485 × Авангард						
1	Синий	Белый	Синий	13	11	1 : 1*
2	Синий	Белый	Синий	17	0	–
M12 × M24						
1	Белый	Белый	Синий	11	27	1 : 3**
2	Белый	Белый	Синий	14	0	–

Примечание.  $\chi^2_{05}$  (df = 1) = 3,84; \* отличия от расщепления 1 : 1 не существенны ( $\chi^2 = 0,17$ ;  $p = 0,68$ ); \*\* отличия от расщепления 1 : 3 не существенны ( $\chi^2 = 0,32$ ;  $p = 0,57$ ).

(растения с синим цветком), 1 часть *Ab* (белый цветок), 1 часть *aB* (белый цветок) и 1 часть *ab* (белый цветок). Схема образования растений-регенерантов из клеток разной ploidy при культивировании пыльников в случае комплементарного взаимодействия генов, детерминирующих маркерный признак, показана на рис. 1 и 2 на примере гибрида F<sub>1</sub> M12 × M24.

Популяция № 1, полученная в результате культивирования пыльников, была представлена 38 растениями-регенерантами, среди

которых было 11 растений с окрашенным цветком и 27 – с белым, т. е. в соотношении, близком к 1 синий : 3 белый. Такое соотношение совпадало с теоретическим расщеплением на уровне гамет. Наличие двух классов фенотипов по окраске цветка в популяции № 1, а также соответствующее соотношение этих фенотипов указывало на то, что источником происхождения растений были именно гаплоидные микроспоры, а не диплоидные клетки спорофитной ткани (табл., рис. 1).

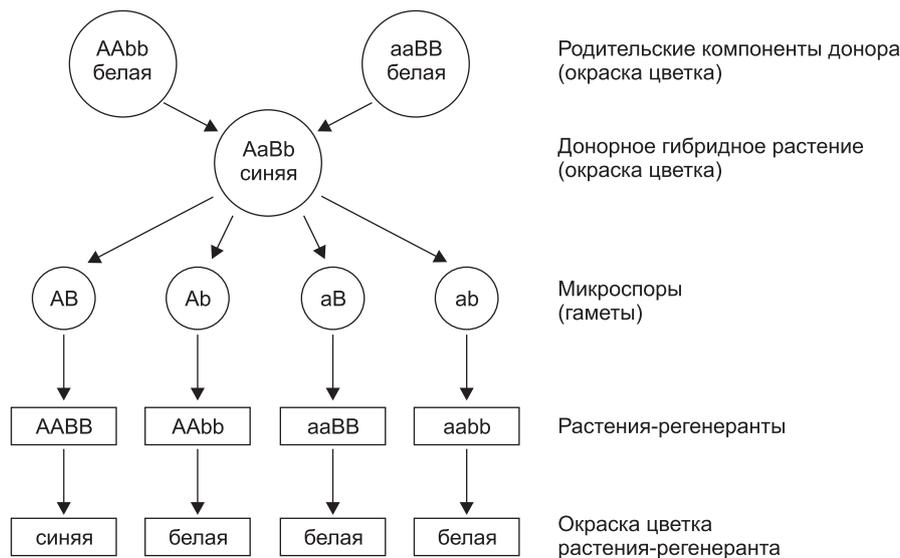


Рис. 1. Схема образования растений-регенерантов из гаплоидных клеток при культивировании пыльников гибрида льна M12 × M24.



**Рис. 2.** Схема образования растений-регенерантов из диплоидных клеток при культивировании пыльников гибрида льна M12 × M24.

Популяция № 2 состояла лишь из синецветковых растений, как это видно из таблицы. Отсутствие расщепления по окраске цветка среди растений-регенерантов говорило о том, что источником их происхождения были диплоидные клетки пыльников (рис. 2).

Необходимо отметить, что часть растений-регенерантов в популяциях № 1 обоих гибридов имела синюю окраску цветка, т. е. была фенотипически схожей с растениями из популяций № 2. Это может наводить на мысль, что данные растения образовались из диплоидных, а не гаплоидных клеток пыльников гибридов. Однако, если в отношении синецветковых растений вероятность их диплоидного происхождения нельзя полностью отрицать, то что касается растений с белой окраской цветка, природа клеток, из которых они инициированы, не вызывает сомнений. В нашем случае в популяциях № 1 гибридов МР485 × Авангард и М12 × М24 соответственно 50 и 75 % растений однозначно происходят из микроспор, а не диплоидных клеток тканей пыльника.

В том случае, если плоидность клетки, давшей начало растению-регенеранту, вызывает сомнение, в нашем примере это синецветковые растения, окончательный вывод может быть сделан по анализу расщепления по маркерному признаку среди потомков этого растения в следующем поколении. При наличии расщепления

растения имеют диплоидную природу происхождения, а при его отсутствии – гаплоидную.

Таким образом, предлагаемый нами подход позволяет с достаточно высокой вероятностью диагностировать происхождение растений-регенерантов в культуре *in vitro*. Очевидно, он может быть применим при культивировании не только пыльников, но и семян, а также на любом виде растений, у которых эти структуры используются для получения удвоенных гаплоидов.

## ЛИТЕРАТУРА

- Давыдова Н.Н. Усовершенствование метода культуры пыльников для использования в селекционном процессе капусты (*Brassica oleracea* L.): Автореф. дис. ... канд. с.-х. наук. М.: Всерос. науч.-исслед. ин-т овощеводства Россельхозакадемии, 2008. 25 с.
- Котлярова О.В. Усовершенствование элементов технологии получения регенерантов для создания удвоенных гаплоидов моркови (*Daucus carota* L.): Автореф. дис. ... канд. с.-х. наук. М.: Всерос. науч.-исслед. ин-т овощеводства Россельхозакадемии, 2010. 26 с.
- Лях В.А., Сорока А.И. Ботанические и цитогенетические особенности видов рода *Linum* L. и биотехнологические пути работы с ними. Запорожье: ЗНУ, 2008. 182 с.
- Малецкая Е.И., Юданова С.С., Малецкий С.И. Гаплоидия в апозиготических семенных потомствах сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) // Докл. АН. 2009. Т. 426. № 5. С. 710–713.
- Муравлев А.А., Кривошеева О.Г. Методические рекомендации по получению андроклиновых растений ярового рапса. М.: Россельхозакадемия, 1999. 23 с.

- Ницше В., Венцель Г. Гаплоиды в селекции растений. М.: Колос, 1980. 128 с.
- Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. М.: Агропромиздат, 1988. 271 с.
- Поляков А.В. Усовершенствование селекционного процесса льна-долгунца (*Linum usitatissimum* L.) на основе использования биотехнологических методов: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. М.: Московская ордена Ленина и ордена Трудового Красного Знамени с.-х. академия им. К.А. Тимирязева, 1998. 50 с.
- Поляков А.В., Пролетова Н.В. Питательная среда для культивирования пыльников льна. Пат. № 2120741. Россия: Всерос. НИИ льна. Бюл. № 30. 1998.
- Сорока А.И. Дифференциация гаплоидных и дигаплоидных растений рапса на цитологическом и морфологическом уровнях // Цитология и генетика. 2013. № 2. С. 34–39.
- Aalders L.E. Monoploidy in cucumbers // J. Hered. 1958. V. 49. P. 41–44.
- Bergmann R., Friedt W. Haploidy and related biotechnological methods in linseed (*Linum usitatissimum* L.) // *In vitro* Haploid Production in Higher Plants / Eds S.M. Jain, S.K. Sopory, R.E. Veilleux. Dordrecht/Boston/London: Kluwer Acad. Publ., 1997. P. 1–16.
- Bohanec B. Ploidy determination using flow cytometry // *Doubled Haploid Production in Crop Plants: A Manual* / Eds M. Maluszynski, K.J. Kasha, B.P. Forster, I. Szarejko. Dordrecht, Netherlands: Kluwer Acad. Publ., 2003. P. 397–403.
- Bouvier L., Chavagnat A., Zhang Y.X., Lespinasse Y. Using radiography to attempt to screen for haploid embryos in apple // *Sci. Hortic.* 1992. V. 52. P. 215–221.
- Claveria E., Garcia-Mas J., Dolcet-Sanjuan R. Optimization of cucumber doubled haploid. Line production using *in vitro* rescue of *in vivo* induced parthenogenic embryos // *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 2005. V. 130. No. 4. P. 555–560.
- Griffiths A.J.F., Miller J.H., Suzuki D.T. *et al.* An Introduction to Genetic Analysis. 6th ed. N.Y.: W.H. Freeman and Co., 1996. 916 p.
- Kita K., Shigematsu Y., Yakushiji H. Triploid and haploid seedlings obtained from small seeds of lemon // *J. Jap. Soc. Hort. Sci.* 2001. V. 70. P. 121.
- Lotfi M., Salehi S. Detection of cucumber parthenogenic haploid embryos by floating the immature seeds in liquid medium // *Proc. of the IXth EUCARPIA Meeting on Genetics and Breeding of Cucurbitaceae* / Ed. M. Pitrat. Avignon, France: INRA, 2008. P. 375–379.
- Qin X., Rotino G.L. Chloroplast number in guard cells as ploidy indicator of *in vitro*-grown androgenic pepper plantlets // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 1995. V. 41. No. 2. P. 145–149.
- Rajender Rao K., Vaidyanath K. Biotechnology and improvement of sesamum // *Plant Tissue Culture and Biotechnology – Emerging Trends* / Ed. P.B. Kavi Kishor. Hyderabad, India: University Press/Orient Logman Ltd, 1999. P. 37–46.

## DETERMINATION OF THE ORIGIN OF REGENERATED FLAX PLANTS IN ANTHER CULTURE

A.I. Soroka<sup>1</sup>, V.A. Lyakh<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Institute of Oilseed Crops, National Academy of Agricultural Sciences of Ukraine, Zaporozhye, Ukraine, e-mail: bvryffy@hotmail.com;

<sup>2</sup> Zaporozhye National University, Zaporozhye, Ukraine, e-mail: genetika@znu.edu.ua

### Summary

The possibility to diagnose the ploidy of cells producing regenerated plants *in vitro* in anther culture has been studied. It is shown by the example of oil flax that population analysis of regenerated plants for segregation on the basis of a marker trait with a simple genetic control can serve as such a method. When microspores are the source of regenerants, segregation of regenerants for a marker that coincides with the segregation at the gamete level is observed. If sporophytic tissues are the source for regenerated plants, there is no segregation. The proposed approach can be applied not only to anther cultures but also to ovule cultures, as well as to any plant species where relevant structures are used to obtain doubled haploids.

**Key words:** ploidy, anther culture, doubled haploid, segregation, marker trait, oil flax.