

УДК 633.111:631.527.8:581.143.6

И.В. Голованова

I.V. Golovanova

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ГАПЛОИДИЯ У МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ *TRITICUM AESTIVUM* L.

### EXPERIMENTAL HAPLOIDY IN COMMON WHEAT *TRITICUM AESTIVUM* L.

Рассмотрена роль гаплоидных растений в селекции и генетических исследованиях. Описаны методы индукции гаплоидов у мягкой пшеницы *T. aestivum* L. При изучении сравнительной эффективности андрогенеза *in vitro* и скрещиваний пшеница x кукуруза показано, что средний выход андрогенных гаплоидов несколько выше, однако гибридизация *T. aestivum* x *Zea mays* позволяет получать зеленые гаплоидные растения от генотипов с низким уровнем реакции в культуре пыльников.

Явление гаплоидии, приводящее к получению растений, имеющих в соматических клетках такое же число хромосом, как в гаметах своего вида ( $n$ ), широко известно у покрытосеменных и привлекает внимание многих исследователей. Первое гаплоидное растение обнаружено Д. Бергнер в 1921 г. у *Datura stramonium*, а через три года А. Блексли и Дж. Беллинг впервые предложили использовать такие растения в селекции (Blakeslee, Belling, 1924). Однако реальное значение для селекции и генетических исследований гаплоиды приобрели только с начала 1970-х годов, когда стали активно разрабатываться методы экспериментальной гаплоидии у различных растений, в том числе у мягкой пшеницы. Применение гаплоидов основано на следующих положениях:

- у гаплоидов каждый ген представлен единственным аллелем, и рецессивные аллели одних генов проявляются наряду с доминантными аллелями других, благодаря этому гаплоидные растения можно успешно использовать в мутационной селекции;
- из гаплоидов можно получать гомозиготные диплоиды путем удвоения хромосом, происходящего спонтанно или после обработки колхицином. Получая линии удвоенных гаплоидов из гибридов ранних поколений, можно сократить селекционный процесс на несколько лет;
- генетическое расщепление у гаплоидов менее сложно, и для выделения определенной комбинации генов нужна сравнительно малочисленная популяция.

Кроме практического, гаплоиды имеют многоплановое использование в исследованиях. Они являются подходящим исходным материалом для создания серий моносомиков, которые широко применяются в цитогенетике растений. В конце 1930-х годов Э. Сирс, скрещивая *Triticum aestivum* L. с *Secale cereale* L., выделил в потомстве этой комбинации два гаплоида, один из которых после опыления пшеничным родителем дал 13 жизнеспособных семян. В их потомстве были получены 16 моносомных и 5 трисомных растений, которые впоследствии были использованы для создания серии анеуплоидных линий сорта 'Chinese Spring' (Sears, 1988). Эта серия положена в основу изучения локализации генов пшеницы, а также разработки методологии переноса в ее геном генов от *Secale*, *Aegilops*, *Agropyron* и других родственных видов.

Гаплоиды используют для стабилизации числа хромосом межвидовых гибридов в случае высокой степени негомологичности хромосом, для получения межвидовых гибридов, устойчивых к неблагоприятным факторам окружающей среды, с привлечением диких видов, а также для передачи генов от полиплоидных видов диплоидным. Кроме того, они служат уникальными моделями для выявления эффектов дозы гена, изучения генетики количественных признаков и явлений самонесовместимости (Лаптев, 1984; Атанасов, 1993). В последние годы гаплоиды широко применяются в исследованиях по генетической трансформации, а также для картирования генов, контролируемых некоторыми важными признаками (Dunwell, 2010).

Спонтанное возникновение гаплоидов у растений наблюдают при естественном внутри- и межвидовом переопылении, фоновом облучении, резких перепадах температуры или под влиянием каких-либо других экстремальных факторов.

Уровень спонтанного возникновения гаплоидов очень низок, поэтому для облегчения их поиска и повышения частоты гаплоидии используют определенные генетические системы. В 1963 г. Х. Кихара и К. Цуневаки обнаружили, что цитоплазма *Aegilops caudata* индуцирует гаплоидию у мягкой пшеницы. Позднее

К. Цуневаки с соавторами установили, что такой способностью обладают цитоплазмы и некоторых других видов эгилопса (например, *A. cotschyi*, *A. variabilis*), индуцируя появление гаплоидов и близнецовых проростков, в основном дипло-гапло типа, у мягкой пшеницы сорта 'Salmon'. 'Salmon' является гексаплоидным производным, обнаруженным в потомстве гибрида F1 между двумя октоплоидными тритикале, и несет транслокацию 1BL/1RS. Совместная передача индуцирующей партеногенез цитоплазмы эгилопса и хромосомы с 1BL/1RS транслокацией от Salmon может превратить обычный сорт мягкой пшеницы в гаплопродюсер, который будет продуцировать гаплоиды с частотой 5–10 % в гетерозиготном состоянии по нормальной 1В и транслоцированной 1BL/1RS хромосоме, или с частотой около 70 % в гомозиготном состоянии по транслоцированной хромосоме. Однако чтобы применять Salmon-метод в гаплоидной селекции, необходимо найти или создать с помощью мутагенеза рецессивный аллель гена-супрессора партеногенеза (*Spg*), который необходим для получения дигаплоидов с мужской фертильностью (Tsunewaki, Mukai, 1990).

Другие методы индуцирования гаплоидов основаны главным образом на стимуляции гаплоидного партеногенеза *in vivo* с применением различных приемов, таких как температурные шоки, обработка фитогормонами, облучение ультрафиолетом или ионизирующей радиацией, опыление пыльцой других видов или родов. Однако эти методы трудоемки и недостаточно эффективны из-за низкого коэффициента выхода гаплоидных растений.

Использование методов культуры тканей может значительно ускорить массовое получение гаплоидов для селекционных целей. Как показали эксперименты на ячмене, пшенице, рисе и других культурах, партеногенез, приводящий к получению гаплоидных растений, может быть индуцирован в культуре завязей и семян до оплодотворения. При этом гаплоидные эмбриониды или каллус образуются из различных элементов зародышевого мешка: из яйцеклетки, из клеток синергид и антипод, претерпевающих многократные деления, либо непосредственно из макроспоры (Dunwell, 1986). Этот метод имеет особое значение у растений с мужской стерильностью, а также с низкой реакцией и высокой долей альбиносов в культуре пыльников, и широко используется у таких культур, как рис, подсолнечник, сахарная свекла. У пшеницы и ее гибридов наибольшее практическое применение имеют индуцированный андрогенез в культуре пыльников и скрещивания с гаплопродюсером.

Явление андрогенеза *in vitro* (согласно другой терминологии, андроклинии) было открыто около 50 лет назад у *Datura innoxia* (Guha, Maheshwari, 1964). Этот биологический феномен состоит в образовании растения из морфогенетически компетентной клетки пыльника, микроспоры, в которой под действием стрессовых факторов происходит переключение программы развития с гаметофитного пути (образование пыльцевого зерна) на принципиально иной спорофитный путь. В процессе культивирования микроспора делится, давая начало биполярной зародышеподобной структуре (эмбриониду), которая развивается в гаплоидное растение-регенерант. Возможен другой процесс – микроспора дает начало каллусу, в котором затем инициируют формирование почек и корней (гемморизогенез). Эмбрионидогенез является более выгодным способом получения гаплоидов *in vitro*, поскольку он предполагает работу с генетически однородным материалом и не требует трудоемкой процедуры пересадок каллусной ткани, которая к тому же не всегда способна к морфогенезу (De Vuysse, Henry, 1986).

Эффективность андрогенеза зависит от многих факторов, таких как условия выращивания исходных растений, методы предобработки и культивирования пыльников, состав культуральных сред (Hu, 1985; Datta, 2005; Dunwell, 2010). Однако определяющее значение имеет генотип исходных растений. Согласно результатам исследований, проведенных с привлечением большого числа сортов и гибридов мягкой пшеницы, порядка 45–70 % изученных генотипов способны к регенерации зеленых растений с частотой 0,4–3,6 % (Andersen et al., 1987; Foroughi-Wehr, Zeller, 1990; Holme et al., 1999).

Альтернативным способом получения гаплоидов пшеницы является отдаленная гибридизация с последующей селективной элиминацией хромосом опылителя, в качестве которого используют луковичный ячмень (*Hordeum bulbosum*) или кукурузу. А. Баркли впервые продемонстрировал возможность использования *H. bulbosum* в качестве гаплопродюсера у мягкой пшеницы. Скрещивая сорт пшеницы 'Chinese Spring' с диплоидным и тетраплоидным *H. bulbosum* в качестве пыльцевого родителя, он получил растения, которые по кариотипу представляли собой гаплоидную пшеницу. Все они имели 21 хромосому независимо от плоидности *H. bulbosum* и не проявляли признаков последнего (Barclay, 1975).

Как показали дальнейшие исследования, способность продуцировать гаплоиды ограничена у многих сортов присутствием доминантных аллелей генов *Kr1* и *Kr2*, контролирующей скрещиваемость пшеницы с рожью и локализованных в хромосомах 5В и 5А соответственно. *Kr*-гены ингибируют рост пыльцевой

трубки ячменя у основания столбика и в проводящей ткани семяпочки (Sitch, Snape, 1987). Анализ сорти-мента *T. aestivum* показал, что 5–7 % сортов определенных эколого-географических групп несут рецессивные *kr*-аллели (Суриков, 1991). Частота завязываемости зерновок у остальных сортов составляет от десятых долей до единиц процентов, поэтому метод «бульбозум» не получил в селекции пшеницы широкого распространения.

Д. Лори и М. Беннет описали явление селективной элиминации хромосом при гибридизации *T. aestivum* x *Zea mays*. Хотя гексаплоидная пшеница и кукуруза отнесены к отдельным подсемействам *Gramineae*, пыльца кукурузы легко прорастает на рыльце пшеницы, оплодотворение происходит в 20–30 % опыленных цветков. Цитологический анализ зигот показал наличие полного гаплоидного набора хромосом каждого из родителей, а все зародыши с четырьмя и более клетками имели микроядра, что свидетельствует о процессе хромосомной элиминации и практически исключает возможность партеногенетического развития яйцеклетки (Laurie, Bennett, 1989). Зародыши в этих скрещиваниях отличаются очень низкой жизнеспособностью, вероятно, из-за отсутствия или ранней дегенерации эндосперма. Гаплоидные растения получают с использованием культуры колосков или завязей, а также при обработке опыленных колосьев раствором 2,4-Д или гиббереллина.

Основное преимущество использования кукурузы в качестве гаплопродюсера по сравнению с *H. bulbosum* заключается в том, что доминантные *Kr*-аллели, определяющие низкую скрещиваемость пшеницы с рожью и *H. bulbosum*, по-видимому, неактивны в отношении кукурузы. По данным многих исследователей, все изученные генотипы мягкой пшеницы продуцируют гаплоидные зародыши с частотой 4,5–20,0 % от числа опыленных цветков, полученные растения являются зелеными гаплоидами (Suenaga et al., 1991; Amrani et al., 1993; Sadasivaiah et al., 1999; Inagaki, 2003).

Цель наших исследований состояла в изучении эффективности методов индукции гаплоидов у мягкой пшеницы. В результате исследований выявлено, что способность к андрогенезу *in vitro* зависит от условий выращивания исходных растений. В целом, выход гаплоидов и воспроизводимость результатов культивирования повышались при выращивании растений в условиях искусственного климата. Однако для генотипов, чувствительных к длине светового дня и качеству освещения, более благоприятными были полевые условия.

Проведена оптимизация питательных сред по составу фитогормонов и углеводов. Снижение концентрации ауксина 2,4-Д до 1,0 мг/л и замена сахарозы глюкозой в индукционной среде способствовали повышению выхода зеленых растений у большинства генотипов. При изучении четырех питательных сред различного минерального состава показано преимущество модифицированной среды Potato-2 по частоте образования эмбрионидов и выходу зеленых растений.

Изучена реакция более 150 сортов и гибридов яровой и озимой мягкой пшеницы и перспективных селекционных линий в культуре пыльников. Все изученные генотипы обладают потенциальной способностью к гаплопродукции, однако их реакция на примененные условия культивирования неодинакова. Высокая частота образования каллусов и эмбрионидов (21,3–73,0 %) наблюдалась у сортов ‘Алтайский простор’, ‘Тулеевская’, ‘Новосибирская 15’, ‘Омская 20’, ‘Жатва Алтай’, селекционной линии ‘Лютесценс 123/С’, устойчивого к бурой ржавчине сортообразца к-54975 (США). При культивировании пыльников интрогрессивных линий от скрещивания мягкой пшеницы сорта ‘Скала’ с *T. timopheevii* получено 171,5 эмбрионидных структур на каждые 100 пыльников.

Высокая способность эмбрионидных структур к регенерации растений (зеленых и альбиносов) отмечена у сортов ‘Алтайская 60’, ‘Омская 24’, ‘Саратовская 58’, ‘Алтайская 110’, ‘Алтайская степная’, ‘Мария’, ‘Омская 20’ и устойчивой к бурой ржавчине линии 733 СПБР. Основным критерием эффективности метода культуры пыльников является частота регенерации зеленых растений. Выделены генотипы, формирующие от 18 до 40 зеленых регенерантов на 100 культивируемых пыльников: линии Лютесценс 123/С, 733 СПБР и сортообразец к-54975.

При культивировании пыльников 20 гибридов F1 и их родительских сортов показано, что наряду с промежуточным проявлением признаков способности к андрогенезу у большинства гибридов, наблюдались гетерозис и гибридная депрессия в некоторых комбинациях. В семи из десяти пар гибридов отмечены достоверные реципрокные различия по изучаемым признакам. Наши данные подтверждают гипотезу о полигенном контроле признаков способности к андрогенезу *in vitro* и об участии в этом процессе цитоплазмы.

При использовании метода гаплопродюсера завязываемость зерновок отмечалась во всех комбинациях скрещивания пшеница x кукуруза с частотой 19,2–65,2 %. Доля зерновок с зародышами в зависимости от года скрещивания составляла в среднем 9,5–13,3 %. Повышение концентрации раствора 2,4-Д для обра-

ботки опыленных колосьев до 100 мг/л позволило увеличить долю зерновок с зародышами в 1,5 раза. При сравнении двух методов индукции гаплоидов у мягкой пшеницы показано, что средний выход андрогенных гаплоидов выше в 1,2–1,4 раза, однако гибридизация *T. aestivum* x *Zea mays* позволяет получать зеленые гаплоидные растения от генотипов с низким уровнем реакции в культуре пыльников.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Атанасов А.** Биотехнология в растениеводстве. – Новосибирск: ИЦиГ СО РАН, 1993. – 242 с.
- Лантес Ю.П.** Гетероплоидия в селекции растений. – М.: Колос, 1984. – 248 с.
- Суриков И.М.** Несовместимость и эмбриональная стерильность растений. – М.: Агропромиздат, 1991. – 220 с.
- Amrani N., Sarrafi A., Alibert G.** Genetic variability for haploid production in crosses between tetraploid and hexaploid wheats with maize // *Plant Breeding*, 1993. – Vol. 110, No. 2. – P. 123–128.
- Andersen S.B., Due I.K., Olesen A.** The response of anther culture in a genetically wide material of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) // *Plant Breeding*, 1987. – Vol. 99, No. 3. – P. 181–186.
- Barclay I.R.** High frequencies of haploid production in wheat (*Triticum aestivum* L.) by chromosome elimination // *Nature (London)*, 1975. – Vol. 256. – P. 410–411.
- Blakeslee A.F., Belling J.** Chromosomal mutations in the Jimson weed, *Datura stramonium* // *Journal of Heredity*, 1924. – Vol. 15. – P. 195–206.
- Datta S.K.** Androgenic haploids: Factors controlling development and its application in crop improvement // *Current Science*, 2005. – Vol. 89, No. 11. – P. 1870–1878.
- De Buysse J., Henry Y.** Wheat: production of haploids, performance of doubled haploids, and yield trials // *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, 1986. – Vol. 2: Crops I. – P. 73–88.
- Dunwell J.M.** Pollen, ovule and embryo culture as tools in plant breeding // *Plant Tissue Culture and its Agricultural Applications* / Eds. L.A. Witches, P.G. Alderson. – London: Butterworths, 1986. – P. 375–404.
- Dunwell J.M.** Haploids in flowering plants: origin and exploitation // *Plant Biotechnology Journal*, 2010. – Vol. 8. – P. 377–424.
- Foroughi-Wehr B., Zeller F.J.** In vitro microspore reaction of different German wheat cultivars // *Theor. Appl. Genet.*, 1990. – Vol. 79. – P. 77–80.
- Guha S.R., Maheshwari S.C.** In vitro production of embryos from anthers of *Datura* // *Nature*, 1964. – Vol. 204. – P. 497.
- Holme I.B., Olesen A., Hansen N.J.P., Andersen S.B.** Anther and isolated microspore culture response of wheat lines from northwestern and eastern Europe // *Plant Breeding*, 1999. – Vol. 118, No. 2. – P. 111–117.
- Hu H.** Use of haploids in crop improvement // *Biotechnology in international agricultural research*. – International Rice Research Institute, 1985. – P. 75–84.
- Inagaki M.N.** Doubled haploid production in wheat through wide hybridization // *Doubled haploid production in crop plants: A manual*. / Eds. M. Maluszynski et al. – Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands, 2003. – P. 53–58.
- Laurie D.A., Bennett M.D.** The timing of chromosome elimination in hexaploid wheat x maize crosses // *Genome*, 1989. – Vol. 32. – P. 953–961.
- Sadasivaiah R.S., Orshinsky B.R., Kozub G.C.** Production of wheat haploids using anther culture and wheat x maize hybridization techniques // *Cereal Research Communications*, 1999. – Vol. 27. – P. 33–40.
- Sears E.R.** History of Chinese Spring aneuploids // *Proc. 7-th Int. Wheat Genet. Symp.*, Cambridge, 1988. – Vol. 1. – P. 3–6.
- Sitch L.A., Snape J.W.** Factors affecting haploid production in wheat using the *Hordeum bulbosum* system. 1. Genotypic and environment effects on pollen grain germination, pollen tube growth and the frequency of fertilization // *Euphytica*, 1987. – Vol. 36, No. 2. – P. 483–496.
- Suenaga K., Tamaki M., Nakajima K.** Influence of wheat (*Triticum aestivum*) and maize (*Zea mays*) genotypes on haploid wheat production in crosses between wheat and maize // *Bull. Natl. Inst. Agrobiol. Resour.*, 1991. – No. 6. – P. 131–142.
- Tsunewaki K., Mukai Y.** Wheat haploids through the Salmon method // *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, 1990. – Vol. 13. – P. 460–478.

#### SUMMARY

The role of haploid plants in plant breeding and genetic studies is discussed. Anther culture and wheat x maize hybridization are most commonly used methods for bread wheat haploid production. The comparison of both procedures in terms of their efficiency and applicability showed the average output androgenic rate is somewhat higher, but hybridization *T. aestivum* x *Zea mays* allows to get the green haploid plants from genotypes with a low level of reaction in anther culture.