

# Изучение фертильности и цитогенетической изменчивости у андрогенных растений ( $R_0$ и $R_1$ ) аллоплазматических интрогрессивных линий мягкой пшеницы

Т.С. Осадчая<sup>1</sup>, Н.В. Трубачеева<sup>1</sup>, Л.А. Кравцова<sup>1</sup>, И.А. Белан<sup>2</sup>, Л.П. Россева<sup>2</sup>, Л.А. Першина<sup>1,3</sup> 

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Сибирский научно-исследовательский институт сельского хозяйства, Омск, Россия

<sup>3</sup> Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», Новосибирск, Россия

Культивирование пыльников – один из методов получения дигаплоидных (ДГ) линий пшеницы, широко используемых в генетике и селекции. Одним из ограничений в применении этого метода для генотипов пшеницы гибридного происхождения может быть цитогенетическая изменчивость андрогенных растений, которая приводит к снижению их фертильности или стерильности. Изучена фертильность андрогенных растений  $R_0$ , а также фертильность и числа хромосом растений  $R_1$  аллоплазматических интрогрессивных линий мягкой пшеницы для выявления растений, необходимых для формирования 42-хромосомных дигаплоидных линий, сочетающих чужеродный генетический материал разных видов. В работу включены линии 311/134, 311/FL, 311/IR, имеющие цитоплазму ячменя *Hordeum vulgare*. Линия 311/134 несет пшенично-ржаную 1RS.1BL и пшенично-пырейную 7DL-7Ai транслокации; линия 311/FL – транслокацию 1RS.1BL и, возможно, интрогрессии от *Agropyrum glaucum*; линия 311/IR – пшенично-ржаную 1RS.1BL и пшенично-эгилопсную T2B/2S#2 транслокации. В культуре пыльников у всех линий получены зеленые проростки. Обнаружены различия между линиями по способности к андрогенезу и уровню фертильности растений  $R_0$  и  $R_1$ . У линии 311/IR подавлена способность к андрогенезу и проявляются высокая частота стерильных растений  $R_0$  и низкий уровень фертильности растений  $R_1$  с преимущественным развитием анеуплоидов. Предполагается, что причина этому – цитогенетическая нестабильность гамет, вызванная действием гаметоцидных генов, локализованных на T2B/2S#2. Среди растений  $R_1$  линий 311/134 и 311/FL, выращенных из семян растений  $R_0$  с низким уровнем завязываемости семян, 63,3 % – анеуплоиды. Выявлены регенеранты  $R_0$ , которые в  $R_1$ -поколении расщеплялись по уровню фертильности и числам хромосом. Показано, что отбор растений для формирования ДГ-линий у изученных линий целесообразно проводить среди растений  $R_1$  с  $2n = 42$  и высоким уровнем фертильности, независимо от его уровня исходных растений  $R_0$ .

Ключевые слова: аллоплазматические интрогрессивные линии (*H. vulgare*)-*T. aestivum*; культура пыльников; андрогенез; фертильность; число хромосом; дигаплоидные линии.

## Study of fertility and cytogenetic variability in androgenic plants ( $R_0$ and $R_1$ ) of alloplasmic introgression lines of common wheat

T.S. Osadchaya<sup>1</sup>, N.V. Trubacheeva<sup>1</sup>,  
L.A. Kravtsova<sup>1</sup>, I.A. Belan<sup>2</sup>, L.P. Rosseva<sup>2</sup>,  
L.A. Pershina<sup>1,3</sup> 

<sup>1</sup> Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

<sup>2</sup> Siberian Agricultural Research Institute, Omsk, Russia

<sup>3</sup> Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

Anther culture is one of the methods to obtain DH lines of wheat. A limitation of this method can be cytogenetic instability in plants  $R_0$ , leading to a decrease in fertility or sterility. In this study, we have investigated the fertility of  $R_0$ , the fertility and cytogenetic variability of  $R_1$  in alloplasmic introgression lines of common wheat in order to develop a cytogenetically stable DH lines with introgressions from different species. Lines 311/134, 311/FL, 311/IR with the cytoplasm from *H. vulgare* were studied. 311/134 carries the wheat-rye 1RS.1BL and wheat-wheatgrass 7DL-7Ai translocations; 311/FL has the 1RS.1BL translocation and probably introgressions from *A. glaucum*; and 311/IR has the wheat-rye 1RS.1BL and wheat-*Ae. speltoides* T2B/2S#2 translocations. Green seedlings developed in anther culture for all lines. Differences between the lines in the ability for androgenesis and in the level of fertility in  $R_0$  and  $R_1$  have been revealed. Depressed androgenesis, low fertility and high aneuploidy were observed in 311/IR. It has been proposed that the reason for this is cytogenetic instability in gametes, which is caused by Gc genes located on T2B/2S#2. 63.3 % of 311/134 and 311/FL  $R_1$  plants that were grown from low seed-set  $R_0$  plants were aneuploids. Fertile  $R_0$  regenerant plants were identified that segregated in  $R_1$  for fertility and chromosome

numbers. It has been demonstrated that DH lines are best developed from high-fertility  $R_1$  plants with  $2n = 42$  irrespective of fertility in  $R_0$ .

**Key words:** alloplasmic introgression lines (*H. vulgare*)-*T. aestivum*; anther culture; androgenesis; dihaploid lines; fertility; cytogenetic instability.

#### КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Осадчая Т.С., Трубачеева Н.В., Кравцова Л.А., Белан И.А., Россеева Л.П., Першина Л.А. Изучение фертильности и цитогенетической изменчивости у андрогенных растений ( $R_0$  и  $R_1$ ) аллоплазматических интрогрессивных линий мягкой пшеницы. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(3):370-377. DOI 10.18699/VJ16.165

#### HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Osadchaya T.S., Trubacheeva N.V., Kravtsova L.A., Belan I.A., Rosseeva L.P., Pershina L.A. Study of fertility and cytogenetic variability in androgenic plants ( $R_0$  and  $R_1$ ) of alloplasmic introgression lines of common wheat. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(3):370-377. DOI 10.18699/VJ16.165

Получение ДГ-линий, сформированных на основе гаплоидных растений с удвоенным числом хромосом, является важной и широко востребованной технологией для генетики и селекции (Forster, Thomas, 2005). Так как ДГ-линии являются гомозиготными, то их можно быстро проанализировать в повторных испытаниях, ускоряя отбор генотипов с нужными признаками, в том числе и в процессе создания новых сортов (Germana, 2011). Такие линии являются уникальным материалом для детального изучения многих признаков у растений, в том числе количественных (Hussain et al., 2012).

Для получения ДГ-линий пшеницы используют отдаленные скрещивания, в результате которых на ранних стадиях эмбриогенеза происходит элиминация хромосом скрещиваемого с пшеницей вида и развитие гаплоидных зародышей пшеницы (Nigoula, Bimb, 2009). Другой подход основан на индукции андрогенеза в условиях *in vitro* – развития из микроспор эмбриоподобных структур, а затем андрогенных проростков в культуре пыльников (Barnabas et al., 2001) или изолированных микроспор (Liu et al., 2002). Эффективность этих методов оценивается по числу уникальных, необходимых для дальнейшей генетической или селекционной работы линий (Oleszczuk et al., 2011). Ограничения при получении ДГ-линий при культивировании пыльников и микроспор связаны с проявлением гаметоклональной изменчивости, характерной для растений, регенерировавших из гаметических клеток в условиях *in vitro*. Генетические механизмы гаметоклональной изменчивости включают изменения числа хромосом (полиплоидия, анеуплоидия) и их структуры (дупликация, транслокации, инверсии, делеции), а также молекулярные изменения в ядерном, митохондриальном и хлоропластном геномах (Veilleux, 1998).

Типичным проявлением гаметоклональной изменчивости, связанной с делециями в хлоропластном геноме, является развитие хлорофилл-дефектных проростков (альбиносов) (Jane, Lorz, 1995). Мутации в ядерном геноме и цитогенетическая изменчивость приводят к стерильности или снижению фертильности дигаплоидных растений (Hu, Huang, 1987). Однако спонтанное удвоение числа хромосом у регенерировавших проростков обеспечивает восстановление их фертильности, что дает возможность при получении ДГ-линий исключать обработку андрогенных растений колхицином (Осадчая и др., 2014; Osadchaya et al., 2015). Цитогенетическая изменчивость у дигаплоидов особенно сильно проявляется, когда в качестве растений-

доноров при культивировании пыльников и микроспор используют генотипы гибридного происхождения, для которых характерна цитогенетическая нестабильность в мейозе (Oleszczuk et al., 2011). Вместе с тем генотипы гибридного происхождения, носители чужеродного генетического материала, являются важными объектами для получения ДГ-линий, так как у них можно зафиксировать сочетания серии целевых генов, перенесенных от разных родительских генотипов, в том числе ответственных за устойчивость к стрессовым факторам (Joshi, Nayak, 2010).

В нашей предыдущей работе (Осадчая и др., 2014; Osadchaya et al., 2015) в результате культивирования пыльников были получены ДГ-линии аллоплазматических интрогрессивных линий (*H. vulgare*)-*T. aestivum*, имеющих пшенично-чужеродные транслокации. Работа с этими линиями показала перспективность их использования в селекционном процессе и генетических исследованиях. Вместе с тем остался ряд вопросов, связанных с необходимостью проведения более эффективного отбора андрогенных растений для формирования 42-хромосомных ДГ-линий с высоким уровнем фертильности. Так, у ранее изученных интрогрессивных линий (*H. vulgare*)-*T. aestivum* из одной эмбриоподобной структуры в основном развивались не единичные проростки  $R_0$ , а их кластеры (семьи) (Осадчая и др., 2014; Osadchaya et al., 2015). Это затрудняло цитогенетический анализ индивидуальных растений  $R_0$  при их отборе для формирования ДГ-линий.

Цель работы – изучить проявление фертильности у андрогенных растений  $R_0$ , регенерировавших в культуре пыльников аллоплазматических интрогрессивных линий мягкой пшеницы (*H. vulgare*)-*T. aestivum*, а также уровень фертильности и цитогенетической изменчивости у растений  $R_1$ . Это необходимо для выявления 42-хромосомных растений с высоким уровнем фертильности – источников для формирования дигаплоидных линий, сочетающих генетический материал разных видов.

## Материалы и методы

### Исходный материал

В работу включены три перспективные линии, выделенные из гибридных популяций, созданных в СибНИИСХ (г. Омск). При получении гибридов в качестве материнского генотипа брали аллоплазматическую интрогрессивную линию мягкой пшеницы Лютесценс 311/00-22-4, которая

**Table 1.** The origin of parental lines

Lines	The origin of genotypes
311/134	Lutescens 311/00-22-4/Lutescens 134/03-10
311/FL	Lutescens 311/00-22-4/Filatovka
311/IR	Lutescens 311/00-22-4/Yrym

несет цитоплазму культурного ячменя *Hordeum vulgare* L. и пшенично-ржаную транслокацию 1RS.1BL. О происхождении этой линии сообщалось ранее (Першина и др., 2013; Pershina et al., 2013). Отцовскими генотипами служили линия Лютесценс 134/03-10, в родословную которой входит сорт мягкой пшеницы Омская 37 – носитель пшенично-ржаной 1RS.1BL и пшенично-пырейной 7DL-7Ai транслокаций (Белан и др., 2012a; Belan et al., 2015); линия сорта пшеницы Филатовка, полученного с участием *Agropyrum glaucum* (Стёпочкин и др., 2012); линия сорта Ырым, который характеризует высокая полевая устойчивость к листовым патогенам в течение всего онтогенеза (Белан и др., 2012b). По предварительным данным Е.И. Гулятьевой, сорт Ырым несет гены *Lr35/Sr39* от *Ae. speltoides*, что указывает на наличие T2B/2S#2 транслокации (Friebe et al., 1996). Линии для культивирования пыльников при получении андрогенных зеленых растений были сформированы от лучших по продуктивности растений, устойчивых в полевых условиях к листовым патогенам. Согласно далее изложенной методике, линии были тестированы на присутствие пшенично-ржаной 1RS.1BL и пшенично-пырейной 7DL-7Ai транслокаций (табл. 1).

### Культивирование пыльников

Растения-доноры для культуры пыльников выращивали в гидропонной теплице. Согласно ранее оптимизированным и использованным методам, были выполнены условия предобработки пыльников, их вычленения и культивирования (Першина и др., 2013; Pershina et al., 2013). Индукционная среда для культуры пыльников – РП (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). Для регенерации проростков из эмбриоподобных структур (ЭС) использовали среду Гамборга (B5) (Gamborg, Eveleigh, 1968) без фитогормонов. Пыльники культивировали при  $t = 29$  °C без освещения, а ЭС при  $t = 24$  °C и непрерывном освещении. Особенности андрогенеза оценивали по частоте пыльников, образовавших ЭС; частоте ЭС и зеленых проростков к 100 культивированным пыльникам. Зеленые проростки, достигшие стадии трех листьев, пересаживали в грунт и выращивали по ранее описанной методике (Осадчая и др., 2014; Osadchaya et al., 2015). Обработку андрогенных растений колхицином не производили. Фертильность изучали у растений со спонтанным удвоением числа хромосом.

### Изучение андрогенных растений $R_0$ и $R_1$ и формирование дигамплоидных линий

Уровень фертильности у регенерантов,  $R_0$ , и их самоопыленных потомков,  $R_1$ , оценивали по числу зерен, завязавшихся на один колос, согласно методу P. Sinha с коллегами

(2013) с нашими модификациями. Полная стерильность (ПС) – зерен нет; частичная стерильность (ЧС) – от 1 до 5 зерен; частичная фертильность низкого уровня (ЧФ–) – от 6 до 10; частичная фертильность (ЧФ+) – от 11 до 19; фертильность (Ф) – от 20 до 29; полная фертильность (ПФ) – свыше 30 зерен на колос. Растения  $R_1$  всех линий выращивали в теплице в один и тот же вегетационный период. Данные обработаны с помощью программы Statistica v.7.0.61.0.

Анализ числа хромосом проводили, согласно стандартной методике приготовления препаратов по Фельгену. Для подтверждения присутствия транслокации 1RS.1BL у исходных линий и полученных на их основе регенерантов  $R_0$  и  $R_1$  использован SCAR-маркер *iag95*, сцепленный с генами *Lr26*, *Sr31*, локализованными на коротком плече хромосомы 1R ржи (Mago et al., 2002), а для идентификации пшенично-пырейной транслокации 7DL-7Ai – SCAR-маркер *scm265*, сцепленный с геном *Lr19*, локализованным на хромосоме 7AgL пырея *Ag. elongatum* (Host.) Beauv (Gupta et al., 2006).

ДГ-линии для селекционных работ формировали из 42-хромосомных растений  $R_1$ , проявивших полную фертильность, для генетических исследований и дальнейшего отбора для селекции – из растений  $R_0$  и  $R_1$  всех фертильных растений.

## Результаты

### Получение растений $R_0$ и особенности их фертильности

При культивировании пыльников линии 311/134, 311/FL, 311/IR проявили способность к андрогенезу, в результате были получены зеленые проростки ( $R_0$ ). При этом у линии 311/IR такие показатели андрогенеза, как частота продуктивных пыльников, частота образования эмбриоструктур и частота регенерации зеленых проростков, оцененные по отношению к 100 культивированным пыльникам, были достоверно ниже по сравнению со значениями этих показателей у двух других линий – 311/134 и 311/FL (табл. 2).

Как и в предыдущей работе (Осадчая и др., 2014; Osadchaya et al., 2015), из ЭС преимущественно развивались не единичные проростки, а их кластеры, которые, не разделяя на отдельные проростки, высаживали в грунт. В конце вегетации при уборке растений  $R_0$  не во всех случаях удавалось определить их точное число в кластере, поэтому каждый колос относили к отдельному растению.

В табл. 2 приведены результаты изучения регенерантов  $R_0$  каждой линии по уровню фертильности, оцененному по числу зерен на колос и распределенному по шести группам: ПС, ЧС, ЧФ–, ЧФ+, Ф, ПФ.

Как следует из данных табл. 2, линии различаются между собой по уровню фертильности регенерантов  $R_0$ . Так, у линии 311/IR преимущественно развились полностью стерильные растения (85,6%), лишь одно из них отнесено к группе фертильных, а полностью фертильных не выявлено. У линии 311/134 полная стерильность характерна для половины из 149 изученных растений (51,7%). Самая низкая частота стерильных растений (25%) была у линии 311/FL. У линий 311/134 и 311/FL примерно с одинаковой частотой развились растения, завязавшие

**Table 2.** Cultivation of anthers from introgression genotypes of common wheat

Parental lines	Number of cultivated anthers	Productive anthers		Embryo-like structures		Green seedlings ( $R_0$ )	
		Number	Percentage <sup>#</sup>	Number	Percentage <sup>#</sup>	Number	Percentage <sup>o</sup>
311/134	509	91	17.9	285	56.0	149	29.2
311/FL	359	48	13.4	222	61.8	95	26.5
311/IR	766	51	6.6***	98	12.8***	113	14.7*

<sup>#</sup> with respect to 100 cultivated anthers; <sup>o</sup> with respect to the number of all seedlings. Differences from lines 311/134 and 311/FL are significant at \*  $p < 0.05$  and \*\*\*  $p < 0.001$ .

**Table 3.** Fertility in regenerants  $R_0$ 

Lines	Number of plants	Numbers and percentages of plants $R_0$ with different fertility levels					
		FS	PS	PF–	PF+	F	FF
311/134	149	77 (51.7***)	11 (7.4)	5 (3.3)	16 (10.7)	21 (4.1)	19 (12.8)
311/FL	92	23 (25.0)	14 (15.2)	2 (2.2)	20 (21.7)	17 (18.5)	16 (17.4)
311/IR	111	95 (85.6***)	2 (1.8)	2 (1.8)	11 (9.9)	1 (0.9)	0 (–)

The difference in comparison with the percentage of the plants of the same line that set seed is significant at \*\*\*  $p < 0.001$ . Hereinafter: FS, fully sterile; PS, partially sterile; PF–, partially fertile at low level; PF+, partially fertile; F, fertile; FF, fully fertile.

разное число зерен на колос, соответственно, отнесенные к определенным группам по уровню фертильности: ПС, ЧФ–, ЧФ+, Ф и ПФ (табл. 3).

Большая часть стерильных растений узколистые, с укороченными стеблями и колосьями. Выборочный цитологический анализ показал, что это гаплоиды ( $n = 21$ ). Кроме того, среди стерильных растений выявлялись выскорослые, с нормально развитыми колосьями.

### Уровень фертильности и число хромосом растений $R_1$ – потомков низкофертильных регенерантов $R_0$

Изучено проявление фертильности и выполнен анализ числа хромосом у растений  $R_1$ , выращенных из семян низкофертильных регенерантов  $R_0$  (линий 311/134 и 311/FL), завязавших не более 10 зерен на колос (группы ЧС и ЧФ–). Из приведенных в табл. 4 данных следует, что среди растений  $R_1$ , выращенных из семян частично стерильных и частично фертильных регенерантов  $R_0$ , развитие получили растения как полностью стерильные, так и с разным уровнем фертильности, включая фертильные и полностью фертильные. Для каждой из групп растений  $R_1$ , ранжированных по уровню фертильности растений, характерна вариабельность по числу хромосом. Среди десяти полностью стерильных растений обнаружены цитотипы с числом хромосом  $2n = 37, 39, 40, 41, 42$ ; среди 11 частично стерильных растений – с числом хромосом  $2n = 40, 40+t, 41, 41+t$ . Каждое из четырех растений с частичной фертильностью имело разное число хромосом:  $2n = 39, 40, 41, 42$ . Среди восьми растений с ЧФ+ выявлены цитотипы с  $2n = 40, 40+t, 41$ , а два растения – с  $2n = 42$ .

В группу фертильных растений (от 20 до 29 зерен на колос) вошло два растения с  $2n = 40$  и два эуплоида

( $2n = 42$ ). Из 16 растений с полной фертильностью (завязываемость от 30 зерен и выше) 12 были с  $2n = 42$ , одно растение с  $2n = 44$  и три – с  $2n = 43$ . С использованием 42-хромосомных растений с полной фертильностью были сформированы дигаплоидные линии. На основании ПЦП-анализа было установлено, что пять ДГ-линий 311/FL являются носителями генов *Lr26/Sr31* (это указывает на наличие пшенично-ржаной транслокации 1RS.1BL), а две дигаплоидные линии 311/134 – носителями генов *Lr26/Sr31* и гена *Lr19*, локализованного на сегменте хромосомы пырея в составе транслокации 7AgL. Сформированные линии в двух последующих самоопыленных поколениях ( $R_2$  и  $R_3$ ) сохранили полную фертильность. Выборочный цитогенетический анализ среди растений  $R_2$  и  $R_3$  выявил только 42-хромосомные растения. В данной части работы были также изучены растения  $R_1$  – потомки трех частично фертильных растений из кластеров двух регенерантов, рег49 и рег22, линии 311/IR, которую характеризует низкая частота развития фертильных растений ( $R_0$ ), регенерировавших в культуре пыльников (см. табл. 4; обозначение растений – источников линий  $R_1$ : рег49р1, рег49р2, рег22р1). Эти растения несут пшенично-ржаную транслокацию 1RS.1BL, что определено на основании данных ПЦП-анализа, выявившего сцепленные гены, локализованные на 1RS.

Потомки регенерантов  $R_0$  с частичной фертильностью линии 311/IR в  $R_1$  поколении расщепились по проявлению фертильности на частично фертильные (ЧФ– и ЧФ+) и фертильные (см. табл. 4). Из 29 изученных растений одно растение с  $2n = 42$  было полностью стерильным. Большая часть растений, завязавших семена, были анеуплоидами с числом хромосом 41, 43, 45. Только два растения из группы фертильных и три из группы растений

**Table 4.** Fertility levels and numbers of chromosomes in plants R<sub>1</sub> derived from R<sub>0</sub> plants of low-fertility lines 311/FL and 311/134

Parameters	Fertility of plants in R <sub>0</sub> lines	Number of plants examined	Fertility in R <sub>1</sub> plants					
			FS	PS	PF–	PF+	F	FF
Number and percentage of plants	PS and PF–	49	10 (20.4)	7 (14.3)	4 (8.1)	8 (16.3)	4 (8.2)	16 (32.6)
2n	311/FL and 311/134		37, 39, 40, 41, 42	40, 41, 40+t, 41+t	39, 40, 41, 42	40, 40+t, 41, 42	40, 42	43, 44, 42*
Number and percentage of plants	PF+ 311/IR reg49p1	29	1 (3.4)	0 (–)	5 (17.2)	12 (41.4)	9 (31.0)	–
2n	reg49p2 reg226p1		42	–	43	41, 43, 42	43, 45, 42*	–

\* Sources of dihaploid lines included in the breeding.

с частичной фертильностью были 42-хромосомными. На основе этих растений сформировано две ДГ-линии, которые в R<sub>2</sub> при выращивании в полевых условиях проявили полную фертильность и устойчивость к листовым патогенам.

#### Уровень фертильности растений R<sub>1</sub> линий 311/134 и 311/FL

Для формирования линий R<sub>1</sub> поколения линии 311/134 использовали по три растения, выделенные из двух кластеров регенерантов R<sub>0</sub>, reg208 и reg317 (растения обозначены как reg208p1, reg208p2, reg208p3 и соответственно reg317p1, reg317p2, reg317p3). По данным выполненного ПЦР анализа, эти растения несут сцепленные гены *Lr26/Sr31* и ген *Lr19*, что указывает на наличие транслокаций 1RS.1BL+7DL-7Ai.

Растение reg208p1 характеризовалось частичной фертильностью низкого уровня, reg208p2 – частичной фертильностью, reg208p3 – фертильностью. Растение reg317p1 было частично фертильным, reg317p2 – фертильным, а растение reg317p3 – полнофертильным. Установлено, что сформированные от растений регенеранта reg208 линии по проявлению фертильности отличаются от линий регенеранта reg317 (табл. 5). У всех трех линий регенеранта reg208, независимо от уровня фертильности исходных растений, в R<sub>1</sub> поколении развиваются полностью стерильные растения и растения с низкой фертильностью (ЧС и ЧФ–).

Даже среди потомков фертильных растений reg208p3 выявлено только 24,2 % фертильных генотипов, остальные растения были с более низким уровнем фертильности (см. табл. 5). Два 42-хромосомных растения с полной фертильностью обнаружены среди растений линии R<sub>1</sub>, сформированной от растения (ЧФ+) reg208p2. Выборочный цитологический анализ выявил наличие анеуплоидов с 2n = 41 и 2n = 43 среди группы растений с частичной фертильностью и фертильностью.

Что касается линий R<sub>1</sub> поколения, сформированных от регенеранта reg317, то для них характерен относительно высокий уровень фертильности (см. табл. 4). Так, среди растений R<sub>1</sub> линии reg317p1 (исходное растение R<sub>0</sub> ча-

стично фертильное ЧФ+) и линии reg317p2 (исходное растение R<sub>0</sub> фертильное) так же, как и среди растений линии reg317p3 (исходное растение R<sub>0</sub> с полной фертильностью), стерильных растений и растений с низким уровнем завязывания семян (ЧС и ЧФ–) не было. Выборочный цитологический анализ у растений R<sub>1</sub> этих линий выявил наличие только растений с 2n = 42. На основании 42-хромосомных растений с полным проявлением фертильности были сформированы ДГ-линии, которые в течение трех лет (поколения R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>) прошли селекционные испытания и проявили полную фертильность и устойчивость к грибным патогенам. (В табл. 5 указаны группы растений, от которых такие линии сформированы.)

Среди самоопыленных потомков разных фертильных растений R<sub>0</sub> линии 311/FL в R<sub>1</sub> поколении наблюдали неодинаковый уровень фертильности. В табл. 5 приведены данные для линий R<sub>1</sub>, сформированных от растений reg61p1 и reg106p1, носителей пшенично-ржаной транслокации 1RS.1BL. Линия reg61p1 представлена только 42-хромосомными растениями с высоким уровнем фертильности. Линия reg106p1 расщепилась на растения с разным уровнем фертильности: от стерильных до растений с полной фертильностью. Среди фертильных растений выявлены как эуплоидные, так и анеуплоидные цитотипы.

#### Обсуждение

Линия 311/134, использованная в настоящей работе, сочетает две транслокации, 1RS.1BL и 7DL-7Ai, которые несут кластеры сцепленных генов, ответственные за устойчивость к грибным патогенам, *Lr26/Sr31/Yr9/Pm8* (Singh et al., 1990) и *Lr19/Sr25* (Liu et al., 2010) соответственно. Благодаря аддитивному действию генов *Lr26* и *Lr19* и функционированию гена *Sr25*, у сортов мягкой пшеницы Омская 37, Омская 38, Омская 41, созданных авторами проекта в СибНИИСХ (Белан и др., 2012а; Belan et al., 2015), проявляется высокая устойчивость к листовой и стеблевой ржавчине, в том числе к расе стеблевой ржавчины Ug99+*Sr24* (ТТКСТ) (Белан и др., 2012б). Линия 311/FL, отцовским генотипом которой служила линия озимого сорта пшеницы Филатовка, созданного с уча-

**Table 5.** The levels of fertility and the numbers of chromosomes in plants R<sub>1</sub> derived from two clusters of R<sub>0</sub> of line 311/134 and two plants R<sub>0</sub> of line 311/FL

Fertility of plants in R <sub>0</sub> lines	Num-ber of plants R <sub>1</sub> and line No.	Numbers and percentages of plants R <sub>1</sub> with different fertility levels					
		FS	PS	PF-	PF+	F	FF
PF- reg208p1	9 311/134	4 (44.4)	3 (33.3)	1 (11.1)	0	1 (11.1)	0
PF+ reg208p2	52 311/134	7 (13.4)	10 (19.2)	9 (17.3)	20 (38.5)	4 (7.7)	2* (3.8)
					2n = 41 2n = 42		2n = 42
F reg208p3	62 311/134	3 (4.8)	24 (38.7)	6 (9.6)	14 (22.5)	15 (24.2)	0
						2n = 42 2n = 43	
PF+ reg317p1	20 311/134	0	0	0	8 (40.0)	8 (40.0)	4 (20.0)
						2n = 42	
F reg317p2	20 311/134	0	0	0	4 (20.0)	8** (40.0)	8* (40.0)
						2n = 42	2n = 42
FF reg317p3	21 311/134	0	0	0	1 (4.8)	6** (28.6)	14* (66.6)
						2n = 42	2n = 42
F reg61p1	19 311/FL	0	0	0	1 (5.3)	12** (63.2)	6* (31.5)
						2n = 42	2n = 42
F reg106p1	19 311/FL	2 (10.5)	1 (5.3)	1 (5.3)	3 (15.8)	9** (47.3)	3*** (15.8)
						2n = 41 2n = 42	2n = 42

\* Sources of dihaploid lines included in the breeding. \*\* Sources of dihaploid lines included in the subsequent study.

стием пырея *A. glaucum* (Стёпочкин и др., 2012), также несет транслокацию 1RS.1BL. Гибридная линия 311/IR с транслокацией 1RS.1BL имеет и пшенично-эгилопсную транслокацию T2B/2S#2 (с генами *Lr35/Sr39*).

Эффективность получения дигамплоидных линий при культивировании пыльников определяется успешностью прохождения всех этапов андрогенеза с получением зеленых проростков (R<sub>0</sub>) и образованием 42-хромосомных растений (спонтанно индуцированных в условиях культивирования или в результате колхицинирования), которые характеризует высокий уровень фертильности. Установлено, что даже при оптимизации всех требуемых условий для культивирования пыльников определяющее влияние на андрогенез (развитие эмбриоидов из микроспор, регенерацию всех проростков из эмбриоидов и развитие зеленых проростков) оказывает генотип растения-донора (Konieczny et al., 2003; Tersi et al., 2006). Результаты настоящей работы показали, что у линии 311/IR относительно двух других изученных линий понижена способность к андрогенезу (см. табл. 2). Так, значения частоты пыльников, образовавших эмбриоподобные структуры, а также частоты развития ЭС и регенерировавших зеленых проростков у этой линии достоверно ниже, чем у линий 311/134 и 311/FL.

Выше указывалось, что все изученные линии являются носителями пшенично-ржаной транслокации 1RS.1BL и цитоплазмы ячменя *H. vulgare*. Ранее нами показано стимулирующее влияние цитоплазмы ячменя и пшенич-

но-ржаной транслокации 1RS.1BL у аллоплазматических генотипов (*H. vulgare*)-*T. aestivum* на проявление признаков андрогенеза (Першина и др., 2013; Pershina et al., 2013; Осадчая и др., 2014; Osadchaya et al., 2015), в том числе и при наличии пшенично-пырейной транслокации 7DL-7Ai (Осадчая и др., 2014; Osadchaya et al., 2015). Это важно подчеркнуть, так как у эуплазматических (с цитоплазмой пшеницы) генотипов транслокация 7DL-7Ai (Сибикеева и др., 2004; Sibikeeva et al., 2004), в том числе в сочетании с транслокацией 1RS.1BL (Осадчая и др., 2014; Osadchaya et al., 2015), оказывает сильное ингибирующее влияние на проявление андрогенеза в культуре пыльников. У линии 311/134 (носитель 1RS.1BL и 7DL-7Ai) значения всех изученных показателей андрогенеза сохраняются на уровне значения этих показателей, выявленных у линии 311/FL (носитель 1RS.1BL). Таким образом, в генотипической среде линии 311/134 негативное влияние 7DL-7Ai на андрогенез подавлено.

Что касается линии 311/IR, которая несет пшенично-ржаную 1RS.1BL и пшенично-эгилопсную T2B/2S#2 (с генами *Lr35/Sr39*) транслокации, то ее низкие показатели андрогенеза (см. табл. 2), вероятнее всего, объясняются цитогенетической нестабильностью растений-доноров пыльников для культивирования. В настоящей работе цитогенетический анализ растений-доноров не проводился. Однако многолетние исследования авторов выявили бесперспективность использования сорта Ырым в скрещиваниях с другими генотипами мягкой пшеницы

с целью передачи генов, определяющих устойчивость к листовым патогенам, от этого сорта в новую генотипическую среду. Полученные с участием Ырым гибридные линии характеризуются низкой продуктивностью из-за стерильности или пониженной фертильности растений. Выборочный цитогенетический анализ выявил растения с цитогенетическими нарушениями (Наши неопубликованные данные).

Можно предположить, что в генетическом материале *Ae. speltoides*, который несет сорт Ырым и передан линии 311/IR, присутствуют гаметоцидные гены. Это подтверждается тем, что в хромосоме 2S *Ae. speltoides* локализованы гаметоцидные гены (*Gc*), которые в гемизиготном состоянии в постмейотический период митоза индуцируют хромосомные разрывы, приводящие к появлению хромосомных фрагментов и мостов в интерфазе митоза в микроспорах, не несущих гены *Gc* (Nasuda et al., 1998). На примере изучения пшенично-эгилопсных линий разного происхождения показано, что гены *Gc* сцеплены с генами, определяющими устойчивость к листовым патогенам (Marais et al., 2010; Сибикеев и др., 2015; Sibikeev et al., 2016), что может быть серьезным препятствием для широкого использования некоторых из таких линий для создания коммерческих сортов (Marais et al., 2010).

У линии 311/IR, в отличие от линий 311/134 и 311/FL, очень низкий уровень развития растений  $R_0$ , завязавших семена (см. табл. 3), что, по-видимому, связано с анеуплоидией. Это предположение может согласоваться с тем, что среди самоопыленных потомков растений  $R_0$  линии 311/IR в  $R_1$  наблюдается высокая частота развития анеуплоидов (см. табл. 4).

Развитие анеуплоидов среди андрогенных растений  $R_0$  связано не только с наличием анеуплоидных гамет в культивируемых пыльниках, из которых развиваются эмбриониды, а затем растения, но и с влиянием условий культивирования *in vitro* (Oleszczuk et al., 2011). Изменчивость числа хромосом у андрогенных растений  $R_0$  мягкой пшеницы и ее гибридов – типичное явление (Hu, Huang, 1987; Oleszczuk et al., 2011). По этой причине при формировании ДГ-линий генотипов мягкой пшеницы, включаемых в селекцию, необходимо проводить отбор 42-хромосомных растений с высоким уровнем фертильности. В настоящей работе проростки  $R_0$  высаживали целыми кластерами (семьями), а растения из одного кластера могут быть как генетически идентичными, так и генетически гетерогенными (Oleszczuk et al., 2014). В связи с этим мы выделяли растения для ДГ-линий в  $R_1$  поколении на основании изучения числа хромосом и завязываемости семян на колос.

Из литературы известно, что результаты цитологического анализа, как и завязываемость семян, могут служить надежными показателями анеуплоидии у андрогенных растений (Oleszczuk et al., 2011). Наши данные выявили, что андрогенные растения  $R_0$  с низким уровнем завязывания семян в  $R_1$  поколении могут быть источниками не только анеуплоидов, но и 42-хромосомных растений с высоким уровнем фертильности (см. табл. 4). На примере линий 311/FL и 311/134 показано, что сформированные на основе таких растений дигаметоидные линии в  $R_2$  и  $R_3$  поколениях сохранили полную фертильность, а выбороч-

ный цитогенетический анализ выявил наличие растений с  $2n = 42$ .

Кроме того, обращает на себя внимание факт, что не во всех случаях растения  $R_0$  с повышенным уровнем фертильности (группы ЧФ+, Ф, ПФ) при самоопылении в  $R_1$  поколениях стабильные по проявлению этого признака. Между линиями  $R_1$ , сформированными от растений  $R_0$  двух регенерантов (reg208 и reg317) исходной линии 311/134, обнаружены различия по проявлению фертильности, а также цитогенетической изменчивости, в зависимости от исходного регенеранта (см. табл. 5). Так, все изученные линии reg208 в  $R_1$  представлены в основном растениями с пониженным уровнем фертильности, в том числе и стерильными, а линии reg317, напротив, – растениями с повышенным уровнем фертильности. Цитогенетический анализ выявил среди растений линий reg317 только 42-хромосомные растения, а среди растений линий reg208 встречались и анеуплоиды. На примере линии 311/FL также показано, что растения  $R_0$  с повышенной фертильностью в  $R_1$  могут проявить разный уровень фертильности и цитогенетической изменчивости.

42-хромосомные растения  $R_1$  линий reg208p2, reg317p2, reg317p3, несущие транслокации 1RS.1BL и 7DL-7Ai, а также растение  $R_1$  линии reg61p1 с транслокацией 1RS.1BL, характеризующиеся полной фертильностью (см. табл. 5), использованы в качестве источников ДГ-линий, которые сохранили высокий уровень фертильности при селекционных испытаниях.

Таким образом, полученные данные показали целесообразность отбора андрогенных растений по проявлению фертильности и числу хромосом для формирования дигаметоидных линий у изученных аллоплазматических интрогрессивных генотипов мягкой пшеницы в  $R_1$  поколении. Установлена перспективность использования линий 311/134 и 311/FL в работах по культивированию пыльников с целью получения большего разнообразия дигаметоидных линий, представляющих интерес для селекции.

## Acknowledgments

This study was supported by State Budgeted Project 0324-2015-0005 and the Russian Foundation for Basic Research, project 14-04-00574.

## Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

## References

- Barnabas B., Szakacs É., Karsai I., Bedő Z. *In vitro* androgenesis of wheat: from fundamental to practical application. *Euphytica*. 2001; 119(1):211-216.
- Belan I., Rosseeva L., Laikova L., Rosseev V., Pershina L., Trubacheeva N., Morgounov A., Zelenskiy Y. Utilization of new wheat gene-pool in breeding of spring bread wheat. [Proc. 8th Int. Wheat Conference]. St. Petersburg, 2010;69-70.
- Belan I.A., Rosseeva L.P., Meshkova L.V., Shepelev S.S., Zelenskiy Yu.I. Immunological evaluation of “KASIB” material in southern forest-steppe of West Siberia. *Vestnik Altayskogo Gosudarstvennogo Agrarnogo Universiteta = Bulletin of the Altai State Agricultural University*. 2012b;10(96):39-43.

- Belan I.A., Rosseeva L.P., Rosseev V.M., Badaeva E.D., Zelenskiy Y.I., Blokhina N.P., Shepelev S.S., Pershina L.A. Examination of adaptive and agronomic characters in lines of common wheat Omskaya 37 bearing translocations 1RS.1BL and 7DL-7Ai. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektcii* = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2012a;16(1):178-186.
- Belan I.A., Rosseeva L.P., Rosseev V.M., Badayeva E.D., Zelenskiy Yu.I., Blokhina N.P., Shepelev S.S., Pershina L.A. Examination of adaptive and agronomic characters in lines of common wheat Omskaya 37 bearing translocations 1RS.1BL and 7DL-7Ai. *Russ. J. Genet.: Appl. Res.* 2015;5(1):41-47. DOI 10.1134/S2079059715010037
- 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*, 1978:51-56.
- Forster B.P., Thomas W.T.B. Doubled haploids in genetics and plant breeding. *Plant Breed. Rev.* 2005;25:57-88. DOI 10.1002/9780470650301.ch3
- Friebe B., Jiang J., Raupp W.J., McIntosh R.A., Gill B.S. Characterization of wheat-alien translocations conferring resistance to diseases and pests: current status. *Euphytica*. 1996;91(1):59-87.
- Gamborg O.L., Eveleigh D.E. Culture methods and detection of glucanases in suspension cultures of wheat and barley. *Can. J. Biochem.* 1968;46(5):417-421.
- Germana M.A. Gametic embryogenesis and haploid technology as valuable support to plant breeding. *Plant Cell Rep.* 2011;30(5):839-857. DOI 10.1007/s00299-011-1061-7
- 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;113(6):1027-1036. DOI 10.1007/s00122-006-0362-7
- Hu H., Huang B. Application of pollen-derived plants to crop improvement. *Int. Rev. Cytol.* 1987(107):293-313. DOI 10.1016/S0074-7696(08)61079-7
- Hussain B., Khan M.A., Ali Q., Shaikat S. Double haploid production is the best method for genetic improvement and genetic studies of wheat? *Int. J. Agro Veter. Med. Sci.* 2012;6(4):216-228.
- Jane A., Lorz H. Cereal microspore culture. *Plant Sci.* 1995;109(1):1-12.
- Joshi R.K., Nayak S. Gene pyramiding – a broad spectrum technique for developing durable stress resistance in crop. *Biotechnol. Mol. Biol. Rev.* 2010;5(3):51-60.
- Konieczny R., Czaplicki A.Z., Golczyk H., Przywara L. Two pathways of plant regeneration in wheat anther culture. *Plant Cell, Tissue Organ Culture.* 2003;73(2):177-187.
- 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;120(4):691-697. DOI 10.1007/s00122-009-1186-z
- Liu W., Zheng M.Y., Polle E.A., Konzak C.F. Highly efficient doubled-haploid production in wheat (*Triticum aestivum* L.) via induced microspore embryogenesis. *Crop Sci.* 2002;42(3):686-692.
- 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;104(8):1317-1324. DOI 10.1007/s00122-002-0879-3
- Marais G.F., Bekker T.A., Eksteen A., McCallum B., Fetch T., Marais A.S. Attempts to remove gametocidal genes co-transferred to common wheat with rust resistance from *Aegilops speltoides*. *Euphytica*. 2010;171(1):71-85. DOI 10.1007/s10681-009-9996-2
- Nasuda S., Friebe B., Gill B.S. The morphology of the chromosome fragments suggests that the *Gc* genes induce chromosome breaks in the G1 phase prior to DNA synthesis of the first postmeiotic mitosis. *Genetics*. 1998;149(2):1115-1124.
- Niroula R.K., Bimb H.P. Overview of wheat × maize system of crosses for dihaploid induction in wheat. *World Appl. Sci. J.* 2009;7(8):1037-1045.
- Oleszczuk S., Rabiza-Swider J., Zimny J., Lukaszewski A.J. Aneuploidy among androgenic progeny of hexaploid triticales (×*Triticosecale* Wittmack). *Plant Cell Rep.* 2011;30(4):575-586. DOI 10.1007/s00299-010-0971-0
- Oleszczuk S., Tyrka M., Zimny J. The origin of clones among androgenic regenerants of hexaploid triticales. *Euphytica*. 2014;198(3):325-336.
- Osadchaya T.S., Pershina L.A., Trubacheeva N.V., Belan I.A., Rosseeva L.P., Devyatkina E.P. 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 doubled haploids lines. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektcii* = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2014;18(4/1):650-659.
- Osadchaya T.S., Pershina L.A., Trubacheeva N.V., Belan I.A., Rosseeva L.P., Devyatkina E.P. 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. *Russ. J. Genet.: Appl. Res.* 2015;5(3):174-181. DOI 10.1134/S2079059715030132
- Pershina L.A., Osadchaya T.S., Badaeva E.D., Belan I.A., Rosseeva L.P. Features of androgenesis in anther 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. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektcii* = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2013;17(1):40-49.
- Pershina L.A., Osadchaya T.S., Badaeva E.D., Belan I.A., Rosseeva L.P. Features of androgenesis in anther 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. *Russ. J. Genet.: Appl. Res.* 2013;3(4):246-253. DOI 10.1134/S2079059713040096
- Sibikeev S.N., Voronina S.A., Badaeva E.D., Druzhin A.E. Study of resistance to leaf and stem rusts in *Triticum aestivum* – *Aegilops speltoides* lines. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektcii* = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2015;19(2):165-170.
- Sibikeev S.N., Voronina S.A., Badaeva E.D., Druzhin A.E. Study of resistance to leaf and stem rust in *Triticum aestivum* – *Aegilops speltoides* lines. *Russ. J. Genet.: Appl. Res.* 2016;6(4):351-356. DOI 10.1134/S2079059716040183
- Sibikeeva Yu.E., Sibikeev S.N., Krupnov V.A. The effect of Lr19-translocation on *in vitro* androgenesis and inheritance of leaf-rust resistance in DH3 lines and F2 hybrids of common wheat. *Genetika* = Genetics (Moscow). 2004;40(9):1224-1228.
- Sibikeeva Yu.E., Sibikeev S.N., Krupnov V.A. The effect of Lr19-translocation on *in vitro* androgenesis and inheritance of leaf-rust resistance in DH3 lines and F2 hybrids of common wheat. *Russ. J. Genet.* 2004;40(9):1003-1006.
- 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;80:609-616. DOI 10.1007/BF00224219. pmid:24221066
- Sinha P., Tomar S.M., Vinod, Singh V.K., Balyan H.S. Genetic analysis and molecular mapping of a new fertility restorer gene *Rf8* for *Triticum timopheevi* cytoplasm in wheat (*Triticum aestivum* L.) using SSR markers. *Genetica*. 2013;141(10-12):431-341. DOI 10.1007/s10709-013-9742-5
- Stepochkin P.I., Ponomarenko V.I., Pershina L.A., Osadchaya T.S., Trubacheeva N.V. Utilization of distant hybridization for development of breeding material of winter wheat. *Dostizheniya nauki i tekhniki APK* = Achievements of Science and Technology of AIC. 2012;6:37-38.
- Tersi M., Xynias I.N., Gouli-Vadinoudi E., Roupakias D.G. Anther culture response of F1 durum bread wheat hybrids after colchicines. *Plant Breed.* 2006;125(5):457-460. DOI 10.1111/j.1439-0523.2006.01285.x
- Veilleux R.E. Gametoclonal variation in crop plants. *Current Plant Sci. Biotechnol. Agricult.* 1998;32:123-133.