

ОТДАЛЕННАЯ ГИБРИДИЗАЦИЯ КАК МЕТОД ПОЛУЧЕНИЯ ГАПЛОИДНЫХ РАСТЕНИЙ У ЗЛАКОВ

Дьячук Т. И., Акинина В. Н., Хомякова О. В.,
Калашникова Э. В.

Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Юго-Востока,
410010, Россия, г. Саратов, ул. Тулайкова, 7;

✉ cell_selection@list.ru

В статье представлен обзор литературы по получению гаплоидных растений у злаков методом отдаленной гибридизации и механизмы, лежащие в основе селективной элиминации хромосом одного из родительских геномов во время раннего развития зародыша. Элиминация хромосом – распространенный феномен у отдаленных гибридов, который проявляется в разной степени в различных комбинациях: от потери одной или двух хромосом до элиминации полного набора хромосом одного из родителей. В последнем случае возникают гаплоидные растения, удвоение числа хромосом которых приводит к получению удвоенных гаплоидов (DH-линий). Гомозиготность удвоенных гаплоидов послужила основой для их широкого использования в генетике и селекции растений. Использование данного подхода позволяет сократить время получения гомозиготных линий в среднем на пять лет, что приводит к экономии людских ресурсов и посевных площадей. Разработка «*bulbosum*» метода получения гаплоидов ячменя оказала революционное влияние на хромосомную инженерию злаков и ее использование в селекции растений. Однако разработанный на этой основе метод не мог эффективно использоваться для получения гаплоидов пшеницы, тритикале и других злаков из-за чувствительности пыльцы *Hordeum bulbosum* L. к генам-ингибиторам скрещиваемости пшеницы (*Kr*-генам). Эффективным опылителем для различных видов злаков явилась кукуруза. Скрещивания с дикорастущим злаком *Imperata cylindrica* (L.) Raeusch. выявили преимущества по сравнению со скрещиваниями пшеница × кукуруза и тритикале × кукуруза благодаря длительной продолжительности цветения этого вида и высокой частоте формирования зародышей и регенерации гаплоидных растений.

Ключевые слова: колосовые злаки, отдаленная гибридизация, гаплоидия, селективная элиминация хромосом, селекция.

Прозрачность финансовой деятельности / The transparency of the financial activities Авторы не имеют финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах.

Авторы благодарят рецензентов за их вклад в экспертную оценку этой работы / The authors thank the reviewers for their contribution to the peer review of this work

Дополнительная информация / Additional information Полные данные этой статьи доступны / Extended data is available for this paper at <https://doi.org/10.30901/2658-6266-2019-2-44-52>

Мнение журнала нейтрально к изложенным материалам, авторам и их месту работы / The journal's opinion is neutral to the presented materials, the author, and his or her employer

Все авторы одобрили рукопись / All authors approved the manuscript

Конфликт интересов отсутствует / No conflict of interest

DISTANT HYBRIDIZATION AS A METHOD OF HAPLOID PRODUCTION IN CEREALS

Djatchouk T. I., Akinina V. N.,
Khomyakova O. V., Kalashnikova E. V.

Agricultural Research Institute of South-East Region,
7, Toulaikov St., Saratov, 410010, Russia;

✉ cell_selection@list.ru

Elimination of chromosomes is a phenomenon widespread in distant hybrids. It ranges from the loss of one or two chromosomes to elimination of whole chromosome complement of one of the parents. Such elimination leads to the production of haploid plants, which then are treated with colchicine to double the chromosome number and to develop DH-lines. Homozygosity of doubled haploids serves as a basis for their wide use in plant genetics and breeding. The use of this approach reduces the time required for obtaining homozygous lines by 5 years on the average. It leads to savings in human resources, energy and acreage. The development of the “*bulbosum*” method for haploid barley production had a strong influence on the chromosome engineering in cereals and its implementation in plant breeding. However, the method developed on that basis could not be used effectively for producing haploids of wheat, triticale, etc. because of *Hordeum bulbosum* L. pollen sensitivity to genes inhibiting wheat crossability (*Kr* genes). The crosses with *Imperata cylindrica* (L.) Raeusch. is an efficient alternative to the widely used wheat × maize and triticale × maize crosses due to abundant pollen supply within a longer time period, significantly higher frequency of embryos formation and haploid plants regeneration.

Key words: cereals, distant hybridization, selective chromosome elimination, haploidy, breeding.

Для цитирования: Дьячук Т. И., Акинина В. Н., Хомякова О. В., Калашникова Э. В. Отдаленная гибридизация как метод получения гаплоидных растений у злаков (обзор проблемы). *Биотехнология и селекция растений*. 2019;2(2):44-52. DOI: 10.30901/2658-6266-2019-2-44-52

For citation: Djatchouk T. I., Akinina V. N., Khomyakova O. V., Kalashnikova E. V. Distant hybridization as a method of haploid production in cereals (a review of the problem). *Plant Biotechnology and Breeding*. 2019;2(2):44-52. (In Russ.) DOI: 10.30901/2658-6266-2019-2-44-52

УДК 631.1:581.143.6

Поступила в редакцию: 11.06.2019

Принята к публикации: 31.07.2019

Гаплоиды (от греч. гапλος – простой, одиночный) – спорофиты, в соматических клетках которых содержится половинное (гаплоидное) число хромосом (n вместо $2n$), причем из каждой пары гомологичных хромосом представлена одна. Удвоенные гаплоиды (DH) – генотипы, возникшие в результате удвоения числа хромосом гаплоидного организма. Основное селекционное преимущество гаплоидов – одноэтапное получение гомозигот, позволяющее быстро фиксировать морфофизиологические параметры адаптивности и сокращать сроки создания сортов, отвечающих всем требованиям современного рынка. С практической точки зрения наиболее распространенными являются два аспекта их применения: 1) ускоренное создание сортов у самоопыляемых культур и 2) получение гомозиготных линий в селекции на гетерозис, где создание инцухт-линий занимает 5-6 лет. Сроки селекции при использовании гаплоидов сокращаются в среднем на 5 лет (Wedzony et al., 2009; Dunwell, 2010; Liu et al., 2014; Humphreys, Knox, 2015). С применением различных гаплоидных технологий создано около 300 сортов экономически значимых сельскохозяйственных культур, 150 из которых относятся к представителям семейства Poaceae Barnhart. Число сортов, полученных с применением гаплоидных технологий, постоянно увеличивается (Dunwell, 2010). В Канаде 30% всех посевных площадей пшеницы заняты сортами, созданными на основе DH-технологий. Из приведенного в обзоре Д. Дж. Хамфрис и Н. Е. Нокс (Humphreys, Knox, 2015) списка 47-ми DH-сортов этой культуры следует, что только два из них получены методом культуры пыльников, а остальные – методом селективной элиминации хромосом («maize» technique). В то же время в селекции ячменя наибольшее применение получил метод культуры пыльников – семь сортов из восьми созданы этим методом.

Для эффективного использования гаплоидов в селекционных программах, они должны удовлетворять следующим критериям: (1) эффективности получения DH-линий для любых генотипов, (2) DH-линии должны отражать спектр генетической изменчивости гибрида и (3) DH-линии должны быть генетически стабильны (Snape et al., 1986). Существуют различные методы получения гаплоидных растений, однако их массовое получение стало возможным с развитием методов культивирования растительных тканей *in vitro*.

Для искусственного получения гаплоидов у злаков применяются два метода: культура пыльников и ее разновидность – культура изолированных микроспор и отдаленная гибридизация с последующей селективной элиминацией хромосом вида-опылителя (Chistyakova, 2000; Djatchouk, 2003; Devaux, Pickering, 2005; Prata et al., 2006; Ignatova, 2011; Hazarica et al., 2013; Gosal, Wani, 2018; Srivastava, Singh, 2018). Одним из основных преимуществ метода селективной элиминации хромосом в сравнении с культурой пыльников у злаков является отсутствие альбиносных

растений и генетическая стабильность DH-линий (Devaux, Pickering, 2005; Chaudhary et al., 2014).

Несовместимость родительских геномов в отдаленных скрещиваниях имеет различные проявления. Важнейшее из них – кариотипическая нестабильность гибридов. Хромосомы одного из родителей, чаще всего отцовские, частично или полностью элиминируют из гибридного ядра. Этот феномен, названный «хромосомной элиминацией», проявляется в различных межвидовых и межродовых скрещиваниях (Davies, 1974; Surikov, Dunaeva, 1989; Djatchouk, 2003; Ignatova, 2011; Prata et al., 2006; Chaudhary et al., 2014). В результате в развивающемся зародыше остается только гаплоидный набор хромосом материнского родителя. Общая схема селективной элиминации хромосом при отдаленных скрещиваниях включает: скрещивание видов «z» и «y», формирование гибридной зиготы, элиминацию хромосом вида «y», получение удвоенных гаплоидов после диплоидизации хромосом (Houben et al., 2011). Исследования аномалий митотического цикла предоставляет информацию о процессе элиминации хромосом. Хромосомы опылителя в метафазе располагаются вне экваториальной плоскости. Сестринские хромосомы в анафазе не двигаются к полюсам. Они формируют микроядро, и, в конечном итоге, дегенерируют.

Для объяснения причин селективной элиминации хромосом предлагались различные гипотезы: асинхронности митотических циклов скрещиваемых видов (Gupta, 1969), асинхронности синтеза ядерных белков, приводящей к потере отдельных хромосом (Laurie, Bennet, 1989), пространственного разделения геномов в интерфазе (Linde-Laursen, von Bothner, 1999). Кроме того, существуют гипотезы деградации чужеродных хромосом специфическими нуклеазами хозяина (Davies, 1974), специфической видовой инактивации хромосом (Jin et al., 2004; Mochida et al., 2004), и нерасхождения хромосом одного из родителей в анафазе (Ishii et al., 2010). Элиминация хромосом является выражением одной из форм постгамной несовместимости, обеспечивающей репродуктивную изоляцию видов (Surikov, Dunaeva, 1989). По мнению Х. К. Чаудхари с соавторами (Chaudhary et al., 2014), клеточные механизмы, вовлекаемые в процесс однородительской элиминации хромосом, до настоящего времени остаются плохо понятными.

Барьеры несовместимости, проявляющиеся на постгамной стадии, ингибируют нормальное развитие гибридных семян. Одно из проявлений постгамной несовместимости – отсутствие развития эндосперма, приводящее к голоданию зародыша и его последующей гибели. Своевременная изоляция зародыша и его культивирование на искусственной питательной среде *in vitro* является основополагающим принципом технологии embryo rescue («спасения» незрелых зародышей), обеспечивающей получение жизнеспособных растений в отдаленных скрещиваниях (Filippis, 2014; Lulsdorf et al., 2014; Sahijram, Rao, 2015; Gosal, Wani, 2018).

Получение гаплоидов в скрещиваниях *Hordeum vulgare* L. × *H. bulbosum* L.

В селекции ячменя метод селективной элиминации хромосом широко используют для получения гаплоидов при скрещивании *Hordeum vulgare* × *H. bulbosum* (так называемый «*bulbosum*»-метод). Первые такой межвидовой гибрид был получен еще в 1934 году. При скрещивании тетраплоидного *H. bulbosum* (♀) с тетраплоидным *H. vulgare* (♂) было получено одно стерильное растение (Kuckuck, 1934). Однако, причина появления в первом поколении растений, внешне похожих на обыкновенный ячмень, выяснилась гораздо позднее. Эксперименты с применением методов цитологии, проведенные одновременно в Голландии (Lange, 1971) и Канаде (Symko, 1969; Kasha, Као, 1970), объяснили возникновение гаплоидных растений у межвидовых гибридов ячменя вследствие элиминации хромосом *H. bulbosum*. В тех случаях, когда в качестве женского родителя авторы использовали как диплоидные, так и тетраплоидные генотипы обыкновенного ячменя, а в качестве отцовского – диплоидные клоны *H. bulbosum*, было получено большое количество схожих с обыкновенным ячменем гаплоидных и дигаплоидных растений и только единичные гибриды. Авторы установили, что появление гаплоидных растений материнского типа не было следствием партеногенеза. В этих комбинациях происходило двойное оплодотворение, а гаплоидный набор хромосом у полученных растений был следствием селективной элиминации хромосом *H. bulbosum* в чужеродной цитоплазме *H. vulgare*.

Элиминация хромосом *H. bulbosum* происходит как во время митоза, так и в интерфазе и сопровождается формированием микроядер и прогрессивной гетерохроматизацией. Полная элиминация хроматина луковичного ячменя происходит в течение 5–9 дней после опыления. Скорость элиминации хромосом зависит от генотипа родителей, а также условий их выращивания. Повышение температуры от +25°C до +30°C ускоряет элиминацию хромосом *H. bulbosum* (Humphreys, 1978; Pickering, Morgan, 1985; Gernand et al., 2006). Элиминация хромосом начинается уже в анафазе зиготы, при этом в каждом делении теряется до трех хромосом (Bennet et al., 1976). Цитоэмбриологические исследования различных стадий развития зародышей предоставили новую информацию и привели к разработке научных основ метода получения гаплоидов. Результаты этих исследований не только подтвердили элиминацию хромосом луковичного ячменя, но и выявили критические периоды развития зародыша, сроки гибели эндосперма и необходимость дальнейшего культивирования эмбрионов на искусственной питательной среде для завершения процесса развития и прорастания. Применение технологии *embryo rescue* обеспечило на следующем этапе повышение эффективности метода и его дальнейшее использования в селекционном процессе

(Konzak et al., 1951; Bhojwani, Dantu, 2013; Filipis, 2014; Lulsdorf et al., 2014; Sahijram, Rao, 2015).

В работе Sanie с коллегами (Sanie et al., 2011) установлено, что селективная элиминация хромосом *H. bulbosum* опосредована утратой одного из видов гистонового белка H3(CENH3) в центромере. Потеря функции центромера приводит к тому, что хромосомы луковичного ячменя не прикрепляются к веретену деления, они формируют микроядра и дегенерируют. Авторы изучили механизм, лежащий в основе селективной элиминации хромосом на ранних стадиях развития зародышей и роль специфического гистона центромер CENH3. Они заключают, что: 1) инактивация центромер в хромосомах *H. bulbosum* направляет митоз-зависимый процесс селективной элиминации хромосом в скрещиваниях *H. vulgare* × *H. bulbosum*; 2) инактивацию центромеры вызывает потеря гистона CENH3, а не сайленсинг соответствующего гена (Sanie et al., 2011).

Элиминация хромосом опылителя может происходить как во время митоза, так и в интерфазе (Gernand et al., 2006; Sanie et al., 2011). Интерфазная элиминация связана с разделением геномов, «отчуждением» хроматина отцовского родителя, формированием микроядер и их дегенерацией. Элиминация может сопровождаться структурными перестройками хромосом элиминирующего генома, вызывающими нарушение в расхождении хромосом в митозе с последующим формированием микроядер (Sanie et al., 2011).

Несовместимость при скрещивании обыкновенного и луковичного ячменя контролируется геном(-ами), локализованными в 7-ой хромосоме обыкновенного ячменя, который подавляет прорастание пыльцы и рост пыльцевых трубок луковичного ячменя. Наблюдается гомеологичность 7-ой хромосомы ячменя и хромосом пшеницы 5-ой группы сцепления, на которых локализованы три доминантных гена, контролирующих несовместимость при скрещивании пшеницы с рожью (Pickering, 1983). Степень элиминации хромосом *H. bulbosum* при скрещивании с *H. vulgare* зависит, прежде всего, от соотношения родительских геномов. Реципрокные скрещивания *H. vulgare* и *H. bulbosum* одного уровня плоидности (соотношение геномов 1^v : 1^b) приводят, как правило, к получению гаплоидных и дигаплоидных растений культурного ячменя. Растения в потомстве комбинаций с соотношением геномов 1 *vulgare* : 2 *bulbosum* являются стабильными гибридами (Kasha, Sadasivaiah, 1971; Lange, 1971).

Генотип растения-опылителя и условия выращивания донорных растений влияют на степень элиминации хромосом (Simpson et al, 1980; Pickering, 1983; Thörn, 1992; Chistyakova, 2000; Ignatova, 2011). Выход гибридов в зависимости от опылителя варьирует от 0 до 50%. Генотип обыкновенного ячменя влияет на степень дифференциации зародышей. В опытах с 13 клонами *H. bulbosum* (2n) и 6 сортами обыкновенного ячменя (2n) показа-

но, что выход гаплоидных растений зависит от генотипов обоих родителей, а также от особенностей их взаимодействия между собой. При скрещивании обыкновенного ячменя сорта Emig образуются нестабильные гибриды, у которых хромосомы *H. bulbosum* элиминируют в последующих поколениях. В то же время гибридизация сорта обыкновенного ячменя Vada приводит к получению стабильных гибридов (Simpson et al, 1980).

В засушливых условиях Поволжья эффективность гибридизации обыкновенного и луковичного ячменя связана не только с обратимыми и необратимыми нарушениями, проявляющимися в отдаленных скрещиваниях, но и влиянием температуры и влажности воздуха на прохождение всех этапов развития зародыша и элиминацию хромосом луковичного ячменя. В условиях низкой влажности и повышенных температур, складывающихся в период опыления и формирования зародышей, элиминация хромосом луковичного ячменя является абсолютной. Гибридные растения выявляли в единичных случаях при выращивании донорных растений в теплице (Djatchouk, 2003).

Протоколы получения гаплоидных растений ячменя методом «*bulbosum*» представлены в работах: Jensen (1977), Kasha (2005), Houben, (2011), Ignatova (2011).

Получение гаплоидов пшеницы

Возможность использования метода селективной элиминации хромосом для получения гаплоидов у других видов при обнаружении у них соответствующих опылителей была предсказана К. Дж. Кейша и К. Н. Као (Kasha, Kao, 1970). Об успешном использовании *H. bulbosum* для получения гаплоидов мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L. ($2n = 6x = 42$) сообщил И. Р. Бэркли (Barclay, 1975). При скрещивании сорта пшеницы Chinese Spring с диплоидным или тетраплоидным луковичным ячменем происходило двойное оплодотворение. Спустя 14–18 суток после опыления фиксировали первые признаки дегенерации эндосперма, в связи с чем возникла необходимость применения технологии «спасения» зародышей (*embryo rescue*). Цитологический анализ 50 растений из 70 полученных показал, что они имеют гаплоидный набор хромосом, независимо от уровня пloidности луковичного ячменя. Однако, скрещивание пшеницы с *H. bulbosum* ограничивается лишь немногими генотипами и контролируется локусами *Kr1*, *Kr2*, *Kr3* и *Kr4* на хромосомах 5A, 5B, 5D и 1A соответственно (Jalani, Moss, 1980; Sitch, Snape, 1985; Zheng, Luo, 1992). Гены-ингибиторы скрещиваемости не влияют на прорастание пыльцы и скорость роста пыльцевых трубок до микропиле. Число пыльцевых трубок, достигших микропиле, у «отзывчивых» генотипов было значительно большим.

Скрещивание пшеницы с *H. bulbosum* не нашло применения в селекционной практике из-за чувствительности пыльцы к генам-ингибиторам скрещиваемости. Сорт Chinese Spring обладает рецессивными аллелями скрещиваемости *kr1* и *kr2*. Рецессивный аллель гена скрещиваемости *kr1* Chinese Spring был перенесен в европейские сорта пшеницы путем получения линий с замещениями хромосомы 5B, что обеспечило получение гаплоидных растений у сортов мягкой пшеницы Highbury, Siccio и Sappo (Snape, Simpson, 1980). Однако, длительные временные затраты по переносу рецессивных аллелей скрещиваемости препятствовали широкому использованию такого подхода в селекционной практике.

Существенный прогресс в совершенствовании метода селективной элиминации хромосом у пшеницы достигнут благодаря подбору других видов-опылителей. Скрещивания (пшеница × кукуруза) явились приемлемой альтернативой скрещиваниям пшеница × луковичный ячмень из-за меньшей чувствительности пыльцы кукурузы к генам-ингибиторам скрещиваемости (Laurie, Bennet, 1986, 1988a; Morshedi, Darvey, 1995; Lei et al., 1996; 1988b). Первое сообщение о формировании зародышей при гибридизации пшеницы и кукурузы было приведено в работе (Zenkteler, Nitzsche, 1984). Позднее эти результаты были подтверждены Д. А. Лаури и М. Д. Беннетт (Laurie, Bennet, 1986). Цитологические исследования показали, что пыльца кукурузы успешно прорастает на рыльце пшеницы, достигает зародышевого мешка, и происходит оплодотворение. Гибридная зигота содержит 21 хромосому пшеницы и 10 хромосом кукурузы. Гибридная зигота кариотипически нестабильна, так как хромосомы кукурузы не прикрепляются к веретену деления. Центромеры не прикрепляются к микротрубочкам веретена из-за прогрессивной потери активности центромер. В результате хромосомы кукурузы элиминируют через три-четыре митоза, что приводит к формированию гаплоидного зародыша пшеницы ($2n = 21$). Зародыши, состоящие из восьми и более клеток, уже не содержат хромосом кукурузы. Такие зародыши всегда абортированы по причине ранней дегенерации эндосперма, если они остаются на материнском растении (Laurie, Bennet, 1988a, 1989; Laurie, 1989a).

Скрещивания пшеницы с кукурузой являются эффективными для получения гаплоидов у большинства пшеничных генотипов, в том числе, у трудно отзывчивых в культуре пыльников *in vitro* (Chaudhary et al., 2002; Pratap et al., 2006). Выход гаплоидных эмбрионов в отдельных скрещиваниях достигает 53% (Morshedi, Darvey, 1995). Регуляторы роста (например, ауксины) играют критическую роль в развитии зародыша. Обработка раствором 2,4-Д (инъекция в верхнее междоузлие или опрыскивание опыленных колосьев) способствуют развитию и дифференциации гаплоидных зародышей (Matzk, Mahn, 1994; Suenaga et al., 1997).

При скрещивании твердой пшеницы с кукурузой зигота имеет 24 хромосомы (14 – от твердой пшеницы и 10 – от кукурузы). Уровень пloidности не является барьером для получения гаплоидных зародышей (Ahmad, Chowdhry, 2005). Однако эффективность применения пыльцы кукурузы для получения гаплоидов твердой пшеницы в большинстве опытов составила 1-2 ДН-линии на 100 опыленных цветков, что связывают с отсутствием D-генома у этого вида (Cherkaoui et al., 2000; Devaux, Pickering, 2005).

Более высокая эффективность получения гаплоидов и независимость результатов от генотипа материнской формы в скрещиваниях (пшеница × кукуруза) по сравнению с культурой пыльников и техникой «bulbosum» послужили основой их широкого применения в селекционной практике (Devaux, Pickering 2005; Jauhar et al., 2008; Weyen, 2009; Humphreys, Knox, 2015).

Успешная индукция гаплоидов у мягкой пшеницы достигнута при использовании в качестве опылителя африканского проса – *Pennisetum glaucum* L. (= *Pennisetum americana* L.). При скрещивании Chinese Spring (*kr1*, *kr2*) с африканским просом (генотип Tift23BE) завязываемость зерновок составила 28,6% от числа опыленных цветков. Определение чисел хромосом в метафазах зигот подтвердило гибридное происхождение зародышей (21 хромосома пшеницы + 7 хромосом проса). Гибридные зародыши были кариотипически нестабильны и теряли хромосомы африканского проса в первых четырех делениях. В скрещиваниях сорта Highoury, отличающегося от Chinese Spring наличием в локусах доминантных аллелей генов скрещиваемости, получено 31% завязываемости зерновок, что достоверно не отличалось от скрещиваний с Chinese Spring (Laurie, 1989b).

Показана возможность использования пыльцы сорго *Sorghum bicolor* L. для получения гаплоидов мягкой пшеницы с применением цитозембриологического контроля процесса элиминации хромосом. Растения мягкой пшеницы сорта Chinese Spring опыляли пыльцой сорго сорта S9B ($2n = 2x = 20$). В 69 из 100 опыленных цветков, зафиксированных через 48 часов после опыления, имелся либо зародыш или эндосперм, либо зародыш и эндосперм. Частота одинарного или двойного оплодотворения варьировал от 50 до 91. Зиготы обнаружены в зародышевом мешке через 25–27 часов после опыления. Они содержали 21 крупную хромосому пшеницы и 10 мелких хромосом сорго. Уже в трехклеточном состоянии зародыши имели только 21 пшеничную хромосому, что указывает на быструю элиминацию хромосом сорго (Laurie, Bennet, 1988b). Однако при скрещивании пшеницы и сорго проявляется сильно выраженная генотипическая зависимость, частота сформировавшихся зародышей зависела от генотипа пшеницы (Inagaki, Mujeeb-Kazi, 1995).

Проводится поиск других видов-опылителей, повышающих эффективность получения гаплоидных растений пшеницы. Дикорастущий вид Императа цилиндрическая

(*Imperata cylindrica* (L.) Raeusch.) с успехом используется для массового получения полигаплоидов пшеницы и тритикале (Pratap et al., 2005; Kishore et al., 2011; Rather, 2012; Tayeng et al., 2012; Chaudhary et al., 2013, 2014, 2016). Использование этого вида в качестве опылителя имеет ряд преимуществ по сравнению с кукурузой – длительность цветения, отсутствие необходимости ежегодного посева опылителя, нечувствительность к действию генов-ингибиторов скрещиваемости пшеницы (Kishore et al., 2011). Хромосомы этого опылителя обнаружены только в зиготе, они элиминируют из ядра уже во время первого клеточного деления. Возможная причина их элиминации – несовместимость материнского и отцовского родителя. Отсутствие активности кинетохора обусловлено неспособностью чужеродных хромосом выстраиваться в экваториальной плоскости. Цитологические исследования выявили нарушения формирования эндосперма в таких скрещиваниях. Применение молекулярно-цитогенетического анализа (GISH) показало, что сформировавшиеся зародыши были гибридного, но не апомиктичного происхождения (Komeda et al., 2007).

Успешность получения гаплоидов зависит как от генотипов материнской формы, так и опылителя. Подбор «отзывчивых» генотипов пшеницы и генетическое разнообразие *I. cylindrica* позволили существенно повысить эффективность гаплопродукции пшеницы (Chaudhary et al., 2013; Rather et al., 2014). Для идентификации роли отдельных хромосом, влияющих на успех гаплопродукции в скрещиваниях с *I. cylindrica*, в качестве материнских форм привлекали представителей различных видов: мягкую пшеницу (AABBDD), *Aegilops tauschii* Coss. (DD), линии твердой пшеницы (AABB), линии твердой пшеницы с замещениями на хромосомы D-генома, линии тритикале с замещениями AABBDRD/R, ячмень (*Hordeum vulgare*, HH) и рожь (*Secale cereale* L., RR). Результаты скрещиваний показали, что гаплоидные растения были получены только у мягкой пшеницы, *Aegilops tauschii* и линий тритикале, содержащих хромосомы D-генома. Характерно, что наибольшая частота формирования гаплоидных зародышей была обнаружена у линий с замещениями по 7D хромосоме. Авторы заключают, что ключевую роль в индукции гаплоидных растений в скрещиваниях с *Imperata cylindrica* играет геномная и генотипическая специфичность. Пусковым механизмом селективной элиминации хромосом и формирования гаплоидных зародышей служит D-геном, а некоторые его хромосомы (главным образом, 7D) могут улучшать скрещиваемость с *I. cylindrica* (Mukai et al., 2015).

Получение гаплоидов тритикале

Для получения гаплоидов тритикале успешно применяется метод культуры пыльников (Ignatova, 2011; Дуа-

etchouk et al., 2012; Krzewska et al., 2012; Wedzony et al., 2015) и изолированных микроспор (Oleszezuk et al., 2004; Eudes, Chugs, 2009; Lantos et al., 2014). Существенным ограничением для практического использования этого метода является высокая частота альбинизма среди регенерантов. Кроме того, в потомствах андрогенных растений тритикале были идентифицированы анеуплоиды (в основном нуллисомики), а также генотипы с другими абберациями, включая транслокации. Изучение митозов в кончиках корней растений-регенерантов показал, что в соматических клетках этих растений геном ржи более часто вовлекается в хромосомные преобразования, чем геном пшеницы (Charmet et al., 1986; Oleszezuk et al., 2011). Изменения уровня метилирования ДНК являются дополнительным фактором, влияющим на фенотипическую нестабильность ДН-линий. Выявлено, что уровень метилирования ДНК у ДН-линий, полученных у сорта тритикале *Vogo*, был ниже, чем у донорного растения. Тем не менее, после нескольких половых поколений уровень метилирования ДНК восстанавливался до исходного (Machezynska et al., 2014).

Альтернативным методом получения гаплоидов тритикале является отдаленная гибридизация. Так, гибридизация с луковичным ячменем оказалась малоэффективной для большинства генотипов (Lehmann, Krollov, 1991). Скрещивания тритикале × кукуруза приводят к селективной элиминации хромосом кукурузы и получению гаплоидных растений тритикале (Rogalska et al., 1996; Wedzony, 1998; Pratar et al., 2005). Эффективность получения гаплоидов в этом скрещивании оказалась ниже, по сравнению с культурой пыльников, и зависела от генотипа. Тем не менее этот метод рекомендуется использовать в селекционных программах для получения гаплоидов у генотипов, слабо отзывчивых в культуре пыльников (Wedzony et al., 2001; Pratar et al., 2006).

Высокая эффективность метода селективной элиминации хромосом по сравнению с методом культуры пыльников выявлена в скрещивании с кукурузой сорта *Madgran local* с двумя типами гибридов: тритикале × пшеница и тритикале × тритикале (Pratar et al., 2006). При скрещивании с кукурузой частота формирования гаплоидных зародышей была выше как для гибридов тритикале × пшеница (20,4%), так и гибридов тритикале × тритикале (17%). Индукция каллусов в культуре пыльников для этих гибридов составила всего 1,6% и 1,4% соответственно. Существенно, что четыре гибрида F_1 (тритикале × пшеница) и три гибрида (тритикале × тритикале) не формировали эмбрионов в культуре пыльников. В то же время, при скрещивании с кукурузой у всех гибридов формировались гаплоидные зародыши, а среди регенерантов были только зеленые растения. Как и при получении гаплоидов пшеницы, выявлена эффективность применения в качестве опылителя *I. cylindrica* по показателям частоты формирования зародышей и регенерации растений (Kishore et al., 2011).

Возможности оптимизации метода получения гаплоидных растений

Для повышения эффективности получения гаплоидов злаков методом селективной элиминации хромосом используются различные подходы. Применение *in vivo* колхицина (0,02%) положительно влияло на частоту сформированных зародышей и выход гаплоидных растений у мягкой пшеницы (Tayeng et al., 2012).

При получении гаплоидов мягкой пшеницы в скрещиваниях с кукурузой определена эффективность применения различных обработок растений регуляторами роста. Так, применение раствора 2,4-Д в концентрации 100 мг/л в течение трех суток после опыления (один раз в сутки) позволило увеличить частоту гаплоидных зародышей. Генотип кукурузы, используемый в качестве опылителя, не повлиял на этот показатель (Lei, 1996).

В опытах Д. А. Лаури и М. Д. Беннетт завязи пшеницы были помещены на питательную среду МС с добавлением 6% сахарозы и 0,1 мг/л 2,4-Д через два дня после опыления. Зародыши вычленили через три недели культивирования, их выживаемость составила 26,9% в сравнении с 0,17% при их формировании *in vivo* (Laurie, Bennet, 1988a).

При культивировании срезанных побегов в контролируемых условиях выявлена высокая эффективность формирования гаплоидных эмбрионов мягкой пшеницы. Побегов с опыленными колосьями культивировали при оптимальной температуре (22°C–23°C днем и 16°C–17°C в ночное время) и влажности воздуха 70%. Питательный раствор содержал 40 г/л сахарозы, 10 мг/л нитрата серебра, 3 г/л фосфата кальция и 8 мг/л сернистой кислоты. Зародыши помещали на питательную среду через 14 дней культивирования побегов. Выход гаплоидных зародышей составлял 31,6% по сравнению с 9,6% в контроле (выращивание интактных растений в неконтролируемых полевых условиях). По мнению авторов, в этих условиях фосфат кальция способствует усилению транспорта питательных веществ из листьев и стебля к завязям и улучшает питание зародышей. Разработанная технология успешно используется для получения ДН-линий пшеницы в массовых количествах (Jian et al., 2008).

Высокая эффективность метода получения гаплоидов ячменя была достигнута при использовании культуры опыленных цветков и побегов на модифицированной среде N6, содержащей 0,5 мг/л кинетина и 1,2 мг/л 2,4-Д. Эффективность гаплопродукции составила 41,6% в культуре изолированных цветков и 13,5% для культуры побегов (Chen, Haays, 1989).

Большой вклад в разработку практических и теоретических основ метода сделан отечественными исследователями.

Проведены обширные исследования по улучшению условий опыления и формирования зерновок. Так, обработка пролином кастрированных колосьев обыкновенного ячменя позволяет не только повысить процент завязываемости зерновок, но и выход гаплоидных растений. После опыления рекомендовано обрабатывать цветки смесью гибберелловой кислоты (ГК) в концентрации 75 мг/л и 15 мг/л борной кислоты и пролином (200 мг/л) (Ignatova, 2011). Холодовая обработка зародышей *in vivo* перед эксплантацией на питательную среду спустя 8–10 дней после опыления ускоряет дифференциацию зародышей и улучшает их способность к прорастанию (Chistyakova, 2000).

Для упрощения процедуры получения гаплоидов пшеницы и снижения затрат изучены различные способы кастрации и опыления колосьев и их влияние на частоту оплодотворения: а) цветочные чешуи кастрированных цветков оставляли неповрежденными, б) цветочные чешуи подрезали на уровне рылец, в) цветки с неповрежденными цветочными чешуями обрабатывали раствором гиббереллина (75 мг/л) через два часа после опыления, г) цветки с подрезанными цветочными чешуями обрабатывали раствором гиббереллина (75 мг/л) через два часа после опыления. Оплодотворение происходило во всех четырех вариантах, при этом 20,2% семян имели только зародыш, 2,5% – только эндосперм и 9% – как зародыш, так и эндосперм. Наибольшая частота оплодотворения была обнаружена в цветках с неповрежденными цветочными чешуями (Laurie, 1989a).

Применение пыльцы, хранящейся при ультранизких температурах, позволяет проводить работу по получению гаплоидов мягкой пшеницы при отсутствии свежесобранной пыльцы. Пыльца африканского проса сохраняла свою жизнеспособность более стабильно по сравнению с кукурузой, а выход зародышей не отличался от такового при опылении свежей пыльцой (Inagaki et al., 1997). Использование хранившейся при различных режимах пыльцы *I. cylindrica* обеспечило успешность получения гаплоидных растений в тех местах, где этот опылитель не произрастает в природных условиях. Среди применяемых режимов (–80°C, –20°C и +4°C) наибольший положительный эффект обеспечило хранение пыльцы при –20°C. Хранившаяся при таком режиме пыльца могла быть использована для опыления пшеницы в течение месяца (Rather, 2012).

Проведен сравнительный анализ эффективности получения гаплоидов пшеницы при использовании различных опылителей (кукуруза и африканское просо), различных способов кастрации колосьев (вручную на растении, вручную на срезанных побегах, стерилизация пыльцы горячей водой). В скрещивании с кукурузой при использовании свежесобранной пыльцы частота формирования зародышей составила 18,9–20,4%, с просом – 19,7–35,6% (Inagaki et al., 1997). При опылении хранившейся пыльцой этот показатель резко снижался при использо-

вании пыльцы кукурузы (до 2,8–8,5%) и не изменялся при использовании пыльцы африканского проса, которая более устойчива к длительному хранению, и ее использование не снижает выход гаплоидных зародышей. Важно отметить, что замена процедуры кастрации цветков на стерилизацию собственной пыльцы пшеницы горячей водой не снизила выход гаплоидных зародышей. При применении такой методики затрачивается лишь несколько минут на стерилизацию пыльцы большой партии колосьев, тогда как обычная кастрация требует 3–5 минут на один колос. Такие технологии позволили усовершенствовать способ массового получения гаплоидных растений в отдаленных скрещиваниях (Inagaki et al., 1997).

Заключение

Массовое получение гаплоидных растений у экономически значимых зерновых культур основано на трех основных методах – культуре пыльников, культуре изолированных микроспор и отдаленной гибридизации с последующей селективной элиминацией хромосом вида-опылителя. Совершенствование метода селективной элиминации хромосом позволило создать многочисленные сорта зерновых культур в Европе, Австралии, Канаде, США, Китае, Индии и других странах (обзор Srivastava, Singh, 2018). Ячмень луковичный *Hordeum bulbosum* успешно используют для получения гаплоидов ячменя. У других видов (мягкой и твердой пшеницы, тритикале) его применение ограничено чувствительностью пыльцы к генам-ингибиторам скрещиваемости. Для мягкой пшеницы и тритикале в качестве опылителей успешно используются кукуруза и дикорастущий вид *Imperata cylindrica*. Поиск других видов-опылителей, нечувствительных к генам-ингибиторам скрещиваемости и эффективных по частоте формирования зародышей и регенерации растений, может привести к созданию генотип-независимых гаплоидных технологий и их практическому использованию.

№ Государственного задания 520-2019-0001.

References/Литература

- Ahmad J, Chowdhry MA (2005) Effects of different ploidy level in wheat (hexaploids and tetraploids) on seed and embryo formation and haploid production in wheat × maize crosses. *J. Biol. Sci.* 8: 1758–1761.
- Barclay IR (1975) High frequencies of haploid production in wheat (*Triticum aestivum* L.) by chromosome elimination. *Nature* 256: 410–411.
- Bennet MD, Finch RA, Barclay TR (1976) The time and mechanism of chromosome elimination in *Hordeum* hybrids. *Chromosoma (Berl.)* 54: 175–200.
- Bhojwani SS, Dantu PK (2013) Zygotic embryo culture. *Plant Tissue Culture: An Introductory Text* p. 327–340. DOI: 10.1007/978-81-322-1026-9_11

- Charmet G, Bernard S, Bernard M (1986) Origin of aneuploid plants obtained by anther culture in triticale. *Canad. J. Genet. Cytol.* 28 (3): 444–452. DOI: 10.1139/g86-067
- Chaudhary HK, Singh S, Sethi GS (2002) Interactive influence of wheat and maize genotypes on haploid induction in winter × spring wheat hybrids. *J. Genet. Breed.* 56: 259–266.
- Chaudhary HK, Tayeng T, Kaila V, Rather SA (2013) Enhancing the efficiency of wide hybridization mediated chromosome engineering for high precision crop improvement with special reference to wheat × *Imperata cylindrica* system. *Nucleus* 56 (1): 7–14. DOI: 10.1007/s13237-013-0077-5
- Chaudhary HK, Kaila V, Rather SA (2014) Distant hybridization and doubled haploid breeding. In: Alien Gene Transfer in Crop Plant: Innovations, Methods and Risk Assessment. A Pratap, J Kumar (eds.) 1: 143–164. DOI: 10.1007/978-1-1614-8585-8_6
- Chaudhary HK, Kaila V, Ratner SA et al. (2016) Chromosome engineering for high precision crop improvement. In: Gene Pool Diversity and Crop Improvement. VR Rajpal et al. (eds.) p. 291–323. DOI: 10.1007/978-3-319-27096-8_10
- Chen FQ, Hays PM (1989) A comparison of *Hordeum bulbosum*-mediated haploid production efficiency in barley using in vitro floret and tiller culture. *Theor. and Appl. Genet.* 77: 701–704.
- Cherkaoui S, Lamsaouri O, Chlyah A, Chlyah H (2000) Durum wheat × maize crosses for haploid wheat production: influence of parental genotypes and various experimental factors. *Plant Breed.* 119: 31–36.
- Chistyakova VN (2000) Haploids of incomplete wheat-agropyron amphidiploids, soft wheat and barley: production and utilization. Moscow: MAKS Press. 355 p. [In Russian] (Чистякова В.Н. Гаплоиды неполных пшенично-пырейных амфидиплоидов, мягкой пшеницы и ячменя: получение и использование. М.: МАКС Пресс, 2000. 355 с.).
- Davies DR (1974) Chromosome elimination in inter-specific hybrids. *Heredity* 32: 267–270.
- Devaux P, Pickering R (2005) Haploids in the improvement of *Poaceae*. In: Biotechnology in Agriculture and Forestry. CE Palmer, WA Keller, KJ Kasha (eds.) 56: 215–242. DOI: 10.1007/3-540-26889-8_11
- Dunwell JM (2010) Haploids in flowering plants: origins and exploitation. *Plant Biotech. J.* 8: 377–424.
- Dyatchouk TI (2003) Technological and breeding aspects of haploidy on the example of wheat and barley: dissertation of doctor biological science. Saratov: 280 p. [In Russian] (Дьячук Т.И. Технологические и селекционные аспекты гаплоидии на примере пшеницы и ячменя: дис. ... доктора биол. наук. Саратов, 2003. 280 с.).
- Dyatchouk TI, Akinina VN, Khomyakova OV, Pominov AV (2012) Haploidy in the triticale breeding. *Grain Economy of Russia* 2 (20): 25–29 [In Russian] (Дьячук Т.И., Акинина В.Н., Хомякова О.В., Поминов А.В. Гаплоидия в селекции тритикале // Зерновое хозяйство России. 2012. Т. 2. № 20. С. 25–29).
- Eudes F, Chugs A (2009) An overview of triticale doubled haploids. In: Advances in Haploid Production in Higher Plants. A Toyraev et al. (eds.) p. 87–113.
- Filippis LF (2014) Crop improvement through tissue culture. In: Improvement of Crops in the Era of Climatic Changes. P Ahmad et al. (eds.) 1: 289–346. DOI: 10.1007/978-1-4614-8830-9_12
- Gernand D, Rutten T, Pickering R, Houben A (2006) Elimination of chromosomes in *Hordeum vulgare* × *Hordeum bulbosum* crosses at mitosis and inrephase involves micronucleus formation and progressive heterochromatinization. *Cytogenet. Genome Res.* 114: 169–174.
- Gosal SS, Wani SH (2018) Cell and tissue culture approaches in relation to crop improvement. In: Biotechnologies of Crop Improvement. S.S. Gosal, S.H. Wani (eds.) 1: 1–42. DOI: 10.1007/978-3-319-78283-6_1
- Gupta SB (1969) Duration of mitotic cycle and regulation of DNA replication in *Nicotiana plumbaginifolia* and a hybrid derivative of *N. tabacum* showing chromosome instability. *Can. J. Genet. Cytol.* 11: 133–142.
- Hazarika RR, Mishra VK, Chaturved R (2013) In vitro haploid production – a fast and reliable approach for crop improvement. In: Crop Improvement Under Adverse Conditions. J Tutja, SS Gills (eds.) p. 171–211. DOI: 10.1007/978-1-46-14-4633-0_8
- Houben A, Saney M, Pickering R (2011) Barley doubled-haploid production by uniparental chromosome elimination. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 104: 321–327. DOI: 10.1007/s11240-010-9856-8
- Humphreys MB (1978) Chromosome instability in *Hordeum vulgare* × *Hordeum bulbosum* hybrids. *Chromosoma* 65: 301–307.
- Humphreys DG, Knox RE (2015) Doubled haploid breeding in cereals. In: Advances in Plant Breeding: Breeding Biotechnology and Molecular Tools. Al-Khayri et al. (eds.) p. 241–288.
- Ignatova SA (2011) Cell biotechnologies in crop production, genetic and breeding: tasks, opportunities, development of in vitro systems. Odessa: Astroprint. 224 p. [In Russian] (Игнатова С.А. Клеточные биотехнологии в растениеводстве, генетике и селекции возделываемых растений: задачи, возможности, разработки систем in vitro: монография. Одесса: Астропринт, 2011. 224 с.).
- Inagaki MN, Mujeeb-Kazi (1995) Comparison of polyhaploid production frequencies in crosses of hexaploid wheat with maize, pearl millet and sorghum. *Breed. Sci.* 45: 157–161.
- Inagaki MN, Nagamine T, Mujeeb-Kazi (1997) Use of pollen storage and detached pollen culture in wheat polyhaploid production through wide crosses. *Cereal Research Com.* 25: 7–13.
- Ishii T, Ueda T, Tanaka H, Tsujimoto H (2010) Chromosome elimination by wide hybridization between *Triticeae* or oat plant and pearl millet: pearl millet chromosome dynamics in hybrid embryo cells. *Chromosome Research* 18: 821–831.
- Jalani BP, Moss JP (1980) The site of action of the crossability genes (Kr1, Kr2) between *Triticum* and *Secale*. 1. Pollen germination, pollen tube growth and number of pollen tubes. *Euphytica* 29: 571–579.
- Jauhar PP, Xu SS, Baenziger PS (2008) Haploidy in cultivated wheats: induction and utility in basic and applied research. *Crop Sci.* 49: 737–755.
- Jensen CJ (1977) Barley monploids and doubled monploids. In: Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture. J Reinert, YPS Bajaj (eds.) p. 316–343.
- Jian GU, Kun LIU, Shaoxiang LI et al. (2008) Study of in vitro culture of cut plants in wheat embryo induction by wheat × maize cross. *Front Agric. China* 2 (4): 391–395. DOI: 10.1007/s11703-008-0070-y
- Jin W, Melo JR, Nagaki K et al. (2004) Maize centromeres: organization and functional adaptation in the genetic background of oat. *Plant Cell* 16: 571–581.
- Kasha KJ (2005) Chromosome doubling and recovery of doubled haploid plants. In: Haploids in Crop Improvement. D Palmer, W Keller, K Kasha (eds.) p. 123–152.
- Kasha KJ, Kao KN (1970) High frequency haploid production in barley (*H. vulgare* L.). *Nature* 225: 874–876.
- Kasha KJ, Sadasivaiah RA (1971) Genome relationships between *Hordeum vulgare* L. and *H. bulbosum* L. *Chromosoma*. 35:264–287
- Kishore N, Chaudhary K, Chahota R et al. (2011) Relative efficiency of the maize-and *Imperata cylindrica*-mediated chromosome elimination approaches for induction of haploids of wheat-rye derivatives. *Plant Breed.* 130: 192–194.
- Komeda N, Chaudhary K, Suzuki G, Mukai Y (2007) Cytological evidence for chromosome elimination in wheat × *Imperata cylindrica* hybrids. *Genes Genet. Syst.* 82: 241–248.
- Konzak CF, Randolph LE, Ensen NE (1951) Embryo culture of barley species hybrids, cytological studies of *Hordeum sativum* × *Hordeum bulbosum*. *J. Hered.* 42: 124–134.
- Krzewska M, Czyczylo-Mysza I, Dubas E et al. (2012) Quantitative trait loci associated with androgenic responsiveness in triticale (× *Triticosecale* Wittm.) anther culture. *Plant Cell Rep.* 31: 2099–2108. DOI: 10.1007/s00299-012-1320-2
- Kuckuck H (1934) Artkreuzung by Gerste. Zuchter: Berlin, 6: 270–271.
- Lange W (1971) Crosses between *Hordeum vulgare* L. and *Hordeum bulbosum* L. Production, morphology and meiosis of hybrids, haploids and dihaploids. *Euphytica* 20: 14–29.
- Lantos C, Bona L, Boda K, Pauk J (2014) Comparative analysis of in vitro anther- and isolated microspore culture in hexaploid Triticale (× *Triticosecale* Wittmack) for androgenic parameters. *Euphytica* 197: 27–37. DOI: 10.1007/s10681-013-1031-y

- Laurie DA, Bennet MD (1986) Wheat × maize hybridization. *Can. J. Genet. Cytol.* 28: 313–316.
- Laurie DA, Bennet MD (1988a) The production of haploid wheat plants from wheat × maize crosses. *Theor. Appl. Genet.* 76: 393–397.
- Laurie DA, Bennet MD (1988b) Cytological evidence for fertilization in hexaploid wheat × sorghum crosses. *Plant Breed.* 100: 73–82.
- Laurie DA (1989) The timing of chromosome elimination in hexaploid wheat × maize crosses. *Genome* 32: 953–961.
- Laurie DA (1989a) Factors affecting fertilization frequency in crosses of *Triticum aestivum* cv. Highbury × *Zea mays* cv. «Seneca 60». *Plant Breed.* 103: 133–140.
- Laurie DA (1989b) The frequency of fertilization in wheat × pearl millet crosses. *Genome* 32: 1063–1067.
- Lei ZS, Zhou Y, He XC et al. (1996) Efficient wheat haploid production by wheat × maize crosses. 5th Int. Wheat Conference. June 10–14: Ankara, Turkey: p. 374.
- Lehmann C, Krolov KD (1991) Experiments on haploid production from tetraploid triticales by the *Hordeum bulbosum* system and anther culture. *Cereal Research Communications* 19: 283–290.
- Linde-Laursen I, von Bothner R (1999) Aberrant meiotic divisions of a *Hordeum lechleri* × *Hordeum vulgare* hybrids. *Hereditas* 118: 145–153.
- Liu D, Zxang H, Zxang L et al. (2014) Distant hybridization: a tool for interspecific manipulation of chromosomes. In: Alien Gene Transfer in Crop Plants. A Pratap, J Kumar (eds.) 1: 25–42. DOI: 10.1007/978-1-4614-8585-8_2
- Lulsdorf M, Ferrie A, Slater SMH, Yuan HY (2014) Methods and role of embryo rescue technique in alien gene transfer. In: Alien Gene Transfer in Crop Plants. A Pratap, J Kumar (eds.) 1: 77–103. DOI: 10.1007/978-1-4614-8585-8_4
- Machezynska J, Orlovska K, Mankowski DR et al. (2014) DNA methylation changes in triticales due to in vitro culture plant regeneration and consecutive reproduction. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 119: 289–299. DOI: 10.1007/s11240-014-0533-1
- Matzk F, Mahn A (1994) Improved techniques for haploid production in wheat using chromosome elimination. *Plant Breed.* 113: 125–129.
- Mochida K, Tsujimoto H, Sasakuma T (2004) Confocal analysis of chromosome behavior in wheat × maize zygotes. *Genome* 47: 199–205.
- Morshedi AR, Darvey NL (1995) High frequency of embryos in wheat × maize crosses. *Sabao J.* 27: 17–22.
- Mukai Y, Okamoto G, Kiryu S et al. (2015) The D-genome plays a critical role in the formation of haploid *Aegilops tauschii* through *Imperata cylindrical* mediated uniparental chromosome elimination. *Nucleus* 58 (3): 199–206.
- Oleszczuk S, Sova S, Jimmy J (2004) Direct embryogenesis and green plant regeneration from isolated microspores of hexaploid triticales (× *Triticosecale* Wittmack) cv. Bogo. *Plant Cell Reports* 22: 885–893.
- Oleszczuk S, Jimmy J, Rabiza-Swider J, Lukaszewski AJ (2011) Aneuploidy among androgenic progeny of hexaploid triticales (× *Triticosecale* Wittmack). *Plant Cell Rep.* 30: 575–586. DOI: 10.1007/s00299-010-0971-0
- Pickering RA (1983) The influence of genotype on doubled haploid barley production. *Euphytica* 32: 863–876.
- Pickering RA, Morgan PW (1985) The influence of temperature on chromosome elimination during embryo development in cross involving *Hordeum spp.*, wheat (*Triticum aestivum* L.) and rye. *Theor. Appl. Genet.* 70: 199–206.
- Pratap A, Sethi GS, Chaudhary HK (2005) Relative efficiency of different Gramineae genera for haploid induction in triticales and triticales × wheat hybrids through the chromosome elimination technique. *Plant Breed.* 124: 147–153.
- Pratap A, Sethi GS, Chaudhary HK (2006) Relative efficiency of anther culture and chromosome elimination techniques for haploid induction in triticales × wheat and triticales × triticales hybrids. *Euphytica* 15: 339–345. DOI: 10.1007/s10681-006-9120-9
- Rather SA (2012) Pollen viability of *Imperata cylindrical* under varied preservation regimes and interactive influence of the diverse genotypes on polyhaploid induction in bread wheat. *Thesis CSK Hp Agricultural University* 120 p.
- Rather SA, Chaudhary HK, Kaila V (2014) Proportional contribution and potential of maternal and paternal genotypes for polyhaploid induction in wheat × *Imperata cylindrical* chromosome elimination approach. *Cereal Res. Com.* 42 (1): 19–26 DOI: 10.1556/CRC 2013.0038
- Rogalska SM, Mikulski W, Guedes Pinto H et al. (1996) Induction of haploid in triticales (× *Triticosecale* Wittm.) by crossing it with maize (*Zea mays* L.). *Triticale: Today and Tomorrow* 5: 379–382.
- Sahijram S, Rao BM (2015) Embryo rescue in crop improvement. In: Plant Biology and Biotechnology. Bahadar et al. (eds.) 2: 363–383. DOI: 10.1007/978-810322-2283-5_18
- Sanie M, Pickering R, Kumke K et al. (2011) Loss of centromeric histone H3 (CENH3) from centromeres precedes uniparental chromosome elimination in interspecific barley hybrids. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 108: 498–505.
- Simpson E, Snape JW, Finch RA (1980) Variation between *Hordeum bulbosum* genotypes in their ability to produce haploids in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Z. Pflanzenzucht.* 85: 205–211.
- Sitch LA, Snape JW, Firman SJ (1985) Intra chromosomal mapping of crossability genes in wheat (*Triticum aestivum*). *Theor Appl Genet.* 70: 309–314
- Snape JW, Simpson E (1980) Crossability of wheat with *Hordeum bulbosum*. *Ann. Rep. Plant Breed. Inst.* 66 p.
- Snape JW, Simpson E, Parker BB (1986) Criteria for the selection and use of doubled haploid systems in plant breeding. In: Genetic Manipulation in Plant Breeding. W Horn et al. (eds.) p. 217–229.
- Sood S, Dwivedi S (2015) Doubled haploid platform: an accelerated breeding approach for crop improvement. In: Plant Biology and Biotechnology. Bahadar et al. (eds.) 2: 89–111. DOI: 10.1007/978-81-322-2283-5_5
- Srivastava P, Singh NB (2018) Acceleration wheat breeding: doubled haploids and rapid generation advance. In: Biotechnologies of Crop Improvement. SS Gosal, SH Wani (eds.) 1: 437–461. DOI: 10.1007/978-3-319-78283-6_3
- Suenaga K, Marschedi AR, Darvey NL (1997) Haploid production of Australian wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars through wheat × maize (*Zea mays* L.) crosses. *Aust. J. Agr. Res.* 48: 1207–1211.
- Surikov IM, Dunaeva SE (1989) Chromosome elimination by distant hybridization in *Poaceae* and its utilization for haploid production. *Biology Bulletin Review* 50 (2): 158–170 [In Russian] (Суриков И.М., Дунаева С.Е. Элиминация хромосом при отдаленной гибридизации в семействе злаков и ее использование для получения гаплоидов // Ж. общ. Биологии. 1989. Т. 50. № 2. С. 158–170).
- Symko S (1969) Haploid barley from crosses of *Hordeum bulbosum* (2x) by *Hordeum vulgare* (2x). *Can. J. Genet. Cytol.* 11: 602–608.
- Tayeng T, Chaudhary HK, Kishore N (2012) Enhancing doubled haploid production efficiency in wheat (*Triticum aestivum* L.) by in vivo colchicines manipulation in *Imperata cylindrical* mediated chromosome elimination approach. *Plant Breed.* 131: 263–266.
- Thörn EC (1992) The influence of genotype and environment on seed and embryo development in barley (*Hordeum vulgare* L.) after crossing with *Hordeum bulbosum* L. *Euphytica* 59: 109–118.
- Wedzony M, Marcinska I, Ponitka A et al. (1998) Production of doubled haploids in triticales (× *Triticosecale* Wittm.) by means of crosses with maize (*Zea mays* L.) using picloram and dicamba. *Plant Breed.* 117: 211–215.
- Wedzony M, Góral H, Golemiec E (2001) Prospects for breaking genetic barriers in triticales doubled haploid production. *Vortrage fur Pflanzenzucht* 16: 34–39.
- Wedzony M, Forster BP, Golemiec E et al. (2009) Progress in doubled haploid technology in higher plants. In: Advances in Haploid Production in Higher Plants. A Touraev et al. (eds.) p. 1–31.
- Wedzony M, Żur I, Krzewska M et al. (2015) Doubled haploids in triticales. In: Triticales. F Eudes (ed.) p. 111–128. DOI: 10.1007/978-3-319-22551-7_6
- Weyen J (2009) Barley and wheat doubled haploids in breeding. In: Advances in Haploid Production in Higher Plants. A Touraev et al. (eds.) p. 179–186.
- Zheng XH, Luo MS, Yen C, Yang JI (1992) Chromosome location a new crossability gene in common wheat. *Wheat Inf. Serv.* 25: 36–40.
- Zenkeler M, Nitzsche W (1984) Wide hybridization experiments in cereals. *Theor. Appl. Genet.* 68: 311–315.