

ГЕНЕТИКА КУЛЬТУРНЫХ РАСТЕНИЙ И ИХ ДИКИХ РОДИЧЕЙ

Научная статья

УДК 575:631.527:633.111

DOI: 10.30901/2227-8834-2022-1-127-134

**Изучение влияния чужеродных транслокаций на показатели андрогенеза *in vitro* у линий мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.)**Е. М. Тимонова^{1,2}, И. Г. Адонина^{1,2}, Е. А. Салина²¹ Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия² Курчатowski геномный центр Института цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия**Автор, ответственный за переписку:** Екатерина Михайловна Тимонова, eegorova@bionet

Актуальность. Перенос в геном пшеницы генетического материала от диких и культурных злаков, стабилизация полученного материала и создание сорта на его основе является длительным процессом. Применение технологий удвоенных гаплоидов значительно его ускоряет. Для эффективного использования дигаплоидных технологий необходима информация о влиянии чужеродных транслокаций на результативность этого процесса. Цель настоящей работы – изучить реакцию генотипов мягкой пшеницы, содержащих разные комбинации чужеродных транслокаций, на андрогенез *in vitro*.

Материалы и методы. В работе использовался метод получения дигаплоидов из культуры пыльников пшеницы 'Новосибирская 16'; линии Велют 991 – донора транслокаций T1RS.1BL от ржи и T5BS.5BL-5SL от *Aegilops speltoides* Tausch; четырех линий поколения F₃ от их скрещивания 10-7, 14-8, 15-8, 15-12, различающихся содержанием транслокаций. Эффективность андрогенеза оценивалась по числу эмбриоидов, альбиносных и зеленых растений на 100 пыльников.

Результаты. Наиболее высокие показатели отмечены для линий Велют 991, 10-7 и 14-8, характеризующихся присутствием в геноме T1RS.1BL. Так, частота регенерации зеленых растений для них составила 8,6, 3,6 и 10,1% соответственно. Значения показателей андрогенеза у линии 15-12 с T5BS.5BL-5SL были значительно ниже и практически не отличались от соответствующих значений для линии 15-8 без чужеродного материала.

Заключение. Установлено положительное влияние T1RS.1BL, в том числе в сочетании с T5BS.5BL-5SL, на индукцию эмбриогенеза и регенерацию зеленых растений. Показано, что наличие только одной транслокации T5BS.5BL-5SL не влияло на эффективность андрогенеза.

Ключевые слова: удвоенные гаплоиды, эмбриоиды, культура пыльников, спонтанное удвоение числа хромосом

Благодарности: работа была поддержана Курчатowski геномным центром ИЦиГ СО РАН (соглашение № 075–15–2019-1662). Размножение растений проводилось в ЦКП «Лаборатория искусственного выращивания растений» (поддерживается Министерством науки и высшего образования, проект FWNR-2022-0017).

Авторы благодарят рецензентов за их вклад в экспертную оценку этой работы.

Для цитирования: Тимонова Е.М., Адонина И. Г., Салина Е.А. Изучение влияния чужеродных транслокаций на показатели андрогенеза *in vitro* у линий мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.). Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. 2022;183(1):127-134. DOI: 10.30901/2227-8834-2022-1-127-134

GENETICS OF CULTIVATED PLANTS AND THEIR WILD RELATIVES

Original article

DOI: 10.30901/2227-8834-2022-1-127-134

The influence of combinations of alien translocations on *in vitro* androgenesis in spring common wheat (*Triticum aestivum* L.) linesEkaterina M. Timonova^{1,2}, Irina G. Adonina^{1,2}, Elena A. Salina²¹ Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia² Kurchatov Genomic Center of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia**Corresponding author:** Ekaterina M. Timonova, eegorova@bionet

Background. The basic approach to the production of new common wheat genotypes involving introgressive hybridization entails a long-term process. Doubled haploid production could accelerate it. However, this method is not widely used in breeding programs due to its main limitation: the genotype dependence. Due to genetic differences between wheat and related species, it was assumed that alien genetic materials are different in their capacity to affect androgenesis. The effect of alien translocations on androgenesis has been shown earlier. The aim of this study was to develop a set of DH wheat lines containing a wheat-alien translocation in the genome and study the effect of alien translocations on androgenesis of anther culture in such lines.

Materials and methods. The plant material included: the spring wheat cultivar 'Novosibirskaya 16', line Velut 991 carrying wheat-alien translocations 1RS.1BL from rye and 5BS.5BL-5SL from *Aegilops speltoides* Tausch, and four hybrid F₃ generation lines (10-7, 14-8, 15-8, 15-12) from their crossing, differing in the content of alien translocations.

Results. It was shown that parameters of androgenesis such as the number of embryo-like structures per 100 anthers, the number of albino regenerants per 100 anthers, and the number of green regenerants per 100 anthers varied depending on the line. The best-responding lines Velut 991, 10-7 and 14-8 are characterized by the presence of a 1RS.1BL wheat-rye translocation chromosome. Regeneration frequency of green plants was recorded to be 8,6%, 3,6% and 10,1% respectively. The values of the parameters for lines 15-12 (carrying 5BS.5BL-5SL translocation) and 15-8 (without translocations) did not differ significantly.

Conclusion. Therefore, it can be concluded that the presence of the introgressive fragment of chromosome 5S did not affect the efficiency of androgenesis and the short shoulder of chromosome 1R carries genes that stimulated androgenesis in anther culture.

Keywords: doubled haploids, embryo-like structures, anther culture, spontaneous chromosome doubling

Acknowledgments: this work was done within the framework of State Task assigned to the Kurchatov Genomic Center of the Institute of Cytology and Genetics, SB RAS (No. 075-15-2019-1662). Multiplication of plants was carried out in the Laboratory of Artificial Plant Growth (supported by the Ministry of Science and Higher Education, Project FWNR-2022-0017).

The authors thank the reviewers for their contribution to the peer review of this work.

For citation: Timonova E.M., Adonina I.G., Salina E.A. The influence of combinations of alien translocations on *in vitro* androgenesis in spring common wheat (*Triticum aestivum* L.) lines. *Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding*. 2022;183(1):127-134. DOI: 10.30901/2227-8834-2022-1-127-134

Введение

В последние десятилетия программы селекции, использующие отдаленную гибридизацию пшеницы *Triticum aestivum* L. с дикими и культурными видами, получили широкое развитие (Adonina et al., 2021). Успехи этого направления привели к получению огромного разнообразия линий пшеницы, содержащих различные интрогрессивные фрагменты от разных доноров, пшенично-чужеродных гибридов, замещенных и дополненных линий, и новых культур (например, тритордеум, тритикале и др.) (Nemeth et al., 2015; Kishii, 2019; Adonina et al., 2021). Генотипы, несущие чужеродный интрогрессивный материал, часто характеризуются хозяйственно ценными признаками, такими как устойчивость к биотическим и абиотическим факторам окружающей среды, повышенным качеством зерна и представляют интерес для селекции и расширения генетического разнообразия пшеницы.

Однако чужеродный генетический материал после переноса в геном пшеницы может присутствовать в гетерозиготном состоянии, и в результате полученное от самоопыления потомство будет расщепляться при размножении на генотипы с интрогрессиями и без. Напротив, можно ожидать, что линии, гомозиготные по интрогрессиям, будут неизменно их наследовать. Поскольку при использовании методов традиционной селекции стабилизация полученных интрогрессивных форм и создание сортов на их основе является долгим и сложным процессом, приоритетным подходом для быстрого достижения гомозиготности стало использование технологий получения удвоенных гаплоидов (double haploid, DH). Так, одним из промежуточных этапов недавних работ по получению и изучению интрогрессивных линий мягкой пшеницы является получение линий удвоенных гаплоидов (DH-линии) (Weigt et al., 2016; Singh et al., 2019; King et al., 2019; Grewal et al., 2021). А новые сорта пшеницы, полученные на основе DH-технологий, появляются каждый год (Kishii, Singh, 2020).

DH-линии происходят от гаплоидных клеток растений с последующим удвоением хромосом искусственным путем или спонтанно (Dwivedi, 2015). DH-линии являются полностью гомозиготными по всем генам, а достижение гомозиготности происходит за одно поколение, без ущерба для агрономически ценных признаков и чистоты линии. Существуют разные пути получения удвоенных гаплоидов растений: 1) отдаленная гибридизация с селективной элиминацией хромосом чужеродного вида-опылителя; 2) гиногенез; 3) андрогенез *in vitro* (Dwivedi, 2015). В работах с мягкой пшеницей и ее гибридами чаще других используют метод культуры пыльников на основе андрогенеза *in vitro*, при котором растение развивается из микроспоры. Эффективность методов культивирования пыльников и микроспор оценивается по трем параметрам: частоте сформировавшихся эмбрионов, частоте общего числа проростков и частоте зеленых проростков, на основе которых можно сформировать DH-линии (Nielsen et al., 2015; Pershina et al., 2020).

Актуальность и разнообразные возможности применения DH-технологий стали предметом большого количества обзоров (Dwivedi, 2015; Kalinowska et al., 2019; Jacquier et al., 2020). Однако есть и ограничения, влияющие на успешность процесса производства DH-линий, главное из которых – это зависимость способности к андрогенезу *in vitro* от генотипа растения-донора (Lantos, Pauk, 2020).

Показатели результативности могут существенно отличаться между видами и внутри вида. Например, гексаплоидная пшеница имеет более высокую способность к производству удвоенных гаплоидов по сравнению с тетраплоидной (Lazaridou et al., 2016). Разные сорта мягкой пшеницы значительно отличаются по способности к андрогенезу *in vitro* (Nielsen et al., 2015). Несколькими группами исследователей было показано, что множество хромосом, их областей (1A, 1B, 1D, 2D, 4B, 5B, 7A, 7B, 7D) и QTLs (1B, 2D, 2AL, 2BL, 5BL, 7B) оказывают влияние на формирование эмбрионов и регенерацию растений из культивируемых *in vitro* пыльников и микроспор, а выявленные локусы оказывают положительный аддитивный эффект на проявление признаков (Agache et al., 1989; Torp et al., 2001; Nielsen et al., 2015; Lantos, Pauk, 2020). Так, например, Torp et al. (2001) показали, что на способность к индукции эмбрионов оказывает влияние QTL (quantitative trait loci) на хромосоме 4B, а на частоту регенерации зеленых растений – локусы на хромосомах 2A, 2B, 3A, 5B. Nielsen et al. (2015) картировали два главных QTL на хромосомах 1B и 7B, которые суммарно определяли 53% проявления признака «частота зеленых проростков».

Также ранее было замечено, что присутствие чужеродного материала может оказывать влияние на способность к андрогенезу у пшеницы. Например, показано, что пшенично-ржаная транслокация 1RS.1BL связана с высоким уровнем способности растений к регенерации в культуре пыльников (Agache et al., 1989; Pershina et al., 2013). Присутствие же в геноме транслокации 7DL-7Ai от *Agropyron elongatum* (Host) Nevski, наоборот, может приводить к снижению эмбриогенной способности пыльников и частоты регенерации зеленых растений (Sibikeeva et al., 2004).

При этом, несмотря на существующее разнообразие интрогрессивных линий, в литературе встречается мало сообщений об изучении особенностей андрогенеза у генотипов пшеницы, которые имеют в геноме интрогрессивный материал (Agache et al., 1989; Pershina et al., 2013; Sibikeeva et al., 2004; Weigt et al., 2016). Однако результаты таких работ представляют интерес, поскольку могут прогнозировать предварительную оценку влияния интрогрессивных фрагментов на отзывчивость при культивировании *in vitro*, что может в дальнейшем облегчить селекционный процесс. Поэтому целью данного эксперимента было: во-первых, оценить способности к андрогенезу *in vitro* в культуре пыльников у близких по происхождению генотипов мягкой пшеницы, различающихся по наличию или отсутствию транслокаций от видов-доноров, и таким образом выяснить, оказывает ли влияние на способность к андрогенезу *in vitro* генетический материал отдаленных видов; и во-вторых, получить гомозиготные интрогрессивные DH-линии – носители этих транслокаций для их дальнейшего использования в селекционных программах. В анализ были включены транслокации от ржи и *Aegilops speltoides* Tausch, сочетание которых или влияние T5BS.5BL-5SL на способность к андрогенезу *in vitro* ранее не изучались.

Материалы и методы

В качестве доноров использовались гибридные F₃-линии 10-7, 14-8, 15-8 и 15-12 *Triticum aestivum*, отобранные из потомства, полученного от скрещивания пшеницы сорта 'Новосибирская 16' с интрогрессивной линией Велют 991, несущей транслокации от ржи *Secale cereale* L. (T1RS.1BL) и от *Aegilops speltoides* (T5BS.5BL-5SL), и сами

родители. Гибридные линии различаются между собой по содержанию транслокаций в геноме. У линии 15-8 транслокаций нет, линия 10-7 содержит T1RS.1BL, линия 15-12 содержит T5BS.5BL-5SL, а у линии 14-8, помимо T1RS.1BL, присутствует и T5BS.5BL-5SL. Растения-доноры каждого генотипа для культуры пыльников выращивали в поле на экспериментальных участках Института цитологии и генетики СО РАН (г. Новосибирск) летом 2020 г. и в тепличном комплексе института осенью 2020 г.

Главный колос срезали в тот момент, когда большинство микроспор находились на стадии сильно вакуолизированной микроспоры. Срезанные колосья помещали в стакан с холодным 50-процентным раствором макроэлементов среды Мурасиге и Скуга (Murashige, Scoog 1962) и выдерживали 7–9 дней в темноте при температуре +4°C. Поверхностная стерилизация колосьев проводилась 96-процентным этанолом вместе с листовой оберткой в стерильных условиях ламинарного бокса. Пыльнички выделяли из 6–10 колосков средней части колоса. Изолированные пыльники помещали на чашки Петри со средой N6 (Chu, 1978) с добавлением 2.4-D (1 мг/л), сахарозы (60 г/л), мальтозы (30 г/л) и гелерита (3 г/л). Пыльнички инкубировали в темноте при температуре +32°C в течение трех суток, а затем при температуре 28°C в течение 4–6 недель.

После массового появления эмбриоидов (эмбриоподобных структур) температуру снижали до +26°C. Эмбриоиды (Эм), достигшие размера 1 мм и более, перенесли на регенерационную среду Gamborg B5 (Gamborg et al., 1968) с добавлением 30 г/л сахарозы в пробирки и инкубировали 3-4 недели в камере для выращивания при температуре 20/15°C и 16-часовом фотопериоде до появления проростков. Затем проростки пересаживали в отдельные горшочки и определяли уровень плоидности путем подсчета числа хромосом в метафазных пластинках клеток кончика одного из корешков и по размеру замыкающих клеток устьиц листа (Pauk et al., 2003). Давленные препараты хромосом для кариологического анализа окрашивали ацетокармином или DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindol, Sigma). Препараты хромосом и эпидермиса листьев анализировали с помощью микроскопа Axioskop 2 Plus (Zeiss) при 10–40-кратном увеличении объектива. Изображения хромосом, окрашенных DAPI, регистрировалось CCD-камерой VC-44 (PCO) при 100-кратном увеличении объектива. Растения, оказавшиеся гаплоидами, подвергали колхицинированию, помещая в раствор 0,2-процентного колхицина в 2-процентном водном растворе диметилсульфоксида (DMSO). Все проростки, происходящие из одного эмбриоида, считали идентичными клонами и учитывали как одну линию (один генотип). Особенности андрогенеза оценивались на основе следующих показателей: число эмбриоидов на 100 пыльников (Эм/100 пыльников), число альбиносных растений на 100 пыльников (АП/100 пыльников), число зеленых растений на 100 пыльников (ЗП/100 пыльников) (Nielsen et al., 2015). Данные были статистически оценены с помощью однофакторного дисперсионного анализа и критерия Фишера HЗР (Fisher LSD – less significance distance).

Результаты

В результате культивирования пыльники всех генотипов образовывали эмбриоиды (плотные белые структуры) и неморфогенный каллус, а затем альбиносные

и зеленые проростки, однако в целом способность к андрогенезу отличалась между линиями. Не все сформированные эмбриоиды давали развитие проросткам. Как следует из данных, представленных в таблице 1, у всех генотипов на два эмбриоида приходится приблизительно один проросток. Часть эмбриоидов оставались без изменений, часть образовывали только корни или только побеги, остальные давали развитие зеленым либо альбиносным растениям с одним или несколькими побегами.

Сравнение показателей указывает на неодинаковую реакцию разных генотипов на культивирование. Среднее значение показателя Эм/100 пыльников для интродуктивных линий составило 22,15 и варьировало от 5,1 до 45,6 на генотип. Наиболее отзывчивыми оказались линии 10-7 и 14-8, характеризующиеся присутствием в геноме пшенично-ржаной транслокации T1RS.1BL. Они превышали по этому показателю родительские генотипы. Продуктивность линий 15-8 и 15-12 без данной транслокации была ниже, чем у родительских генотипов. Родители – сорт 'Новосибирская 16' (Н16) и линия Велют 991 – по этому показателю отличались между собой незначительно (см. табл. 1).

Для всех линий и родительских генотипов были получены проростки обоих типов (зеленые и альбиносные). Во всех случаях альбиносных растений было больше, чем зеленых. Частота образования проростков была значительно ниже у гибридных линий, не содержащих T1RS.1BL транслокацию. Линии 10-7 и 14-8 характеризуются более высокой способностью к регенерации проростков из эмбриоидов, как альбиносных, так и зеленых, по сравнению с линиями 15-8 и 15-12. Так, линия 14-8 дала наибольшее количество зеленых проростков на 100 пыльников (10,1), а линии 15-8 и 15-12 – наименьшее (0,7). Интересно, что у сорта 'Новосибирская 16' при относительно неплохих значениях Эм/100 пыльников и АП/100 пыльников снижена доля зеленых растений.

Сравнение показателей андрогенеза у гибридных линий 10-7 с транслокацией T1RS.1BL; 15-12 с транслокацией T5BS.5BL-5SL; 14-8, несущей две транслокации T1RS.1BL и T5BS.5BL-5SL; 15-8 без чужеродного материала и родительских генотипов позволило сделать следующий вывод. Значения двух показателей (доля эмбриоидов и доля зеленых проростков), характеризующих способность к андрогенезу *in vitro*, у линий 10-7 и 14-8 были выше уровня значений этих показателей андрогенеза у линий 15-8 и 15-12 без T1RS.1BL транслокации (см. табл. 1). Значения показателей андрогенеза линии 15-12 с транслокацией T5BS.5BL-5SL практически не отличались от соответствующих значений для линии 15-8 без чужеродного материала. Это может указывать на то, что материал длинного плеча 5S-хромосомы *Aegilops speltoides* не оказывает влияние на способность к андрогенезу *in vitro*. В то же время наличие в геноме фрагмента короткого плеча 1R от ржи повышает способности к андрогенезу.

Уровень плоидности растений, полученных из культуры пыльников генотипов линии 10-7, линии 14-8, линии 15-8, линии 15-12, линии Велют 991 и сорта 'Новосибирская 16', определяли путем подсчета хромосом в меристематических клетках кончиков корней и по размеру замыкающих клеток устьиц листа (рисунок).

В результате нахождения на регенерационной среде из эмбриоидов развились 706 альбиносных и 347 зеленых проростков. Уровень плоидности определяли только для зеленых проростков, которые смогли достигнуть стадии кушения. Всего было изучено 255 растений, и ре-

Таблица 1. Результаты культивирования пыльников мягкой пшеницы сорта 'Новосибирская 16', линии Велют 991 и четырех гибридных F₃-линий 10-7, 14-8, 15-8 и 15-12, содержащих пшенично-чужеродные транслокации в геноме и без них

Table 1. Efficiency of anther culture in cv. 'Novosibirskaya 16', line Velut 991, and four hybrid F₃ generation lines 10-7, 14-8, 15-8, 15-12, differing in the content of alien translocations

Генотип	Число культивированных пыльников	Эмбриониды		Альбиносные проростки		Зеленые проростки	
		Общее число	Эм/100 пыльников	Общее число	АП/100 пыльников	Общее число	ЗП/100 пыльников
Н 16	1374	343	25,0a	143	10,4a	16	1,2a
л. Велют 991 (1R,5S)	1552	319	20,6a	55	3,5b	133	8,6b
л. 15-12 (5S)	1122	57	5,1b	12	1,1b	8	0,7a
л. 10-7 (1R)	1360	424	31,2a	196	14,4a	49	3,6c
л. 15-8	1218	66	5,4b	26	2,1b	9	0,7a
л. 14-8 (1R, 5S)	1313	599	45,6c	274	20,9c	132	10,1b

Примечание: Н 16 – сорт 'Новосибирская 16'; л – линия; Эм – эмбриониды, АП – альбиносные проростки, ЗП – зеленые проростки; а, b, c – буквы в одном столбце указывают на статистически значимые различия ($p < 0,05$)

Note: Н 16 – cv. 'Novosibirskaya 16'; л. – line; Эм – embryo-like structures, АП – albino plants, ЗП – green plants; a, b, c – different letters within the same column indicate statistically significant differences ($p < 0.05$)

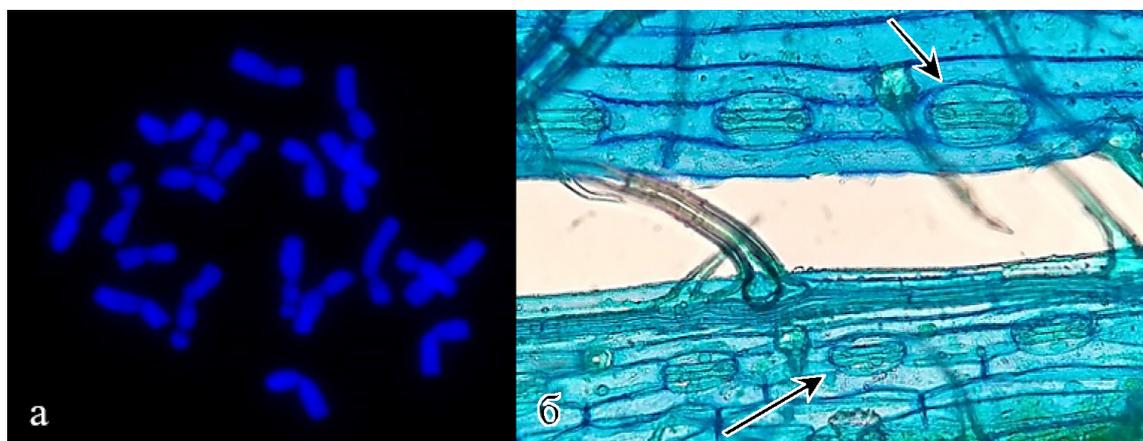


Рисунок. Метафазные хромосомы гаплоидного растения – регенеранта от линии 14-8 ($n = 21$) (а); замыкающие клетки устьиц удвоенного гаплоида (вверху) и гаплоидного растения (внизу) отмечены стрелками (б)

Figure. Metaphase chromosomes of a haploid plant from line 14-8 ($n = 21$) (a); stomatal guard cells of a doubled haploid (above) and a haploid plant (below) are marked with arrows (b)

ультаты представлены в таблице 2. В целом, как и ожидалось, большинство исследованных растений (135 растений, 53%) имели гаплоидный набор хромосом ($1n = 3X = 21$). При этом у 103 (40,4%) андрогенных растений выявлено диплоидное число хромосом ($2n = 6X = 42$). Процентные доли уровней пloidности различались от одного генотипа к другому. Отмечается снижение процента спонтанных диплоидных генотипов у линии 15-12,

несущей только одну 5S-транслокацию. Однако для подтверждения этого явления необходимы дополнительные исследования. Также были обнаружены анеуплоидные (химерные) растения. Одним из наиболее важных этапов создания ДН-генотипов является этап удвоения числа хромосом. Из полученных 135 гаплоидных растений, обработанных колхицином, 81 растение сформировало семена.

Таблица 2. Результаты определения уровня ploidy зеленых растений-регенерантов
Table 2. Ploidy level in green plant regenerants of analyzed wheat genotypes

Генотип	Всего изученных проростков	Число гаплоидов	Число спонтанных диплоидов	% спонтанных диплоидов	Число анеуплоидов
Н 16	15	7	8	53,3	0
л. Велют 991 (1R,5S)	69	36	27	39,1	6
л. 15-12 (5S)	10	8	2	20,0	0
л. 10-7 (1R)	38	18	16	42,1	4
л. 15-8	9	4	4	44,4	1
л. 14-8 (1R, 5S)	114	62	46	40,4	6
Всего	255	135	103	40,4	17

Примечание: Н 16 – сорт ‘Новосибирская 16’; л – линия
 Note: Н 16 – cv. ‘Novosibirskaya 16’; л – line

Обсуждение

В нашей работе были изучены особенности андрогенеза в культуре пыльников нескольких интрогрессивных линий и сорта ‘Новосибирская 16’ (*Triticum aestivum*). Были обнаружены достоверные различия по их проявлению, что согласуется с фактом значительной зависимости эффективности метода культуры пыльников от генотипа растения-донора. Транслокации, описанные в работе, затрагивают хромосомы, которые ранее были отмечены как содержащие локусы, влияющие на проявление показателей андрогенеза (Torp et al., 2001; Nielsen et al., 2015). Соответственно, можно предположить, что они потенциально могут повлиять на способность генотипа к продукции удвоенных гаплоидов как в связи с привнесением генов, расположенных в интрогрессивных фрагментах, так и из-за потери пшеничных фрагментов хромосом. Нами было показано, что линии мягкой пшеницы Велют 991, 10-7 и 14-8 с пшенично-ржаной транслокацией проявляют повышенную способность к андрогенезу по сравнению с генотипами без этой транслокации. Данный результат подтверждает положительный эффект рекомбинантной хромосомы 1RS.1BL, отмеченный в работах многих исследователей (Agache et al., 1989; Pershina et al., 2013), в том числе и в работах, выполненных на тритикале (González et al., 2005).

Интерес к генотипам, содержащим в геноме пшенично-ржаную T1RS.1BL-транслокацию, обусловлен тем, что она является носителем комплекса генов устойчивости к грибным болезням *Lr26/Sr31/Yr9/Pm8*. До настоящего времени транслокации короткого плеча 1R-хромосомы ржи являются одними из наиболее часто используемых в селекции (Adonina et al., 2021).

У линий 15-8 (без интрогрессий) и 15-12 (только фрагмент 5S-хромосомы) сильно снижена способность к формированию эмбриоидов и зеленых проростков по сравнению с линиями Велют 991, 10-7 и 14-8. При этом сравнение линий 15-8 и 15-12 между собой показало отсутствие различий. Сравнение показателей линий Велют 991 и 14-8, носителей двух транслокаций T1RS.1BL и T5BS.5BL-5SL, и линии 10-7 содной транслокацией T1RS.1BL также не выявило негативного или позитивного влияния фрагмента 5S-хромосомы. Таким образом,

можно сделать вывод, что наличие интрогрессивного фрагмента хромосомы 5S в геноме не влияет на способности к андрогенезу. Транслокация T5BS.5BL-5SL также содержит ген устойчивости к листовой ржавчине *LrAsp5* (Adonina et al., 2021) и в комбинации с T1RS.1BL обеспечивает высокую устойчивость к популяциям листовой ржавчины (возбудитель *Puccinia triticina* Eriks.), специфичным для Западно-Сибирского региона (неопубликованные данные авторов).

Низкая способность к андрогенезу многих генотипов по-прежнему является проблемой, ограничивающей применение гаплоидных технологий в селекции. В ряде опубликованных работ по оценке европейских сортов пшеницы по способности к андрогенезу показано, что большинство проявляет низкие частоты регенерации (Andersen et al., 1987; Lantos et al., 2013; Nielsen et al., 2015). Исследователи предлагают решение проблемы путем усовершенствования протоколов культивирования и задумываются о возможностях переноса в генотип факторов, способных оказывать влияние на уровень регенерации (Andersen et al., 1987; Nielsen et al., 2015). Возможно, одним из таких факторов может служить рекомбинантная хромосома 1RS.1BL, имеющая широкое распространение среди сортов пшеницы и содержащая локусы или аллели, стимулирующие андрогенез в культуре пыльников. Ее положительное влияние может быть использовано при скрещиваниях с другим генетическим материалом, таким образом повышая его способность к регенерации и производству удвоенных гаплоидов.

Важным этапом работы по продукции удвоенных гаплоидов является оценка уровня ploidy растений-регенерантов до процедуры удвоения хромосом. Несмотря на диагностические признаки (медленный рост, меньший размер, более узкие листья и т. д.), визуально отделить гаплоидные растения от удвоенных гаплоидов не всегда представляется возможным. Определение ploidy регенерантов путем прямого подсчета количества хромосом в клетках широко используется в течение многих лет, хотя и является трудоемким методом, тогда как самый простой, но не абсолютно точный (например, в случае химерных растений) – это сравнение длины замыкающих клеток устьиц.

Известно, что важным преимуществом метода культивирования пыльников пшеницы является способность к спонтанному удвоению хромосом. Спонтанно образовавшиеся линии удвоенных гаплоидов являются фертильными и не требуют обработки колхицином или другими антимитотическими агентами. Большинство из них цитологически стабильны, за исключением небольшого процента тех, которые имеют хромосомные нарушения. По литературным данным, у мягкой пшеницы частота спонтанного удвоения может варьировать в широких пределах: от 25% до 70% (Castillo et al., 2009). В нашем эксперименте были получены 103 (40,4%) спонтанных ДН-растения, 135 гаплоидных и 17 анеуплоидных растений из 255 протестированных на уровень плоидности. Такой процент спонтанных удвоений согласуется с опубликованными данными. М. Рубцовой с соавторами было показано, что частота спонтанной диплоидизации имеет положительную зависимость от размера эмбриона, переносимого на регенерационную среду, а также от типа используемого при культивации фитогормона (Rubtsova et al., 2013). Возможно, в наших будущих экспериментах уровень спонтанной диплоидизации проростков может быть повышен с учетом опубликованных фактов.

Заключение

В результате проведенной работы были получены линии удвоенных гаплоидов мягкой пшеницы с различными комбинациями чужеродных транслокаций в геноме. Показано, что наличие интрогрессивного фрагмента хромосомы 5S не влияло на эффективность андрогенеза *in vitro*, а короткое плечо хромосомы 1R содержит локусы, стимулирующие андрогенез в культуре пыльников. Из регенерировавших андрогенных растений, полученных от линий 10-7 и 14-8, были сформированы линии удвоенных гаплоидов. Эти линии будут включены в работу по изучению проявления хозяйственно ценных признаков и в селекционные программы. На депонирование в коллекции ВИР (Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова) переданы две андрогенные линии с присвоенными номерами 454-27 и 454-57, происходящие от линии 14-8 и содержащие две транслокации T1RS.1BL и T5BS.5BL-5SL в геноме.

References / Литература

- Adonina I.G., Timonova E.M., Salina E.A. Introgressive hybridization of common wheat: results and prospects. *Russian Journal of Genetics*. 2021;57(4):390-407. DOI: 10.1134/s1022795421030029 [in Russian] (Адонина И.Г., Тимонова Е.М., Салина Е.А. Интрогрессивная гибридизация мягкой пшеницы: результаты и перспективы. *Генетика*. 2021;57(4):384-402). DOI: 10.31857/S0016675821030024
- Agache S., Bachelier B., de Buyser J., Henry Y., Snape J. Genetic analysis of anther culture response in wheat using aneuploid, chromosome substitution and translocation lines. *Theoretical and Applied Genetics*. 1989;77(1):7-11. DOI: 10.1007/bf00292308
- Andersen S.B., Due I.K., Olesen A. The response of anther culture in a genetically wide material of winter wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Breeding*. 1987;99(3):181-186. DOI: 10.1111/j.1439-0523.1987.tb01170.x
- Castillo A.M., Cistué L., Valles M.P., Soriano Castán M. Chromosome doubling in monocots. In: A. Touraev, B.P. Forster, S.M. Jain (eds). *Advances in Haploid Production in Higher Plants*. Dordrecht: Springer; 2005. p.329-340. DOI: 10.1007/978-1-4020-8854-4_27
- Chu C.C. The N6 medium and its application to anther culture of cereal crops. In: *Proceedings of Symposium on Plant Tissue Culture, 25-30 May 1978*. Peking: Science Press; 1978. p.43-50.
- Dwivedi S.L., Britt A.B., Tripathi L., Sharma S., Upadhyaya H.D., Ortiz R. Haploids: constraints and opportunities in plant breeding. *Biotechnology Advances*. 2015;33(6 Pt 1):812-829. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2015.07.001
- Gamborg O.L., Miller R.A., Ojima K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*. 1968;50(1):151-158. DOI: 10.1016/0014-4827(68)90403-5
- González J.M., Muñoz L.M., Jouve N. Mapping of QTLs for androgenic response based on a molecular genetic map of *xTriticosecale* Wittmack. *Genome*. 2005;48(6):999-1009. DOI: 10.1139/g05-064
- Grewal S., Guwela V., Newell C., Yang C.Y., Ashling S., Scholefield D. et al. Generation of doubled haploid wheat-*Triticum urartu* introgression lines and their characterisation using chromosome-specific KASP markers. *Frontiers in Plant Science*. 2021;12:643636. DOI: 10.3389/fpls.2021.643636
- Jacquier N.M.A., Gilles L.M., Pyott D.E., Martinant J.P., Rogowsky P.M., Widiez T. Puzzling out plant reproduction by haploid induction for innovations in plant breeding. *Plants*. 2020;6(6):610-619. DOI: 10.1038/s41477-020-0664-9
- Kalinowska K., Chamas S., Unkel K., Demidov D., Lermonтова I., Dresselhaus T. et al. State-of-the-art and novel developments of *in vivo* haploid technologies. *Theoretical and Applied Genetics*. 2018;132(3):593-605. DOI: 10.1007/s00122-018-3261-9
- King J., Newell C., Grewal S., Hubbard-Edwards S., Yang C.Y., Scholefield D. et al. Development of stable homozygous wheat/*Amblyopyrum muticum* (*Aegilops mutica*) introgression lines and their cytogenetic and molecular characterization. *Frontiers in Plant Science*. 2019;10:34. DOI: 10.3389/fpls.2019.00034
- Kishii M. An update of recent use of *Aegilops* species in wheat breeding. *Frontiers in Plant Science*. 2019;10:585. DOI: 10.3389/fpls.2019.00585
- Kishii M., Singh S. Haploid production technology: fasten wheat breeding to meet future food security. In: S. Gosal, S. Wani (eds). *Accelerated Plant Breeding. Vol. 1*. Cham: Springer; 2020. p.139-165. DOI: 10.1007/978-3-030-41866-3_6
- Lantos C., Pauk J. Factors influencing the efficiency of wheat anther culture. *Acta Biologica Cracoviensia. Series Botanica*. 2020;62(2):7-16. DOI: 10.24425/abcsb.2020.131671
- Lantos C., Weyen J., Orsini J.M., Gnad H., Schlieter B., Lein V. et al. Efficient application of *in vitro* anther culture for different European winter wheat (*Triticum aestivum* L.) breeding programmes. *Plant Breeding*. 2013;132(2):149-154. DOI: 10.1111/pbr.12032
- Lazaridou T., Pankou C., Xynias I., Roupakias D. Effect of D genome on wheat anther culture response after cold and mannitol pretreatment. *Acta Biologica Cracoviensia. Series Botanica*. 2016;58(1):95-102. DOI: 10.1515/abcsb-2016-0006
- Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 1962;15(3):473-497. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x

- Nemeth C., Yang C.Y., Kasprzak P., Hubbart S., Scholefield D., Mehra S. et al. Generation of amphidiploids from hybrids of wheat and related species from the genera *Aegilops*, *Secale*, *Thinopyrum*, and *Triticum* as a source of genetic variation for wheat improvement. *Genome*. 2015;58(2):71-79. DOI: 10.1139/gen-2015-0002
- Nielsen N.H., Andersen S.U., Stougaard J., Jensen A., Backes G., Jahoor A. Chromosomal regions associated with the *in vitro* culture response of wheat (*Triticum aestivum* L.) microspores. *Plant Breeding*. 2015;134(3):255-263. DOI: 10.1111/pbr.12257
- Pauk J., Mihaly R., Puolimatka M. Protocol for wheat (*Triticum aestivum* L.) anther culture. In: M. Maluszynski, K.J. Kasha, B.P. Forster, I. Szarejko (eds). *Doubled Haploid Production in Crop Plants*. Dordrecht: Springer; 2003. p.59-64. DOI: 10.1007/978-94-017-1293-4_10
- Pershina L., Trubacheeva N., Badaeva E., Belan I., Rosseeva L. Study of androgenic plant families of alloplasmic introgression lines (*H. vulgare*) – *T. aestivum* and the use of sister DH lines in breeding. *Plants*. 2020;9(6):764-816. DOI: 10.3390/plants9060764
- Pershina L.A., Osadchaya T.S., Badaeva E.D., Belan I.A., Rosseeva L.P. Androgenesis in anther cultures of cultivars and a promising form of spring common wheat of West Siberia differing in the presence or absence of wheat-alien translocations. *Russian Journal of Genetics*. 2013;3(4):246-253. DOI: 10.1134/s2079059713040096
- Rubtsova M., Gnad H., Melzer M., Weyen J., Gils M. The auxins centrophoxine and 2,4-D differ in their effects on non-directly induced chromosome doubling in anther culture of wheat (*T. aestivum* L.). *Plant Biotechnology Reports*. 2013;7(3): 247-255. DOI: 10.1007/s11816-012-0256-x
- Sibikeeva Y.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. *Russian Journal of Genetics*. 2004;40(9):1003-1006. DOI: 10.1023/b:ruge.0000041379.30508.39
- Singh A.K., Zhang P., Dong C., Li J., Trethowan R., Sharp P. Molecular cytogenetic characterization of stem rust and stripe rust resistance in wheat–*Thinopyrum bessarabicum*-derived doubled haploid lines. *Molecular Breeding*. 2019;39(9):125. DOI: 10.1007/s11032-019-1034-z
- Torp A.M., Hansen A.L., Andersen S.B. Chromosomal regions associated with green plant regeneration in wheat (*Triticum aestivum* L.) anther culture. *Euphytica*. 2001;119(3):377-387. DOI: 10.1023/A:1017554129904
- Weigt D., Kiel A., Nawracala J., Tomkowiak A., Kurasiak-Popowska D., Siatkowski I. et al. Obtaining doubled haploid lines of the *Lr19* gene using anther cultures of winter wheat genotypes. *BioTechnologia*. 2016;97(4):285-293. DOI: 10.5114/bta.2016.64545

Информация об авторах

Екатерина Михайловна Тимонова, кандидат биологических наук, научный сотрудник, Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук и Курчатовский геномный центр Института цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, 630090 Россия, Новосибирск, пр. акад. Лаврентьева, 10, eegorova@bionet.nsc.ru, <https://orcid.org/0000-0002-3341-5080>

Ирина Григорьевна Адонина, кандидат биологических наук, научный сотрудник, Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук и Курчатовский геномный центр Института цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, 630090 Россия, Новосибирск, пр. акад. Лаврентьева, 10, adonina@bionet.nsc.ru, <https://orcid.org/0000-0002-8460-6119>

Елена Артёмовна Салина, доктор биологических наук, профессор, зав. лабораторией, руководитель отделения, Курчатовский геномный центр Института цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, 630090 Россия, Новосибирск, пр. акад. Лаврентьева, 10, salina@bionet.nsc.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8590-847X>

Information about the authors

Ekaterina M. Timonova, Cand. Sci. (Biology), Researcher, Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, and Kurchatov Genomic Center, Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 10 Lavrentyeva Ave., Novosibirsk 630090, Russia, eegorova@bionet.nsc.ru, <https://orcid.org/0000-0002-3341-5080>

Irina G. Adonina, Cand. Sci. (Biology), Researcher, Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, and Kurchatov Genomic Center, Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 10 Lavrentyeva Ave., Novosibirsk 630090, Russia, adonina@bionet.nsc.ru, <https://orcid.org/0000-0002-8460-6119>

Elena A. Salina, Dr. Sci. (Biology), Professor, Head of a Laboratory, Head of a Department, Kurchatov Genomic Center, Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 10 Lavrentyeva Ave., Novosibirsk 630090, Russia, salina@bionet.nsc.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8590-847X>

Вклад авторов: все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Contribution of the authors: the authors contributed equally to this article.

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests: the authors declare no conflicts of interests.

Статья поступила в редакцию 04.11.2021; одобрена после рецензирования 25.01.2022; принята к публикации 28.02.2022.

The article was submitted on 04.11.2021; approved after reviewing on 25.01.2022; accepted for publication on 28.02.2022.