МЕТОДЫ КУЛЬТУРЫ ТКНИ *IN VITRO* ДЛЯ СОЗДАНИЯ ИСХОДНОГО МАТЕРИАЛА ДЛЯ СЕЛЕКЦИИ ТРИТИКАЛЕ В ПОВОЛЖЬЕ

В. Н. Акинина, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории клеточной селекции, ORCID ID: 0000-0003-3661-9246;

Т. И. Дьячук, доктор биологических наук, главный научный сотрудник лаборатории клеточной селекции, ORCID ID: 0000-0001-7420-0521;

С. В. Жилин, лаборант-исследователь лаборатории клеточной селекции, ORCID ID: 0000-0001-6181-5279;

Э. В. Калашникова, научный сотрудник лаборатории клеточной селекции, ORCID ID: 0000-0002-3870-0542
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Юго-Востока»,
410010, г. Саратов, ул. Тулайкова, 7

Представлены результаты оценки эффективности методов культуры тканей *in vitro* для создания исходного материала в селекции тритикале в Поволжье. Культура незрелых зародышей (*embryo rescue*) применялась для получения пшенично-рожаных амфигаплоидов при скрещивании твердой пшеницы с рожью. Завязываемость гибридных зерновок варьировала от 10,4 до 47,7%. При опылении 2223 цветков твердой пшеницы завязалось 768 зерновок, из которых 604 имели зародыши с различной степенью дифференциации. Наибольшая частота завязывания гибридных зерновок обнаружена в скрещиваниях, где материнскими формами служили сорта твердой пшеницы Амазонка (47,7%), Диона (37,5%) и Аксинит (37,6%). Фертильные амфидиплоиды (первичные гексаплоидные тритикале) были получены после удвоения числа хромосом. Дорастивание незрелых зародышей *in vitro* применялось и для получения гибридов тритикале с мягкой пшеницей в тех случаях, когда она служила материнским родителем в скрещиваниях. Эффективность гаплопродукции в культуре пыльников тритикале зависела от генотипа. Частота формирования эмбриогенных пыльников варьировала от 6,7 до 17,4%, регенерация растений от полученных новообразований составила 11,4–31,4%. Из 338 полученных растений 68 были зелеными и 270 альбиносами. Микроклональное размножение *in vitro* с использованием сегментов молодых колосьев в качестве эксплантов позволило сохранить и размножить стерильные растения для дальнейших работ по восстановлению их фертильности.

Ключевые слова: тритикале, селекция, культура зародышей *in vitro*, культура пыльников *in vitro*, микроклональное размножение *in vitro*.

Для цитирования: Акинина В. Н., Дьячук Т. И., Жилин С. В., Калашникова Э. В. Методы культуры ткани *in vitro* для создания исходного материала для селекции тритикале в Поволжье // Зерновое хозяйство России. 2020. № 1(67). С. 64–68. DOI: 10.31367/2079-8725-2020-67-1-64-68

IN VITRO FABRIC CULTURE METHODS TO DEVELOP THE INITIAL MATERIAL FOR TRITICALE BREEDING IN THE VOLGA REGION

V. N. Akinina, Candidate of Biological Sciences, senior researcher of the laboratory of cell breeding, ORCID ID: 0000-0003-3661-9246;

T. I. Diyachuk, Doctor of Biological Sciences, main researcher of the laboratory of cell breeding FSBSI "RIA of South-East", ORCID ID: 0000-0001-7420-0521;

S. V. Zhilin, laboratory researcher of the laboratory of cell breeding, ORCID ID: 0000-0001-6181-5279;

E. V. Kalashnikova, researcher of the laboratory of cell breeding, ORCID ID: 0000-0002-3870-0542

Research Institute of Agriculture of South-East,
410010, Saratov, Tulaykova, 7

The current paper presents the estimation efficiency results of *in vitro* fabric culture methods used to develop the initial material for triticales breeding in the Povolzhie. A culture of immature embryos (*embryo rescue*) was used to obtain wheat-rye amphigaploids when cross breeding durum wheat with rye. The hybrid kernels formation varied from 10.4 to 47.7%. When pollinating 2223 flowers of durum wheat there were formed 768 kernels, 604 of which had embryos with different degrees of differentiation. The largest frequency of hybrid kernels formation was found in the hybrids where the mother forms were the durum wheat varieties "Amazonka" (47.7%), "Diona" (37.5%), and "Aksinit" (37.6%). Fertile amphidiploids (primary hexaploid triticales) were obtained after doubling the number of chromosomes. *In vitro* immature embryo cultivation was also used to obtain triticales hybrids with soft wheat in those cases when it served as the maternal parent in cross breeding. The efficiency of haploid production in the triticales anthers depended on the genotype. The frequency of embryogenic anthers formation varied from 6.7 to 17.4%, plant regeneration from the new forms was 11.4–31.4%. The 68 obtained of the 338 plants were green and 270 were albinos. *In vitro* microclonal propagation using segments of young heads as explants allowed preserving and propagating sterile plants for further work to restore their fertility.

Keywords: triticales, *in vitro* embryo culture, *in vitro* anthers culture, *in vitro* microclonal propagation.

Введение. Поволжский регион является эпицентром российских засух. Засуха – один из наиболее комплексных и разрушительных в глобальном масштабе абиотических стрессоров. С учетом глобальных и локальных изменений климата решающее значение приобретает биоразнообразие возделываемых культур, использование культур нового поколения, наиболее приспособленных к лимитирующим фактам окружающей среды. К таким культурам относится тритикале – гибрид пшеницы и ржи. Сортимент сортов тритикале, возделываемых в Поволжье, довольно

разнообразен. Однако дальнейшее распространение тритикале сдерживается значительными колебаниями урожайности и отсутствием адаптированных сортов, отвечающих разнообразным требованиям производства. Одним из основных показателей производственной ценности сортов является их адаптивность. Дальнейшее развитие селекции тритикале в Поволжье диктует необходимость создания нового исходного материала, адаптированного к климатическим условиям региона. В традиционные схемы селекции активно внедряются биотехнологические методы,

основанные на культивировании тканей и органов *in vitro*, которые позволяют расширить спектр генетической изменчивости по селектируемым признакам, увеличить эффективность селекции и сократить время для создания сортов (Игнатова, 2011; De Filippis, 2014; Lulsdorf et al., 2014; Gosal and Wani, 2018).

Цель исследований – создать исходный материал для селекции озимого тритикале в Поволжье на основе методов культуры тканей *in vitro*.

Материалы и методы исследований. Для получения первичных гексаплоидных тритикале (пшенично-ржаных амфидиплоидов) применяли традиционную схему, состоящую из трех основных этапов: скрещивание пшеницы (AB) с рожью (R) и получение пшенично-ржаных гибридов; получение амфидиплоидов (ABR, $2n = 21$) с помощью метода эмбриокультуры *in vitro*; получение амфидиплоидов (AABBRR, $2n = 42$) путем удвоения числа хромосом. Для удвоения числа хромосом растения амфидиплоидов на стадии кушания были обработаны раствором колхицина (0,5 мг/л). В качестве материнских форм в скрещиваниях использовали сорта озимой твердой пшеницы селекции ФГБНУ «Аграрный научный центр «Донской» и сорта озимой ржи селекции ФГБНУ «НИИСХ Юго-Востока». Для получения гибридов тритикале с мягкой пшеницей были привлечены образцы тритикале мировой коллекции ВИР, собственные перспективные линии, а также сорта мягкой пшеницы селекции ФГБНУ «НИИСХ Юго-Востока». На 18–20 день после опыления зародыши вычленили и культивировали на искусственной питательной среде Р-8 с добавлением ИУК (1 мг/л) (Игнатова, 2011). Получение гаплоидных растений в культуре пыльников проведено по методике Т. И. Дьячук и (2013). Для сохранения и размножения стерильных растений применяли метод микроклонального размножения, основанного на соматическом эмбриогенезе. В качестве эксплантов использовали сегменты колосьев на 5–6 этапе органогенеза, которые помещали на питательную среду MS, содержащую 2 мг/л 2,4-Д. Через месяц было проведено пассирование каллусов, а из сформировавшегося эмбриогенного каллуса регенерированы растения.

Результаты исследований статистически обработаны методом однофакторного дисперсионного анализа с применением программ статистического и биометрико-генетического анализа в растениеводстве и селекции AGROS-2 версия 2.09.

Результаты и их обсуждение. Получение пшенично-ржаных амфидиплоидов. Первичные тритикале (амфидиплоиды, $2n = 6x = 42$) – незаменимый исходный материал для селекции. Получение новых амфидиплоидов от скрещивания современных сортов твердой пшеницы и ржи обогащает генофонд тритикале селекционно ценными признаками. Скрещивания твердой пшеницы с рожью характеризуются ярко выраженной постгаммой несовместимостью геномов пшеницы и ржи с нарушениями всего эмбрио- и эндоспермогенеза, что было установлено при создании первичных гексаплоидных тритикале (Гордей, 1992). Семена лишены эндосперма, поэтому для получения амфидиплоидов требуется обязательное культивирование зародышей на искусственной питательной среде.

Были проведены скрещивания по 42 гибридным комбинациям. Завязываемость гибридных зерновок варьировала от 10,4 до 47,7%. При опылении 2223 цветков твердой пшеницы завязалось 768 зерновок, из которых 604 имели зародыши с различной степенью дифференциации. Наибольшая частота завязывания гибридных зерновок обнаружена в скрещиваниях, где материнскими формами служили сорта твердой пшеницы Амазонка (47,7%), Диона (37,5%) и Аксинит (37,6%) (табл. 1). Межсортовые различия по уровню скрещиваемости пшеницы с рожью связаны с особенностями распределения генов совместимости (Гордей, 1992). Предположительно, эти сорта имеют в наличии рецессивный аллель гена скрещиваемости Kr1. Сорта Тейя и Эйрена с завязываемостью зерновок 18,6 и 26,5% предположительно имеют рецессивный аллель гена Kr2. Наименьшая частота завязывания гибридных зерен обнаружена в скрещиваниях с сортом озимой твердой пшеницы Агат донской (10,4%), что, предположительно, свидетельствует о наличии доминантных аллелей генов скрещиваемости Kr1, Kr2.

1. Результаты гибридизации сортов озимой твердой пшеницы и ржи 1. The results of hybridization of winter durum wheat and rye varieties

Генотип ♀	Опылено цветков	Завязалось зерновок		Сформировалось зародышей		Получено растений	
		шт.	%	шт.	%	шт.	% от зародышей
Амазонка	425	203	47,7	152	74,8	6	3,9
Аксинит	332	125	37,6	99	79,2	8	8,1
Тейя	252	47	18,6	39	82,9	1	2,6
Диона	551	207	37,5	173	83,6	5	2,9
Агат донской	297	35	10,4	17	48,6	2	11,7
Эйрена	366	97	26,5	66	68,0	1	1,5
F _{факт}	–	–	30,4*	–	5,5*	–	–
НСР	–	–	6,7	–	11,2	–	–

Метод эмбриокультуры был использован нами и в создании исходного материала в скрещиваниях тритикале с мягкой пшеницей. Завязываемость гибридных зерновок в скрещиваниях, где материнской формой служила мягкая пшеница, составила 52%, в обратных скрещиваниях – 14%. Однако жизнеспособность зародышей в обратных скрещиваниях составила 100%, а в прямых – всего 37,1%. Для скрещиваний, в которых материнской формой служила мягкая пшеница, было целесообразно культивирование 20-дневных эмбрионов на питательной среде

in vitro. Необходимо отметить, что полученные растения могут проходить яровизацию в условиях *in vitro*. Кроме получения и сохранения уникальных генотипов, этот прием обеспечивает дополнительные преимущества: 1) не требуются дорогостоящие климатические камеры для яровизации (пригоден бытовой холодильник); 2) обеспечивается возможность «депонирования» отдельных генотипов и их дальнейшего использования в селекционных программах в нужное время.

Гаплоидия в культуре пыльников тритикале. Получение гаплоидных растений и на их основе го-

мозиготных линий дает возможность сократить сроки селекционного процесса в среднем на 5–6 лет. Для получения гаплоидов тритикале используются культура пыльников и ее разновидность – культура изолированных микроспор и селективная элиминация хромосом вида-опылителя при отдаленной гибридизации (Wedzony et al., 2015). В условиях Поволжья метод селективной элиминации хромосом имеет ряд ограничений, связанных с влиянием

высоких температур и сухости воздуха на частоту оплодотворения и формирование дифференцированных зародышей. В связи с этим для получения гаплоидных растений нами используется метод культуры пыльников *in vitro*. Изучение эффективности прохождения отдельных этапов гаплопродукции в культуре пыльников гибридов тритикале х мягкая пшеница показало их строгую генотипическую зависимость (табл. 2).

2. Эффективность отдельных параметров гаплопродукции в культуре пыльников гибридов тритикале с мягкой пшеницей

2. The efficiency of individual parameters of haploid production in the anthers of triticale hybrids with soft wheat

№ генотипа	Кол-во пыльников	Эмбриогенных пыльников, шт.	Новообразования			Регенерация растений		
			% от общего кол-ва пыльников	шт.	% от общего кол-ва пыльников	всего, шт/%	зеленых	альбиносов
11/2013	549	37	6,7	51	9,3	16/31,4	14	2
15/2013	1132	197	17,4	481	42,5	55/11,4	12	43
22/2013	1037	115	11,1	291	28,1	42/14,4	3	39
23/2013	3896	523	13,4	1026	26,3	225/21,9	39	186
Всего	6614	872	13,2	1849	28,0	338/18,3	68	270
F _{факт}	–	–	14,0*	–	75,4*	11,2*	–	–
HCP ₀₅	–	–	2,6	–	3,4	5,6	–	–

Примечание: 11/2013 – F7Саpray/Саратовская 90; 15/2013 – F8Л39, оз. мягкая пш./АД-1; 22-2013 – F8Л39, оз. мягкая пш./АД-2; 23-2013 – F8Л39, оз. мягкая пш./АД-2.

Изученные гибриды достоверно различались между собой по выходу эмбриогенных пыльников (6,7–17,4%, HCP₀₅ – 2,6%). По показателю «выход новообразований», отражающему число андрогенетических структур, сформированных на один пыльник, отмеченная закономерность сохраняется. Значение показателя у разных гибридов варьировало от 9,3 до 42,5%. На втором этапе формирования гаплоидов – регенерации растений – эффективность составила 11,4–31,4%. Важно отметить, что ранжир генотипов на этапах формирования эмбриогенных пыльников и регенерации растений не сохраняется. Гибрид 11-2013, характеризующийся наименьшим значением показателя «выход эмбриогенных пыльников», имеет самый высокий процент регенерации растений. В то же время гибрид 15/2013, выгодно отличающийся на первом этапе гаплопродукции, имел самую низкую частоту регенерации растений. Аналогичная закономерность была выявлена и в других исследованиях (Krzewska et al., 2012). Всего в опыте было получено 338 растений, из которых 270 были альбиносами и 68 – зеленые. Высокая частота регенерации альбинозных растений является существенным недостатком метода культуры пыльников.

Микрклональное размножение. Микрклональное размножение *in vitro* является клональным – получаемые растения идентичны исходному и между собой. Проблема сохранения уникальных генотипов является важной в селекционно-генетических исследованиях тритикале. Получение семян отдаленных гибридов и гаплоидов сопряжено с рядом трудностей и не всегда заканчивается успешно, в связи с чем первостепенное значение имеют сохранение стерильных растений, их последующее размножение и использование в селекционной работе. Для микрклонального размножения стерильных растений, у которых отсутствует зародыш, необходимо подобрать подходящий эксплант и индуцировать соматический эмбриогенез. В наших опытах эксплантами служили сегменты колосьев, отобранных на 6–8 этапе органогенеза, которые помещались на питательную среду MS, содержа-

щую 2 мг/л 2,4-Д. Через месяц после культивирования было проведено пассирование каллусов, а из сформировавшегося эмбриогенного каллуса были регенерированы растения (табл. 3).

Как и в культуре пыльников, ранжир генотипов по частоте каллусообразования и регенерации растений не совпадал. У гибрида № 403 частота образования каллусов была наименьшей, однако регенерация растений составила 100%. Напротив, у гаплоида № 408 наблюдалась самая низкая частота регенерации растений при 100%-й частоте каллусообразования. Методом соматического эмбриогенеза *in vitro* были размножены все использованные в опыте генотипы.

Выводы. Для создания исходного материала в селекции тритикале были использованы культура незрелых зародышей, культура пыльников и микрклональное размножение *in vitro*. Завязываемость гибридных зерновок в скрещиваниях твердой пшеницы с рожью варьировала от 10,4 до 47,7%. Наибольшая частота завязывания гибридных зерновок обнаружена в скрещиваниях, где материнскими формами служили сорта твердой пшеницы Амазонка (47,7%), Диона (37,5%) и Аксинит (37,6%). Фертильные амфидиплоиды (первичные гексаплоидные тритикале) были получены после удвоения числа хромосом. Доразвивание незрелых зародышей *in vitro* применялось и для получения гибридов тритикале с мягкой пшеницей в тех случаях, когда она служила материнским родителем в скрещиваниях.

Эффективность гаплопродукции в культуре пыльников тритикале зависела от генотипа. Частота формирования эмбриогенных пыльников варьировала от 6,7 до 17,4%, регенерация растений от полученных новообразований составила 11,4–31,4%. Из 338 полученных растений 68 были зелеными и 270 – альбиносами.

Микрклональное размножение *in vitro* с использованием сегментов молодых колосьев в качестве эксплантов позволило сохранить и размножить стерильные растения для дальнейших работ по восстановлению их фертильности.

3. Эффективность микроклонального размножения тритикале в культуре *in vitro* сегментов колосьев

3. The efficiency of microclonal propagation of triticale in *in vitro* head segments culture

Генотип	Кол-во эксплантов, шт.	Частота образования каллусов		Кол-во каллусов за 1–2 пассаж	Получено растений	
		шт.	%		шт.	%
399 ¹	9	6	66,7	17	2	11,8
403 ¹	17	3	17,7	49	49	100,0
404 ²	7	4	57,1	15	10	66,7
405 ² , 406 ²	22	20	90,9	52	10	19,2
408 ²	4	4	100,0	24	2	8,3
411 ² , 412 ²	17	14	82,4	43	20	46,5
414 ²	18	12	66,7	31	17	54,8
444 ²	8	5	62,5	18	4	22,2
Всего	102	78	76,5	249	116	41,2
F _{факт}	–	–	5,19*	–	–	23,9*
НСР ₀₅	–	–	33,5	–	–	20,0

Примечание: ¹ – гибриды: 399 F₁ Прикумчанка/Красноколоска; 403 F₁ Гелиос/Красноколоска; ² – гаплоиды: Л.15, мягкая пш./тритикале АД-1.

Библиографические ссылки

- Гордей И. А. Тритикале. Генетические основы создания. Минск: Наука и техника, 1992. 285 с.
- Дьячук Т. И., Акинина В. Н., Кибкало И. А. и др. Биотехнология создания селекционного материала озимой гексаплоидной тритикале (*Triticosecale Wittmack*). Саратов, 2013. 27 с.
- Игнатова С. В. Клеточные технологии в растениеводстве, генетике и селекции возделываемых растений: задачи, возможности, разработки систем *in vitro*. Одесса: Астропринт, 2011. 224 с.
- De Filippis L. F. Crop Improvement Through Tissue Culture / ed. by P. Ahmad et al. // Improvement of Crops in the Era of Climatic Changes, Vol. 1, 289. Springer Science + Business Media. New York, 2014. Pp. 289–346. DOI: 10.1007/978-1-4614-8830-9_12.
- Gosal S. S., Wani S. H. Cell and Tissue culture Approaches in Relation to Crop Improvement // Biotechnologies of Crop Improvement. Springer International Publishing AG, part of Springer Nature. 2018. Vol. 1. Pp. 1–54. DOI: 10.1007/978-3-319-78283-6_1.
- Krzewska M., Czyczyło-Mysza I., Dubas E. Quantitative trait loci associated with androgenetic responsiveness in triticale (*x Triticosecale Wittm.*) anther culture // Plant Cell Rep. 2012. Vol. 31. Pp. 2099–2108.
- Lulsdorf M., Ferrie A., Slater S. M. H., Yuan H. Y. Methods and Role of Embryo Rescue Technique in Alien Gene Transfer / ed. by A. Pratap, J. Kumar // Alien Gene Transfer in Crop Plants, Vol. 1: Innovations, Methods and Risk Assessment. Springer Science + Business Media. New York, 2014. Pp. 77–103. DOI: 10.1007/978-1-4614-8585-8_4.
- Wędzony M., Żur I., Krzewska M., Dubas E., Szechyńska-Hebda M., Wąsek I. Doubled Haploids in Triticale / ed. by F. Eudes // Triticale: Springer International Publishing. Switzerland, 2015. Pp. 11–128. DOI: 10.1007/978-3-319-22551-7_6.

References

- Gordej I. A. Triticale. Geneticheskie osnovy sozdaniya [Triticale. Genetic basis of development]. Minsk: Nauka i tekhnika, 1992. 285 s.
- D'yachuk T. I., Akinina V. N., Kibkalo I. A. i dr. Biotekhnologiya sozdaniya selekcionnogo materiala ozimoy geksaploidnoj tritikale (*Triticosecale Wittmack*) [Biotechnology for the development of breeding material for winter hexaploid triticale (*Triticosecale Wittmack*)]. Saratov, 2013. 27 s.
- Ignatova S. V. Kletochnye tekhnologii v rastenievodstve, genetike i selekcii vozdel'yaemykh rastenij: zadachi, vozmozhnosti, razrabotki sistem *in vitro* [Cell technologies in plant breeding, genetics and breeding of cultivated plants: tasks, opportunities, development of *in vitro* systems]. Odessa: Astroprint, 2011. 224 s.
- De Filippis L. F. Crop Improvement Through Tissue Culture / ed. by P. Ahmad et al. // Improvement of Crops in the Era of Climatic Changes, Vol. 1, 289. Springer Science + Business Media. New York, 2014. Pp. 289–346. DOI: 10.1007/978-1-4614-8830-9_12.
- Gosal S. S., Wani S. H. Cell and Tissue culture Approaches in Relation to Crop Improvement // Biotechnologies of Crop Improvement. Springer International Publishing AG, part of Springer Nature. 2018. Vol. 1. Pp. 1–54. DOI: 10.1007/978-3-319-78283-6_1.

6. Krzewska M., Czyczyło-Mysza I., Dubas E. Quantitative trait loci associated with androgenetic responsiveness in triticale (*x Triticosecale Wittm.*) anther culture // *Plant Cell Rep.* 2012. Vol. 31. Pp. 2099–2108.
7. Lulsdorf M., Ferrie A., Slater S. M. H., Yuan H. Y. Methods and Role of Embryo Rescue Technique in Alien Gene Transfer / ed. by A. Pratap, J. Kumar // *Alien Gene Transfer in Crop Plants*, Vol. 1: Innovations, Methods and Risk Assessment. Springer Science + Business Media. New York, 2014. Pp. 77–103. DOI: 10.1007/978-1-4614-8585-8_4.
8. Wędzony M., Żur I., Krzewska M., Dubas E., Szechyńska-Hebda M., Wąsek I. Doubled Haploids in Triticale / ed. by F. Eudes // *Triticale*: Springer International Publishing. Switzerland, 2015. Pp. 11–128. DOI: 10.1007/978-3-319-22551-7_6.

Поступила: 18.11.19; принята к публикации: 13.01.20.

Критерии авторства. Авторы статьи подтверждают, что имеют на статью равные права и несут равную ответственность за плагиат.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Авторский вклад. Акинина В. Н., Дьячук Т. И. – концептуализация исследования, анализ данных и их интерпретация, подготовка рукописи; Жилин С. В. – подготовка опыта, выполнение полевых/лабораторных опытов и сбор данных; Калашникова Э. В. – выполнение полевых/лабораторных опытов и сбор данных.

Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.