

ИЗМЕНЧИВОСТЬ ГАПЛОИДОВ РИСА, ПОЛУЧЕННЫХ В КУЛЬТУРЕ ПЫЛЬНИКОВ *in vitro*

М.В. Илюшко, кандидат биологических наук, **М.В. Ромашова**, кандидат сельскохозяйственных наук

Федеральный научный центр агробιοтехнологий Дальнего Востока им. А.К. Чайки,
692539, Приморский край, п. Тимирязевский, ул. Воложенина, 30
E-mail: ilyushkoiris@mail.ru

*Изучена морфологическая изменчивость гаплоидных растений и удвоенных гаплоидов риса, полученных на одной каллусной линии в культуре пыльников *in vitro*. Работа проведена на растениях риса *Oryza sativa* L. подвида *japonica* Kato сорта Каскад. Регенерантные растения одной каллусной линии из одного пыльника риса (всего четыре линии) разделяли на две-три группы по 20-30 растений в зависимости от объема выборки в порядке их дифференциации на каллусе и высадки на среду укоренения. На двух каллусных линиях (15.1 и 18.1) образовалась половина гаплоидов, половина удвоенных гаплоидов, на двух других каллусных линиях (5.1 и 7.2) – многочисленные гаплоиды. На каллусных линиях с многочисленными гаплоидами (5.1 и 7.2) с увеличением порядкового номера регенеранта происходило уменьшение размеров растений (их высота, число цветков на главной метелке, число метелок). На линиях 15.1 и 18.1 между группами гаплоидов и группами удвоенных гаплоидов статистически значимых различий не выявлено. В селекционных целях для индуцированного удвоения числа хромосом у гаплоидных регенерантов антитубулиновыми веществами типа колхицин целесообразней использовать растения, формирующиеся на каллусе в числе первых. Между гаплоидами четырех каллусных линий и удвоенными гаплоидами двух каллусных линий с помощью T^2 -критерия Хотеллинга, рассчитанного по всему комплексу биометрических признаков, выявлены статистически значимые различия (при $p=0,001$). Гаплоиды разных линий различались по трем или четырем признакам, удвоенные гаплоиды – по трем из пяти признаков (длина метелки, продуктивная кустистость и высота растений). Сорта, представляющие определенный интерес для селекционеров, можно улучшить с помощью культуры пыльников *in vitro*.*

VARIABILITY OF RICE HAPLOIDS OBTAINED IN ANTHER CULTURE *IN VITRO*

Ilyushko M.V., Romashova M.V.

Federal Scientific Centre of Agrobiotechnology of the Far East named A.K. Chaika,
692539, Primorskiy kray, p. Timiryazevskiy, ul. Volozhenina, 30
E-mail: ilyushkoiris@mail.ru

*Morphological variability of haploid plants and doubled haploids of rice obtained on one callus line in anther culture *in vitro* was studied. The work was carried out on rice plants *Oryza sativa* L. subspecies *japonica* Kato variety Cascade. Regenerant plants of one callus line obtained from one rice anther (four in total) were divided into two or three groups of 20-30 plants, depending on the sample size in order of their differentiation on callus and transplantation on the rooting medium. Two callus lines (15.1 and 18.1) formed half of the haploids, half of the doubled haploids, and two other callus lines (5.1 and 7.2) – numerous haploids. On callus lines with numerous haploids (5.1 and 7.2), as the regenant number increases, the size of plants decreases (plant height, number of flowers on the main panicle, number of panicles). On the lines 15.1 and 18.1 between groups of haploids and between groups of doubled haploids statistically significant differences absent. In breeding purposes for the induced doubling of the number of chromosomes in haploid regenerants with antitubulin substances such as colchicine, it is advisable to use plants that form on callus among the first. Between haploids of four callus lines and doubled haploids of two callus lines, statistically significant differences (at $p=0.001$) were revealed using the Hotelling's T^2 -criterion, calculated for the whole complex of biometric features. Haploids of different lines differed in three or four of them, doubled haploids on three of the five signs (length of panicle, productive bushiness and plant height). Varieties of interest to breeders may be improved by anther culture *in vitro*.*

Ключевые слова: *Oryza sativa* L., андрогенез *in vitro*, гаплоиды, удвоенные гаплоиды, изменчивость

Key words: *Oryza sativa* L., androgenesis *in vitro*, haploids, doubled haploids, variability

Гаплоидные технологии исследователи рассматривают как привлекательные биотехнологические методы, позволяющие быстро перевести гетерозиготные гибриды в константные гомозиготные линии, тем самым резко сократить сроки селекционного процесса [1, 2]. Культура пыльников *in vitro* (андрогенез) – ведущий способ получения гаплоидов и удвоенных гаплоидов у ряда сельскохозяйственных растений [1, 3], что позволило добиться существенных успехов в селекции этих культур [1, 2, 4].

Исследования по гаплоидии растений можно разделить на две основные группы. В первую входит изучение собственно процесса андрогенеза и факторов, влияющих на его эффективность, таких как условия выращивания донорных растений, стадия развития микроспор, условия культивирования *in vitro*, генотип культивируемого растения [1, 3, 4]. У части гаплоидов происходит спонтанное удвоение набора хромосом на питательной среде *in vitro*: в зависимости от вида культуры и условий культивирования от 30 до 87% [1,

3]. Поэтому вторая группа исследований – это подбор способов перевода оставшихся гаплоидных растений в удвоенные гаплоиды и оценка их селекционной ценности [2, 4].

Известно, что растения-регенеранты, образующиеся в культуре пыльников *in vitro*, не всегда гаплоидны и дигаплоидны [2, 5, 6]. В ряде работ показана различная плоидность таких регенерантов, полученных из пыльников одной гибридной комбинации или одного генотипа. Среди них встречаются гаплоиды, удвоенные гаплоиды, триплоиды, тетраплоиды, пентаплоиды, анеуплоиды и миксоплоидные растения [7–14], что влечет за собой соответствующую фенотипическую изменчивость регенерантов [7, 12–14]. Гаплоидные растения риса характеризуются в три раза большей изменчивостью по содержанию ядерной ДНК, чем удвоенные гаплоиды [15]. С.И. Малецкий с соавт. [16], изучая изменчивость растений сахарной свеклы, тоже обнаружил более высокую эпипластомную и эпигеномную нестабильность у гаплоидных геномов по сравнению с удвоенными гаплоидами.

В доступной литературе мы не обнаружили работ, посвященных изучению разнообразия андрогенных гаплоидов, происходящих от одного пыльника. Теоретически считается, что один культивируемый пыльник может давать более 1000 гаплоидных растений [17]. Практически на гибридах риса нам удавалось получить до 420 растений из одного пыльника (неопубликованные данные). Некоторые авторы считают, что гаплоиды представляют собой клоны [6, 18]. Однако известно, что на одной каллусной линии риса могут формироваться растения-регенеранты разного уровня плоидности: от гаплоидов до тетраплоидов [19]. При наличии геномной изменчивости в пределах одной каллусной линии нельзя исключить и генетической изменчивости среди регенерантов одной группы (гаплоидов или удвоенных гаплоидов). Генетическая изменчивость в популяции удвоенных гаплоидов риса имеет выраженное фенотипическое свойство [20], что можно ожидать и у гаплоидов. Данные о степени однородности гаплоидов, полученных из одного пыльника, необходимы для их перевода на диплоидный уровень при создании исходного материала для селекции растений.

Целью настоящей работы было изучение морфологической изменчивости гаплоидных растений риса, полученных на одной каллусной линии в культуре пыльников *in vitro*.

Методика. Исследования проведены на растениях риса *Oryza sativa* L. подвида *japonica* Kato сорта Каскад. Исходные растения выращивали в климатической камере в весенний период при температуре 21°C, освещенности 5000 люкс, влажности 70%, фотопериоде 14/10 ч. Методика холодной обработки пыльников, культивирование пыльников, каллусов и регенерантов в условиях *in vitro* приведена ранее [19].

Зеленые регенеранты R₀ с развитой корневой системой высаживали в горшечную культуру и продолжали выращивать в условиях культуральной комнаты до образования семян у линий удвоенных гаплоидов. Гаплоидные растения характеризовались мелкими цветками и стерильностью. Регенерантные растения одной

каллусной линии, полученной из одного пыльника риса, разделяли на две-три группы в зависимости от объема выборки в порядке их дифференциации на каллусе и высадки на среду укоренения. Измеряли следующие биометрические показатели: высоту растения (см), длину главной метелки (см), число цветков главной метелки (шт.), число метелок на растении (шт.), количество семян главной метелки для удвоенных гаплоидов (шт.).

Статистические расчеты (средние значения признаков, коэффициент вариации, t-критерий Сьюдента, T²-критерий Хотеллинга) проведены с использованием программы Statistica.

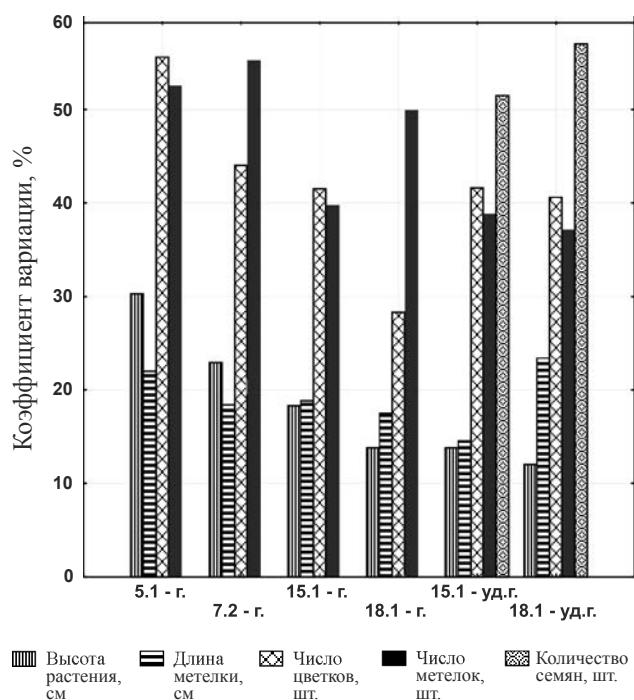
Результаты и обсуждение. Для работы выбрали четыре каллусные линии риса, каждая из которых получена от одного пыльника с многочисленными зелеными регенерантами. На каждой каллусной линии образовались гаплоиды и удвоенные гаплоиды: на линии 5.1 – соответственно 86 и 1 шт., 7.2 – 90 и 3, 15.1 – 40 и 45, 18.1 – 44 и 51 шт., то есть две из них были с многочисленными гаплоидами, а две – с большим числом гаплоидов и удвоенных гаплоидов. Для риса характерно спонтанное удвоение хромосом в гаплоидных клетках каллуса, что ведет к многочисленным удвоенным гаплоидам [1, 3], как в линиях 15.1 и 18.1. На каллусных линиях 5.1 и 7.2 с единичными удвоенными гаплоидами их образование, возможно, произошло вследствие нередукции хромосом, свойственной гаплоидам многих видов растений, и служит одним из путей формирования небольшого количества фертильной пыльцы у гаплоидов [21]. В целом удвоенные гаплоиды крупнее, чем гаплоиды, по высоте и длине метелки; гаплоиды сильнее кустятся и формируют большее число мелких цветков (табл.), что отмечено для риса ранее [5].

Разделив гаплоидные растения четырех каллусных линий и удвоенные гаплоиды двух каллусных линий на группы, получили следующие результаты. На каллусных линиях с многочисленными гаплоидами (5.1 и 7.2) с увеличением порядкового номера регенеранта уменьшились размеры растений (высота, число цветков на главной метелке, число метелок). На линиях 15.1. и 18.1 между группами гаплоидов и группами удвоенных гаплоидов статистически значимых различий не выявлено (табл.). Первые две каллусные линии (5.1 и 7.1) характеризуются большей изменчивостью биометрических признаков гаплоидных растений, чем две другие, несущие удвоенные гаплоиды (рис.). Поскольку в андрогенных каллусах распространена хромосомная изменчивость, приводящая к изменению числа хромосом у регенерантов [2, 5, 6], можно предположить потерю части хромосом или отдельных участков хромосом в процессе культивирования каллусов риса, и, как следствие, уменьшение размеров гаплоидных регенерантов. В отдельных случаях минимальное содержание ядерной ДНК у гаплоидов риса на треть меньше, чем среднестатистическое значение гаплоидов, полученных от одного гибридного растения [15]. На каллусных линиях, где различий биометрических признаков между группами гаплоидных растений не выявлено (15.1 и 18.1), образовалось меньше

Средние значения признаков гаплоидов и удвоенных гаплоидов в андрогенных каллусных линиях риса

Номер каллусной линии	Номер группы	Объем выборки, шт.	Высота растения, см	Длина метелки, см	Число цветков на метелке, шт.	Число метелок на растении, шт.	Число семян на метелке, шт.
5.1– гаплоиды	1	30	32,0**	7,1	63,0*	1,2	-
	2	28	27,3**	6,8	43,9*	1,0	-
	3	28	22,9**	6,8	38,9	1,0	-
	Общее число	86	27,5	6,9	48,9	1,1	-
7.2 – гаплоиды	1	30	30,1**	8,1	87,1**	2,8**	-
	2	30	26,0*	8,0	63,8*	1,5**	-
	3	30	24,3*	8,0	68,5*	1,1**	-
	Общее число	90	26,8	8,0	73,1	1,8	-
15.1 – гаплоиды	1	20	32,5	8,0	61,6	1,2	-
	2	20	35,3	8,6	76,7	1,4	-
	Общее число	40	33,9	8,3	68,8	1,3	-
18.1 – гаплоиды	1	22	39,1	8,8	86,5	2,6*	-
	2	22	37,8	8,4	80,6	1,9*	-
	Общее число	44	38,5	8,6	83,6	2,25	-
15.1 – удвоенные гаплоиды	1	23	48,4	9,0	29,4	1,3	21,0
	2	22	45,4	9,0	29,1	1,2	18,2
	Общее число	45	46,9	9,0	29,3	1,2	19,6
18.1 – удвоенные гаплоиды	1	25	48,0	9,7	32,3	1,4	19,3
	2	26	50,6	10,0	28,9	1,7	18,3
	Общее число	51	49,3	9,8	30,6	1,5	18,8

* Достоверные различия при $p < 0,05$ с одной из групп. ** Достоверные различия при $p < 0,05$ с двумя группами.



Изменчивость признаков гаплоидов и удвоенных гаплоидов в андрогенных каллусных линиях риса.

гаплоидов, а часть клеток каллуса после спонтанного удвоения хромосом пролиферировала в удвоенные гаплоиды. Таким образом, в селекционных целях для индуцированного удвоения числа хромосом у гаплоидных регенерантов антитубулиновыми веществами типа колхицин целесообразней использовать растения, формирующиеся на каллусе в числе первых.

Между гаплоидами четырех каллусных линий и удвоенными гаплоидами двух каллусных линий с помощью T^2 -критерия Хотеллинга, рассчитанного по всему комплексу биометрических признаков, выявлены статистически значимые различия (при $p=0,001$). Гаплоиды разных линий различались по трем или четырем признакам, удвоенные гаплоиды – по трем из пяти признаков (длина метелки, продуктивная кустистость и высота растений).

Теоретически из-за идентичности геномов разнообразие гаплоидов, получаемых из линий, должно быть сильно ограничено [21]. Каскад – сорт риса, выведенный из одной линии гибридного происхождения. Поэтому можно было ожидать как минимум однообразия линий удвоенных гаплоидов. Однако выявлены различия как между гаплоидами разных каллусных линий, так и между удвоенными гаплоидами двух линий. Известно, что у диплоидных линий за три года накапливается достаточное количество мутаций,

чтобы можно было получить ряд новых линий [21], как у сорта Каскад. В эксперименте дополнительно выделилась одна каллусная линия, на которой образовались гаплоидные регенеранты и удвоенные гаплоиды с полосатыми листьями. Видимо, хлорофиллдефектность – это результат спонтанного мутационного процесса. Сорта, представляющие определенный интерес для селекционеров, можно улучшить с помощью культуры пыльников *in vitro*.

Литература.

- Mishra R., Rao G.J.N. *In-vitro* androgenesis in rice: advantages, constraints and future prospects. // *Rice Scienc.* – 2016. – 23(2). – P.57-68.
- Germana M.A. Gametic embryogenesis and haploid technology as valuable support to plant breeding // *Plant Cell Rep.* – 2011. – V. 30. – P. 839-857.
- Datta S.K. Androgenic haploids: factors controlling development and its application in crop improvement. // *Current Science.* – 2005. – 89(11). – P.1870-1878.
- Dunwell J.M. Haploids in flowering plants: origins and exploitation. // *Plant Biotechnol. J.* – 2010. – 8. – P. 377-424.
- Кучеренко Л.А., Харченко П.Н. Использование метода культуры тканей в селекции риса // *Сельское хозяйство за рубежом.* – 1975. – №11. – С. 20-21.
- Круглова Н.Н. Инновационная биотехнология андроклининой гаплоидии яровой мягкой пшеницы: эмбриологический подход // *Аграрная Россия.* – 2009. – № 1. – С. 34-38.
- Zagorska N.A., Shtereva L.A., Kruleva M.M. et al. Induced androgenesis in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). III. Characterization of the regenerants // *Plant Cell Reports.* – 2004. – V. 22. – P. 449-456.
- Alermanno L., Guiderdoni E. Increased doubled haploid plant regeneration from rice (*Oryza sativa* L.) anthers cultured on colchicine-supplemented media // *Plant Cell Reports.* – 1994. – V. 13. – P. 432-436.
- Rout P., Naik N., Ngangkham U. et al. Doubled Haploids generated through anther culture from an elite long duration rice hybrid, CRHR32: Method optimization and molecular characterization // *Plant Biotechnology.* – 2016. – V. 33. – P. 177-186.
- Mishra R., Rao G.J.N., Rao R.N. et al. Development and characterization of elite doubled haploid lines from two *Indica* rice hybrids. // *Rice Science.* – 2015. – 22(6). – P.290-299.
- Pauk J., Puolimatka M., Toth K.L., Monostori T. *In vitro* androgenesis of triticale in isolated microspore culture // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* – 2000. – V. 61. – P. 221-229.
- Cistue L., Soriano M., Castillo A.M. et al. Production of doubled haploids in durum wheat (*Triticum turgidum* L.) through isolated microspore culture // *Plant Cell Reports.* – 2006. – V. 25. – P. 257-264.
- Kang T.-J., Yang M.-S., Deckard E. The effect of osmotic potential on anther culture in spring wheat (*Triticum aestivum*) // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* – 2003. – V. 75. – P. 35-40.
- Kasha K.J., Hu T.C., Oro R. et al. Nuclear fusion leads to chromosome doubling during mannitol pretreatment of barley (*Hordeum vulgare* L.) microspores // *Journal of Experimental Botany.* – 2001. – V. 52. – №359 – P. 1227-1238.
- Илюшко М.В., Скапцов М.В., Ромашова М.В. Содержание ядерной ДНК в регенерантах риса, полученных в культуре пыльников *in vitro* // *Сельскохозяйственная биология.* – 2018. – Т. 53. – № 3. – С. 531-538.
- Малецкий С.И., Юданова С.С., Малецкая Е.И. Эпигеномная и эпипластомная изменчивость у гаплоидных и дигаплоидных растений сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) // *Сельскохозяйственная биология.* – 2015. – Т. 50. – С. 579-589.
- Сибикеева Ю.Е., Сибикеев С.Н. Влияние комбинаций чужеродных транслокаций на андрогенез *in vitro* у почти изогенных линий яровой мягкой пшеницы // *Генетика.* – 2014. – Т. 50. – №7. – С. 831-839.
- Heberle-Bors E. *In vitro* haploid formation from pollen: a critical review // *Theor. Appl. Genet.* – 1985. – V. 71. – P. 361-374.
- Илюшко М.В., Ромашова М.В. Регенерационная способность каллусных трансплантантов риса в культуре пыльников *in vitro* // *Аграрный вестник Приморья.* – 2018. – № 1 (9). – С. 5-8.
- Гончарова Ю.К. Использование метода культуры пыльников в селекции риса – Краснодар: ВНИИ риса, 2012. – 91 с.
- Хохлов С.С., Тырнов В.С., Гришина Е.В. и др. Гаплоидия и селекция – М.: Наука, 1976. – 121 с.

Поступила в редакцию 13.06.18
Принята к публикации 13.07.18