

Генетика, селекція, біотехнологія

УДК 633.11:631.523.085:581.
143.6:631.524.86.01
© 2014

С.І. Волощук,
кандидат сільсько-
господарських наук
Миронівський
інститут пшениці
імені В.М. Ремесла
НААН

ІНДУКОВАННИЙ АНДРОГЕНЕЗ У СЕЛЕКЦІЇ ТРИТИКАЛЕ ОЗИМОГО

Розроблено та удосконалено окремі елементи біотехнології створення вихідного матеріалу для селекції тритикале озимого. Отримано новий селекційний матеріал тритикале та проведено його стабілізацію. Виявлено ефективність запропонованих біотехнологічних заходів, що дає змогу прискорити селекційний процес.

Ключові слова: тритикале, гібридизація, андрогенез, дигаплоїди.

Вимоги сучасності потребують інтенсифікації та прискорення процесу створення нових високопродуктивних сортів, зокрема й тритикале озимого. Одним із способів досягнення цього є використання гаплоїдних технологій, які дають змогу значно скоротити процес отримання константного вихідного матеріалу. Однак їх широке застосування значною мірою гальмується недостатнім розвитком методів створення дигаплоїдних ліній (ДГЛ), які могли б спростити і прискорити селекцію [5, 10] з використанням сучасних можливостей маркерної селекції.

Гаплоїди тритикале вперше були створені через культуру пиляків [6, 14], а також з використанням гаплопродюсерів, зокрема кукурудзи [10]. Численні зусилля були спрямовані на визначення оптимальних умов і складу середовищ [2, 5–7, 9, 11, 12, 14]. Технологію отримання дигаплоїдів з використанням культури ізольованих мікроспор тритикале озимого вперше описано J. Pauk [9] і розвинуто рядом інших дослідників [8, 13]. Однак дослідження в цьому напрямі в нашій країні, та й в усьому світі, досить нечисленні. Актуальним завданням залишається розробка придатних для застосування в селекційній практиці ефективних і недорогих методів створення константних ДГЛ.

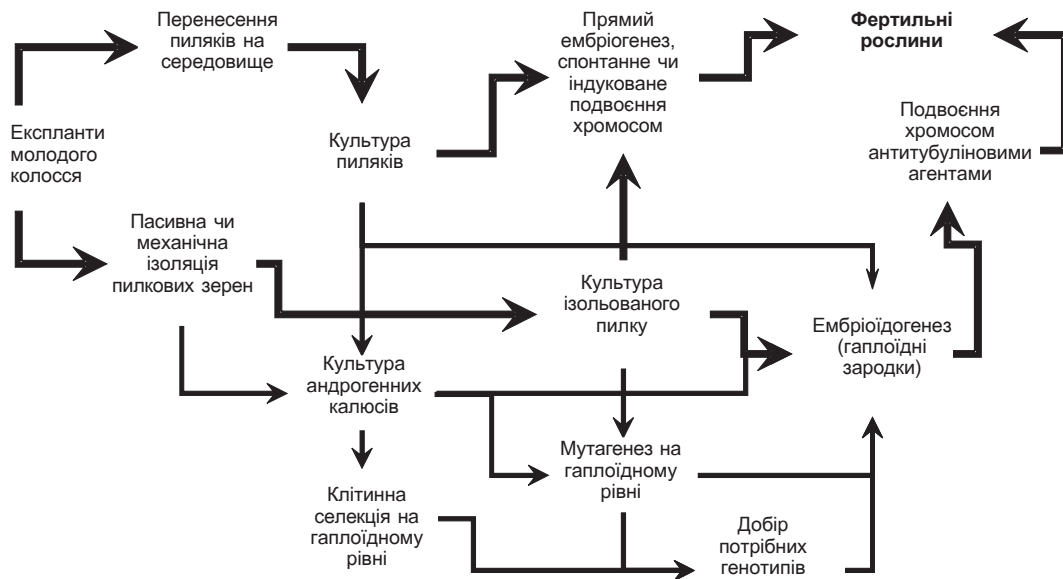
Мета досліджень — розробити просту ефективну біотехнологію отримання дигаплоїдів тритикале, оцінити її ефективність і створити новий вихідний матеріал для селекції тритикале озимого.

Матеріали і методи досліджень. Об'єкт

досліджень — сорти тритикале озимого, між-сортові тритикальні та тритикально-пшеничні гібриди F_1 , отримані з них андрогенні культури та ДГЛ. Рослини — донори пиляків вирощені в польових умовах. Культуральні процедури виконували згідно з методиками [2]. Середовища (N6, P-2, P-4, MS, CHB-2, W14, 190-2, NPB-99), стерилізовані фільтруванням, зберігали за кімнатної температури у стерильних умовах. Андрогенні культури та ДГЛ отримували, як описано нами раніше [1]. Оцінку ДГЛ проводили згідно з методикою [3].

Результати досліджень. Протягом останніх років у відділі біотехнології селекційного процесу Миронівського інституту пшениці імені В.М. Ремесла НААН (МІП) було розроблено і вдосконалено технологію застосування андрогенезу у селекційному процесі тритикале озимого (рисунок).

Залежно від потреб і завдань селекційних програм можна використовувати культуру пиляків чи культуру ізольованих мікроспор як для отримання ДГЛ з гібридного матеріалу, так і для отримання калюсних культур, які можна використати для добору чи для мутагенезу *in vitro* на гаплоїдному рівні. Оскільки гаплоїдні клітинні лінії, отримані способом селекції, чи мутанти, отримані *in vitro*, після диплоїдизації апіорі стають константними, це скорочує час на отримання нового селекційного матеріалу. При цьому саме культура ізольованих мікроспор дає змогу застосовувати гаплоїдні технології у дійсно широких масштабах.



Технологія використання андрогенних культур у селекційному процесі тритикале озимого

Основні етапи та ключові моменти удосконаленої нами технології наведено у табл. 1.

На основі наших досліджень, порівнюючи ефективність застосування культури пиляків і культури ізольованих мікроспор, можна однозначно стверджувати про значні переваги останньої — її ефективність переважає культуру пиляків принаймні у 10 разів (табл. 2).

Андрогенна відповідь значною мірою залежить від генотипу. При цьому важливо зазначити, що використання технології культивування ізольованих мікроспор дає змогу отримувати ДГЛ навіть з некультурабельних у культурі пиляків генотипів і значно підвищити ефективність для слабокультурабельних генотипів. Важливим моментом технології є концентрація мікроспор на одиницю об'єму, яка за результатами наших дослідів, повинна становити від $5 \cdot 10^4$ до $2,5 \cdot 10^5$ мікроспор/мл.

Крім цього, в культурі ізольованих мікроспор спостерігали явище спонтанного подвоєння хромосомного набору, частота якого сягала 25%. Колхіцин традиційно застосовують на молодих рослинах на стадії 3–4-х пагонів, використовуючи техніку інфільтрації чи занурення [4]. Проте застосування антитубулінових (пошкоджувальних веретено поділу) агентів на етапі 5 (тобто добавка у середовище культивування) давало змогу отримувати до 90% диплоїдизованих ембріодів і регенерантів, виключивши етап 7 (див. табл. 1).

Наявність таких агентів у культурі мікроспор помітно не впливала на частоту ембріогенезу і подальший розвиток ембріодів порівняно до контролю; частка ембріодів в індивідуальних варіантах незначно відрізнялась від контролю. Середня частка ДГЛ після додавання трифлураліну становила 85,7%, колхіцину — 74,1, орізалину — 66,5%, тоді як рівень спонтанної диплоїдизації не перевищував 25% і в середньому становив 20,1%.

Хоча ембріогенний потенціал виявляють менше 0,01% мікроспор, завдяки їх значній кількості можна отримати в середньому більше 10 рослин на один експлантований колос. Ефективність технології підтверджено під час вивчення 8 генотипів міжсортних гібридів тритикале (табл. 3). Слід зазначити, що гібридні комбінації різнилися між собою як за кількістю отриманих зелених регенерантів, так і за кількістю отриманих дигаплоїдів на колос. Припускаємо, що вивчення генетичного контролю андрогагенної відповіді в культурі ізольованого пилку та подальше удосконалення технології дасть змогу поліпшити ці показники і зменшити вплив генотипу.

Із застосуванням запропонованого методу з гібридних комбінацій тритикале озимого отримано 907 ДГЛ. За 4 роки ці лінії пройшли всі етапи селекційного процесу (селекційні та контрольні розсадники, попереднє сортовивчення) і кращі з них (34 лінії) вже 2-й рік перебувають

1. Протокол отримання андрогенних культур з ізолюваних мікроспор

Етап роботи	Ключові параметри та дії	Результат
1. Збір донорського матеріалу	Цитологічний контроль стадії розвитку мікроспор (рання чи середня)	Компетентний матеріал
2. Попередня обробка (підвищення ембріогенного потенціалу)	Висока (+33 °С, 3 доби) чи низька (+4 °С, 4–14 діб) температури, витримування на «голодному» (за цукрами і азотом) середовищі з використанням (або без) хімічних індукторів	Життєздатні мікроспори з підвищеним ембріогенним потенціалом
3. Стерилізація	Поверхнева стерилізація колосся; спирт чи гіпохлорит натрію; подальша робота в стерильних умовах	Асептичний вихідний матеріал
4. Ізоляція і очистка мікроспор	Гомогенізація колосся чи пиляків (швидкість і час) або мацерація ізолюваних пиляків, фільтрування і очистка на градієнті густини 0,3 М манніт/0,6 М мальтоза; цитологічний контроль життєздатності	Однорідна популяція ембріогенних мікроспор
5. Індукція розвитку ембріодів	Рідке стерилізоване фільтруванням середовище; 9%-ва мальтоза; осмотичність 300–320 мОsm; фікол; щільність мікроспор від $5 \cdot 10^4$ до $2,5 \cdot 10^5$ /мл; забезпечення гормонального балансу (2,4-Д, ФОК, кінетин, зеатин, АБК); кокультивування з незаплідненими зав'язями; додавання AgNO_3 ; температура 26–28 °С; темрява	Зрілі ембріоди (здатні до проростання) у великих кількостях
6. Регенерація	Напівтверде (0,2% агарози) безгормональне середовище; 0,9%-ва мальтоза чи сахароза; світло	Зелені регенеранти
7. Подвоєння набору хромосом	Обробка рослин колхіцином (чи іншими антитубулінами) чи додавання їх у андрогенне середовище; цитологічний контроль і контроль величини проростків	Дигаплоїдні регенеранти
8. Приживлення регенерантів	Стерильні ґрунтово-піщані суміші з додаванням гідрогелю, підтримання волого-температурного режиму на початкових етапах укорінення	Дигаплоїдні рослини і їх насіння

2. Порівняння ефективності культури пиляків і культури ізолюваних мікроспор (середнє за 2007–2012 рр.)

Сорт	Кількість зелених рослин на 100 експлантованих пиляків			Частка зелених рослин-регенерантів, %	
	Культура пиляків (КП)	Культура мікроспор (КМС)	КМС/КП	КП	КМС
Амур	30,2	396,8**	13,12	74,0±5,1	77,7±5,4
Раво	17,6	214,7**	12,19	92,7±3,0	87,8±4,5
АДМ 11	6,2	113,6**	18,33	72,8±6,4	88,6±3,8
Grenado	3,8	71,6**	18,83	61,5±6,3	49,6±6,8
Адась	0	10,0**	—	0	26,2±4,5
Інтерес	0	3,7*	—	0	16,2±5,1
Середнє	9,6	135,1	—	50,2	57,6

*, ** — відмінності вірогідні за $P < 0,05$ та $0,01$ відповідно.

3. Андрогенез і регенерація гібридів тритикале у культурі мікроспор

Гібриди F ₁	Життєздатних мікроспор, %	Кількість ЕПС на колос	Пересаджених андрогенних зародків на середовище для регенерації		Частка регенерації від ЕПС	Зелених ДГ-рослин, від регенерантів	Дигаплоїдів/ колос
			кількість	%			
АДМ 4/Валентин 90	75	380	65	17,1	42,6	73,5	20
Жицень/Амур	76	390	105	26,9	30,5	71,9	23
АДМ 11/Адась	70	222	75	33,8	17,3	84,6	11
Адась/АДМ 11	58	254	70	27,6	27,1	57,9	11
Рауо/Амур	59	145	55	37,9	21,8	41,7	5
Grenado/АДМ 11	60	98	38	38,8	15,8	33,3	2
Grenado/Амур	65	104	51	49,0	23,5	50	6
Руно/АДМ 11	69	158	39	24,7	35,9	64,3	9
Середнє	67	219	62	32,0	26,8	59,7	11

Примітка. ЕПС — ембріодоподібні структури.

4. Ефективність отримання дигаплоїдних ліній з беккросів тритикале-пшеничних гібридів у культурі ізолюваних мікроспор

Генотип (тритикале/пшениця// тритикале) ВС1* (тритикале/ пшениця/пшениця) ВС2	Ембріодогенез, %	Зелених рослин усього	Зелених рослин/колос	Дигаплоїдів, кількість	Дигаплоїдів/ колос
АДМ11/Смуглянка//АДМ 11	45,9	81	3,7	65	2,3
Валентин 90/Веста// Валентин 90	35,8	90	4,2	71	2,8
АДМ 4/Калинова//АДМ 4	47,6	105	5,4	94	4,4
АДМ 11/Подяка//АДМ 11	82,4	149	6,8	29	5,1
Жицень/Зірка/Зірка	69,3	151	9,2	103	6,2
Адась/Епоха одеська// Епоха одеська	90,8	184	12,4	113	9,2
Grenado/Волошкова// Волошкова	86,3	144	10,2	115	7,8
Середнє для:					
ВС1	41,1	74,4	4,5	45,6	2,1
ВС2	71,9	144,8	8,7	76,4	6,3
НІР ₀₅	3,3		0,9		0,7

* Курсивом виділено генотипи тритикале.

у конкурсному сортовипробуванні МІП. Гібриди F₁ були отримані 2008 р., ДГЛ — у 2009 р., і таким чином процес стабілізації селекційного матеріалу скорочено принаймні на 3–5 років.

Ще одним важливим аспектом використання індукованого андрогенезу *in vitro* в наших дослідженнях стало створення серій D/R замі-

щених ліній тритикале та пшениці з метою подальшого їх використання як містка для отримання нових пшенично-житніх транслокацій. Установлено ефективність отримання ДГЛ від беккросів (табл. 4). Нині за допомогою геномних SSR-маркерів уже виділено кілька ліній із заміщеннями по одній хромосомі.

Висновки

Розроблені методичні підходи культивування ізольованих мікроспор тритикале озимого дають змогу створити удосконалену біотехнологію отримання ДПЛ *in vitro*, яка скорочує селекційний процес на 3–5 років. Отримано ряд ДПЛ з гібридних популяцій міжсортних

гібридів тритикале озимого та тритикале-пшеничних гібридів, які становлять інтерес для практичної селекції.

Перспективою є розробка нових елементів біотехнології селекційного процесу тритикале озимого.

Бібліографія

1. Волощук С.І. Удосконалення методів масового отримання рекомбінантних дигаплоїдних ліній тритикале/С.І. Волощук, О.О. Заліський, П.О. Філонченко, Г. Д. Волощук//НБТ МІП ім. В.М. Ремесла. — Мюнхен, 2012. — Вип. 11–12. — С. 320–334.
2. Игнатова С.А. Клеточные технологии в растениеводстве, генетике и селекции возделываемых растений/С.А. Игнатова. — Одесса: Астропринт, 2011. — 224 с.
3. Методика проведення експертизи та державного випробування рослин зернових, круп'яних та зернобобових культур//Охорона прав на сорти рослин. — К.: Алефа, 2003. — Вип. 2. — Ч. 2. — 170 с.
4. Bell G.D.H. Investigations in the Triticeae. I. Colchicine techniques for chromosome doubling in interspecific and intergeneric hybridization/G.D.H. Bell //J. Agric. Sci. — 1950. — V. 40. — P. 920.
5. Foroughi-Wehr B. Recurrent selection alternating with haploid steps — a rapid breeding procedure for combining agronomic traits in inbreeders/B. Foroughi-Wehr, G. Wenzel//Theor. Appl. Genet. — 1990. — V. 80. — P. 564–568.
6. Immonen S. Stress treatment and ficoll for improving green plant regeneration in triticale anther culture/S. Immonen, J. Robinson//Plant Sci. — 2000. — V. 150. — P. 77–84.
7. Kozdaj J. Microspore development stages in chilled and unchilled anthers of Triticale (x *Triticosecale* Wittmack)/J. Kozdaj, J. Zimny//Bul. Pol. Acad. Sci. — 1993. — V. 2. — P. 108–116.
8. Oleszczuk S. Direct embryogenesis and green plant regeneration from isolated microspores of hexaploid triticale (x *Triticosecale* Wittmack) cv. Bogol/S. Oleszczuk, S. Sowa, J. Zimny//Plant Cell Rep. — 2004. — V. 22. — P. 885–893.
9. Pauk J. *In vitro* androgenesis of triticale in isolated microspore culture/J. Pauk, M. Puolimatka, T. Lökös, T. Monostori//Plant Cell, Tissue Organ Cult. — 2000. — V. 61. — P. 221–229.
10. Rogalska S. Induction of haploids in triticale (x *Triticosecale* Witt.) by crossing it with corn (*Zea mays*)/S. Rogalska, W. Mikulski//Triticale: today and tomorrow/ H. Guedes-Pinto, N. Darvey, V.P. Carriole (eds). — Kluwer, Dordrecht. — 1996. — P. 379–382.
11. Sun C.S. Cytological studies on the androgenesis of *Triticale*/C.S. Sun, C.C. Wang, C.C. Chu//Acta Bot. Sin. — 1973. — V. 15. — P. 145–154.
12. Touraev A. Efficient microspore embryogenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.) induced by starvation at high temperatures/A. Touraev, A. Indrianto, I. Wrat-schko [et al.]//Sex Plant Reprod. — 1996. — V. 9. — P. 209–215.
13. Tuvešson S. Large-scale production of wheat and triticale doubled haploids through the use of a single-anther culture method/S. Tuvešson, A. Ljungberg, N. Johanson [et al.]//Plant Breed. — 2000. — V. 119. — P. 455–459.
14. Wang Y.Y. The induction of pollen plantlets of *Triticale* and *Capsicum annuum* for anther culture/Y.Y. Wang, C.S. Sun, C.C. Wang, N.F. Chen//Sci. Sin. — 1973. — V. 16. — P. 147–151.

Надійшла 27.01.2014.