

**МОЦНЫЙ И.И.<sup>1</sup>, КУЛЬБИДА М.П.<sup>2</sup>, ЗАМБРИБОРЩ И.С.<sup>1</sup>, ЛОБАНОВА Е.И.<sup>1</sup>,  
ЧЕБОТАРЬ Г.А.<sup>1</sup>, ЧЕБОТАРЬ С.В.<sup>1</sup>, БОЙКО М.С.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Селекционно-генетический институт – Национальный центр семеноводства и стоизучения  
НААНУ

Украина, 65036, г. Одесса, Овидиопольская дорога, 3, e-mail: motsnyyii@gmail.com

<sup>2</sup> ГУ «Институт глазных болезней и тканевой терапии им. В.П. Филатова АМНУ»  
Украина, 65061, г. Одесса, Французский бульвар, 49/51

## **ВЛИЯНИЕ ФАКТОРОВ АНДРОГЕНЕЗА *IN VITRO* НА ПРИЗНАКИ УДВОЕННЫХ ГАПЛОИДОВ ПШЕНИЦЫ**

В настоящее время применение удвоенных гаплоидов всё шире входит в отечественную селекционную практику. Однако, влияние культуральных факторов на некоторые агрономически ценные признаки пшеницы неоднозначно в первых поколениях *ex vitro*, что может существенно исказить оценку селекционного материала и привести к элиминации ценных комбинаций генов при выбраковке материала на ранних этапах селекционного процесса. Для анализа последствий проведения генотипов через культуру *in vitro*, в отношении количественных признаков, которые имеют полигенную де-

терминацию, высокую средовую дисперсию и сильно коррелируют между собой, необходимы методы многомерного статистического анализа, в частности – дискриминантный анализ.

Цель работы – проанализировать связь между фактором андрогенеза *in vitro* в культуре пыльников и количественными признаками растений озимой пшеницы, различных по генам короткостебельности; оценить информативность комплекса признаков для дискриминации линий-дигаплоидов и исходных форм в зависимости от года репродукции в поле.

### **Материалы и методы**

Материал исследования – короткостебельные аналоги двух известных сортов озимой пшеницы селекции СГИ – НЦСС (г. Одесса): Кооператорка К-70 (КК70), Кооператорка К-90 (КК90), Одесская 3 К-75 (Од.3К75), а также сорт

Одесская 51 (Од. 51). Для получения удвоенных гаплоидов отбирали колосья донорных растений с пыльниками, микроспоры которых находились на вакуолизированной стадии развития. Предобработку и стерилизацию материала проводили

по общепринятой методике [1]. Изолированные пыльники высаживали на среду для индукции новообразований – 190-2 в модификации [2], и культивировали 3 суток при температуре 30°C, затем при 24°C до появления новообразований. Сформировавшиеся макроструктуры в дальнейшем культивировали на модифицированной среде MS [1] при 16 часовом фотопериоде. Зелёные регенеранты пересаживали на безгормональную среду MS, яровизировали и доращивали в условиях искусственного климата до семян. Семена с каждого фертильного побега собирали отдельно. Потомство каждого растения-регенеранта считалось самостоятельной линией и изучалось индивидуально. Полученные в результате спонтанного удвоения хромосом дигаллоиды выращивали в поле в 2010 и 2011 годах (поколения D<sub>1</sub> и D<sub>2</sub>). Растения урожая 2011 г. выращивали из семян дигаллоидов предыдущего года, полученных в полевых условиях. При этом исходные формы (P), из которых были по-

лучены дигаллоиды, в обоих вариантах опыта (P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>) выращивались из семян, полученных в полевых условиях.

У всех растений измеряли комплекс признаков, традиционный в селекционной практике: длина соломины (ДС), число побегов в первом (ПК<sub>1</sub>) и во втором ярусе (ПК<sub>2</sub>), продуктивная кустистость (ПК); длина колоса (ДК), число колосков в колосе (ЧКК), число зерен в колосе (ЧЗК), число зерен в колоске (ЧЗк), масса зерна главного колоса (МЗК); число зерен с подгонов (ЧЗП), масса зерна с подгонов (МЗП). По имеющимся измерениям рассчитывали массу 1000 зерен (МТЗ) с растения. Идентификацию аллелей генов короткостебельности проводили методом ПЦР [3]. Для оценки последствий культуральных факторов на комплекс агрономических признаков и информативность каждого из них применяли пошаговую процедуру линейного дискриминантного анализа с включениями (Forward stepwise).

### Результаты и обсуждение

В силу высокой взаимной коррелированности признаков для эффективного различения групп исходных и полученных из них растений-дигаллоидов в оба года исследования оказалось достаточно одной дискриминантной функции. Наиболее информативными оказались признаки ДС, ДК, ЧКК; наименее информативны – продуктивная кустистость и её составляющие (ПК<sub>1</sub>, ПК<sub>2</sub>), а также ЧЗк (табл. 1). В то же время вариация МТЗ не имела никакого отношения к последствиям андрогенеза, а зависела исключительно от генотипа линии, главным образом, по генам *Rht* или условий года (не показано). К то-

му же, информативность признаков менялась в зависимости от линии и поколения дигаллоидов. При этом, если в линии Од.3К75 (аллельный состав генов короткостебельности – *Rht8c Rht-B1b*) исходные и дигаллоидные формы чётко дискриминируются (рис. 1, а, табл. 2), то в линиях КК70 (*Rht8c Rht-B1e*), КК90 (*Rht8c Rht-B1a*) и Од.51 (*Rht8c Rht-B1a*) в данном пространстве признаков полностью отделить исходные формы от дигаллоидов не удаётся. При значительной внутриклассовой дисперсии расстояние между дискриминируемыми классами слишком мало, хотя и статистически значимо (рис. 1, б, табл. 2).

Таблица 1. Информативность признаков для классификации линий по отношению к культуре *in vitro* по величине F<sub>факт.</sub>

При- знак	D <sub>1</sub> (2010 г.)				D <sub>2</sub> (2011 г.)			
	КК70	КК90	Од.3К75	Од.51	КК70	КК90	Од.3К75	Од.51
ПК <sub>1</sub>	0,0	0,0	<b>3,1</b>	0,0	0,0	<b>1,5</b>	0,1	<b>2,6</b>
ПК <sub>2</sub>	0,1	<b>3,7</b>	0,0	0,6	0,0	0,1	0,7	0,3
ПК	0,2	<b>1,8</b>	0,0	0,1	0,2	<b>5,8*</b>	0,5	<b>6,6*</b>
ДС	<b>6,8*</b>	<b>6,6*</b>	<b>9,9**</b>	<b>1,9</b>	<b>7,7**</b>	<b>6,5*</b>	<b>11,3**</b>	<b>28,2***</b>
ДК	0,1	<b>10,6**</b>	<b>6,4*</b>	<b>2,4</b>	0,3	0,1	<b>16,2***</b>	0,7
ЧКК	<b>8,8**</b>	0,8	<b>5,1*</b>	<b>5,4*</b>	0,0	0,0	<b>27,7***</b>	<b>2,5</b>
ЧЗК	<b>4,9*</b>	0,5	<b>8,7**</b>	0,9	<b>5,3*</b>	0,3	0,0	0,6
ЧЗк	<b>2,7</b>	0,8	<b>3,2</b>	0,9	0,0	<b>2,3</b>	0,0	<b>2,6</b>
МЗК	0,2	<b>1,6</b>	<b>5,3*</b>	0,0	0,0	0,4	<b>8,4**</b>	<b>9,1**</b>
ЧЗП	<b>1,3</b>	0,0	0,0	0,0	<b>8,5**</b>	<b>8,1**</b>	0,1	3,0
МЗП	<b>3,2</b>	<b>4,3*</b>	0,1	0,1	0,5	1,0	0,1	0,1

Примечания: \* P<0,05; \*\* P<0,01; \*\*\* P<0,001 (жирным шрифтом отмечены значения признаков, вошедших в модель).

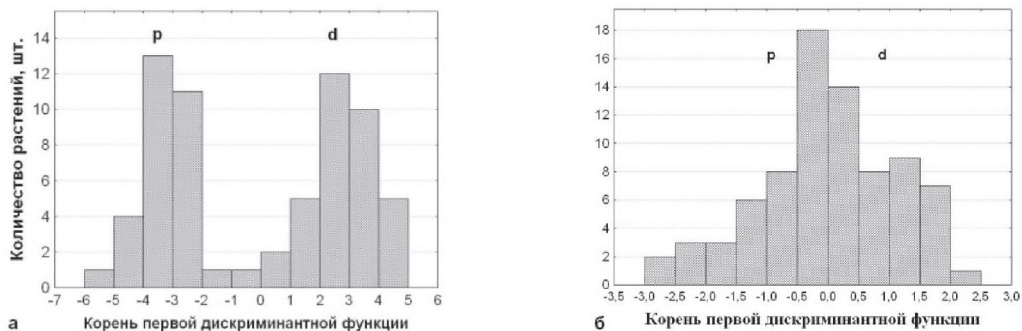


Рис. 1. Диаграмма рассеяния на оси первой дискриминантной функции множества растений исходных форм (**p**) и дигаплоидов (**d**):

а) Од.51К-75, 2011 г.;  $Y=25,104+0,832*МЗК-0,709*ЧКК-1,043*ДК-0,081*ДС$ ;  
 б) КК-70, 2011 г.;  $Y=2,985+0,152*ДС-0,064*ЧЗП-0,069*ЧЗК$

Таблица 2. Расстояния между классами линий, в зависимости от их отношения к процессу андрогенеза *in vitro* (исходные формы-дигаплоиды)

Линия	D <sub>1</sub> (2010 г.)			D <sub>2</sub> (2011 г.)		
	λ Уилк-сона	Квадрат расстояния Махаланобиса	F	λ Уилк-сона	Квадрат расстояния Махаланобиса	F
КК70	0,5	4,4	8,1***	0,8	1,2	7,5***
КК90	0,6	2,7	7,0***	0,8	1,1	4,0**
Од.3К75	0,2	26,3	12,5***	0,1	36,4	140,5***
Од.51	0,6	4,1	7,0**	0,6	2,9	6,2***

Примечания: \*\* P<0,01; \*\*\* P<0,001

Как видно (табл. 3), дискриминантная модель хорошо классифицирует растения генотипа *Rht8c Rht-B1b* (Од.3К75). Однако, информации, заключённой в данном наборе признаков, традиционно используемых в селекционной прак-

тике, недостаточно для надёжного различения растений с аллелями *Rht8c Rht-B1a* и *Rht8c Rht-B1e* (табл. 3, рис. 1, б), особенно во вторую генерацию (D<sub>2</sub>).

Таблица 3. Матрица классификации дискриминантной модели

Линия (генотип)	Наблюдаемый класс *	D <sub>1</sub> (2010 г.)			D <sub>2</sub> (2011 г.)		
		Предсказано		% правильно предсказанных растений	Предсказано		% правильно предсказанных растений
		p	d		p	d	
КК70	<b>p</b>	30	4	88,2	19	14	57,6
( <i>Rht8c Rht-B1e</i> )	<b>d</b>	5	14	73,7	8	38	82,6
КК90	<b>p</b>	32	9	78,0	31	11	73,8
( <i>Rht8c Rht-B1a</i> )	<b>d</b>	7	22	75,9	12	25	67,6
Од.3К75	<b>p</b>	26	0	100,0	31	0	100,0
( <i>Rht8c Rht-B1b</i> )	<b>d</b>	0	5	100,0	0	34	100,0
Од.51	<b>p</b>	23	2	92,0	18	8	69,2
( <i>Rht8c Rht-B1a</i> )	<b>d</b>	2	5	71,4	6	38	86,4

Примечания: \* **p** – исходные формы; **d** – дигаплоиды.

На данном ограниченном материале нельзя сделать однозначный вывод об источнике вариации комплекса изученных признаков, маскирующем влияние процедуры получения дигаплоидов указанных генотипов. Одним из таких источников может быть многообразие линий-дигаплоидов, полученных из одной исходной

формы. Другими – невыравненность фона вируса желтой карликовости ячменя, эпифитотии которого наблюдались в годы проведения исследований, или генетический фон линий (genetic background), в частности генотип по *Rht* генам, проявление которого на фоне последвий процесса андрогенеза определяется неодно-

значно, в зависимости от комбинации этих генов, силы их эффектов, а также селекционной ценности. Относительно последней известно, что генотип *Rht8c Rht-B1a* детектируется, преимущественно, у среднерослых сортов и линий с приемлемой урожайностью в неблагоприятных условиях выращивания. На высоких агрофонах он существенно увеличивает урожайность озимой пшеницы, так как повышает плотность и продуктивность колоса, а также устойчивость к полеганию. При этом не наблюдается каких-либо отличий от генотипов с другими аллелями гена *Rht8* (как например, *Rht8a, b, x*) по продуктивной кустистости растения, числу зёрен с главного колоса и МТЗ [4]. В настоящее время доля генотипов *Rht8c Rht-B1a* в наборе сортов СГИ – НЦСС невелика.

Добавление аллеля *Rht-B1b* к *Rht8c* ведёт к некоторому уменьшению высоты и кустистости растений, а также снижает продуктивность главного колоса и МТЗ, но способствует повышению продуктивности подгонов и урожайности растения в целом [5]. Этот генотип характерен для значительной части современных сортов селекции СГИ – НЦСС. Генотип *Rht8c Rht-B1e* сильнее сокращает длину стебля, снижает устойчивость к болезням, показатели продуктивности и качества зерна [5]. Этот генотип практически не встречается в ассортименте современных сортов СГИ – НЦСС.

Вызывает вопросы причина таких значительных различий между растениями исходной линии Од.3К75 и полученной из нее линии дигаплоидов Од.3К75D (рис. 1 а, табл. 2, табл. 3). Исходя из средних значений признаков (не по-

### Выводы

Процесс андрогенеза *in vitro* оказывает влияние на получаемые растения, однако это влияние неоднозначно. Для генотипов *Rht8c Rht-B1e* и особенно *Rht8c Rht-B1b* показано статистически значимое снижение отдельных показателей линий-дигаплоидов по сравнению с исходными линиями в первые два года после культуры. Исходные линии и их спонтанно удвоенные гаплоиды наиболее существенно различались по

казано) можно предположить, что линия Од.3К75D имеет генотип *Rht8c Rht-B1e*. Предположительно, линия Од.3К75D образовалась из генетически отличной микроспоры или в процессе мутации под влиянием условий образования дигаплоидов. Хотя более вероятным представляется получение дигаплоидов этой линии из пыльников, принадлежавших исходной форме с релевантным генотипом в результате более тривиальных причин, как-то генетическое засорение материала при посеве, в результате перекрестного опыления, при подборе колосьев для культуры или на разных этапах *in vitro*. Поскольку, для проведения через культуру пыльников брались и другие короткостебельные аналоги, и их рекуррентные формы с более широким спектром генотипов [6].

Таким образом, практическое применение андрогенеза *in vitro* в культуре пыльников может быть ограничено существенными недостатками дигаплоидов на первых этапах селекционного процесса. Особенно это касается наиболее селекционно ценного генотипа (*Rht8c Rht-B1b*) из исследованных здесь. Причиной ухудшения показателей удвоенных гаплоидов могут быть отдаленные последствия культуральных факторов как наследственные (гаметоклональная изменчивость, полное отсутствие гетерозигот во всех локусах, гомозиготизация отрицательных рецессивных мутаций), так и пролонгированные модификации (морщинистость эндосперма, недостаток питательных веществ). Поэтому, браковку линий-дигаплоидов целесообразно производить лишь после нескольких лет выращивания и тщательного изучения в полевых условиях.

признакам длина соломины и главного колоса, число колосков в главном колосе. В пространстве изученных признаков методом дискриминантного анализа наилучше различались исходные формы и дигаплоиды линии с генотипом *Rht8c Rht-B1b*. Вариация МТЗ не имела отношения к последствиям андрогенеза, а зависела от особенностей линии или условий года.

### Литература

1. Ігнатова С.О., Жосонар М.В., Шестопап О.Л. та інші. Отримання подвоєних гаплоїдів м'якої пшениці в культурі пиляків. Методичні рекомендації / Півден. біотенолог. центр в рослин-ві УААН. – Одеса, 2008. – 12 с.
2. Лобанова К.І., Жосонар М.В., Ігнатова С.О. Шляхи реалізації регенераційного потенціалу в культурі пиляків у різних генотипів озимої м'якої пшениці // Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів. – 2006. – Т. 4, № 1. – С. 52–57.
3. Чеботарь Г.А., Чеботарь С.В., Мощный И.И. и др. Молекулярно-генетический анализ линий-аналогов мягкой пшеницы, различающихся по высоте растений // Вестник ОГУ. – 2009. – Т. 14, вып. 8. – С. 61–71.

4. Нефедов А.В. Прогресс селекции озимой пшеницы на Юге Украины // Научн.-техн. бюл. СГИ (Одесса). – 1991. – № 1 (78). – С. 13–15.
5. Лыфенко С.Ф. Полукарликовые сорта озимой пшеницы. – Киев: Урожай, 1987. – 192 с.
6. Замбриборщ И.С., Доброва А.А., Лобанова Е.И., Мощный И.И., Бойко М.С., Чеботарь Г.А. Отзывчивость линий гексаплоидной пшеницы с *Rht* генами к андрогенезу и влияние условий получения удвоенных гаплоидов на полевые характеристики регенерантов // Интродукция, сохранение и использование биологического разнообразия мировой флоры: междунар. конф., посв. 80-летию Центрального ботанического сада Национальной академии наук Беларуси, 19–22 июня 2012 г.: материалы. – Минск, 2012. – Ч. 2. – С. 303–307.

**MOTSNY I.I.<sup>1</sup>, KULBIDA M.P.<sup>2</sup>, ZAMBRIBORSCH I.S.<sup>1</sup>, LOBANOVA E.I.<sup>1</sup>, CHEBOTAR G.A.<sup>1</sup>, CHEBOTAR S.V.<sup>1</sup>, BOYKO M.S.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> *Plant Breeding and Genetic Institute NAASU*

*Ukraine, 65036, Odessa, Ovidiopolskaya dor. str., 3, e-mail: motsnyii@gmail.com*

<sup>2</sup> *V.P. Filatov Institute of Eye Diseases and Tissue Therapy AMSU*

*Ukraine, 65061, Odessa, French boulevard, 49/51*

#### **THE IMPACT OF ANDROGENESIS *IN VITRO* FACTORS ON WHEAT DOUBLE HAPLOID'S TRAITS**

**Aims.** The influence of androgenesis *in vitro* factors on quantitative characters has been studied on winter bread wheat double haploids-lines differing in dwarfing genes. **Methods.** The parameters of agronomic traits of double haploids of three dwarf analogues of wheat varieties and of cultivar Odesskaya 51 have been investigated comparing to the original forms with the dwarfing gene alleles identified by PCR. **Results.** The significant differences between the parental forms and the double haploids towards height of plants, length of main spike and yield components have been established. **Conclusions.** The methods for developing of the androgenic double haploids was found to controversial change the expression of winter wheat characters depending on the specificity of lines, *Rht*-genotype, environment, and the number of generations *ex vitro*. For genotypes *Rht8c Rht-B1e* and *Rht8c Rht-B1b*, especially significant decline of the character parameters in doubled haploid lines with regard to length of stem and the main spike, number of spikelets in the ear were shown in both years, but most significantly – in the first generation. The lines with genotype *Rht8c Rht-B1b* were best discriminated in the space of studied traits. WTK variation had no relation to the androgenic effects and depended on the line peculiarities or the year conditions. The possibility of a misrepresentation of results of the selection of the breeding-valuable genotypes on account of the prolonged modification is discussed.

**Key words:** *Triticum aestivum*, androgenesis *in vitro*, double haploids, quantitative characters.