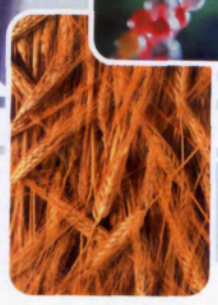
Том 5

Институт генетики и цитологии
Национальной академии наук Беларуси

МОЛЕКУЛЯРНАЯ И ПРИКЛАДНАЯ ГЕНЕТИКА

Научные труды



Минск, 2007

Национальная академия наук Беларуси

Институт генетики и цитологии
Национальной академии наук Беларуси

МОЛЕКУЛЯРНАЯ И ПРИКЛАДНАЯ ГЕНЕТИКА

Научные труды

Том 5, 2007

Минск
2007

Национальная академия наук Беларуси

УДК 577.21 (082)+631.52
ББК 28.04 я43
М75

Редакционная коллегия:

Главный редактор: **А.В. Кильчевский.**
Заместители главного редактора: **И.Д. Волотовский, Н.А. Картель.**
Ответственный секретарь: **В.А. Лемеш.**
Члены редколлегии: **А.С. Владыко, О.Г. Давыденко, А.Н. Евтушенков, А.Г. Лобанок, В.Н. Решетников, С.А. Усанов, Л.В. Хотылева.**

Молекулярная и прикладная генетика **:** науч. тр. Т. 5 /
М75 ред.кол.: А.В. Кильчевский [и др.]. – Минск, 2007. – 105 с.

В сборник включены статьи, написанные по тематике.

УДК 577.21 (082) +631.52
ББК 28.04 я43

Тексты публикуются в авторской версии без редакционных изменений
Articles are publishing in author's version without editorial changes

©Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, 2007

Национальная академия наук Беларуси

Оглавление / Contents

Кильчевский А.В.
Использование хромосомной инженерии
в селекции растений 5

Гордей И.А.
Полиплоидия в селекции хлебных злаков —
достижения и новые генетические подходы 8

Ермишин А.П.
Отбор на диплоидном уровне и манипуляции
с плоидностью в селекции картофеля .....
..... 21

Орлов П.А., Антоненко Е.В.
Генетические механизмы пыльцевого эмбриогенеза
и его использование в селекции растений .....
..... 44

Свирщевская А.М.
Полиплоидия и гаплоидия в селекции сахарной свеклы
(*Beta Vulgaris* L.) .....
..... 72

Шаптуренко М.Н., Яцевич А.П., Дыленок Л.А.,
Анисимова Н.В., Куделко Л.И., Хотылева Л.В.
Анеуплоидия в селекции пшеницы (*Triticum aestivum L.*) .....
..... 92

Правила для авторов .....
..... 103

Национальная академия наук Беларуси

УДК 575.234.2:633.1

Использование хромосомной инженерии в селекции растений

А.В. Кильчевский, член-корреспондент

ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»
Беларусь, 220072, Минск, ул.Академическая, 27,
E-mail: A.Kilchevsky@igc.bas-net.by

Хромосомная инженерия предполагает различные манипуляции с набором хромосом, повышающие эффективность селекции растений. К их числу относятся полиплоидия, гаплоидия использование моносомиков и др.

О значимости и высоких приспособительных возможностях полиплоидов свидетельствует их широкое распространение в растительном мире. По выражению академика П.М. Жуковского, человечество питается в основном продуктами растительной полиплоидии, поскольку около 50% всех цитологически изученных видов покрытосеменных оказались полиплоидами. Факт наличия у многих растений полиплоидных рядов свидетельствует о том, что полиплоидизация является одним из направлений эволюционного процесса. Для каждой культуры характерен свой оптимальный уровень плоидности: пшеница (гексаплоидный), картофель и хлопчатник (тетраплоидный), земляника (октоплоидный), что определяется естественным и искусственным отбором.

В Беларуси работы по экспериментальной полиплоидии были начаты в 60-е годы прошлого столетия и связаны с именем академика А.Р. Жебрака. Значительный вклад в развитие этого направления внесли генетико-селекционные исследования, выполненные под руководством академиков Н.В. Турбина и Л.В. Хотылевой, члена-корреспондента В.Е. Бормотова и других.

Возможности полиплоидии как метода адаптивной селекции могут быть значительно повышены в сочетании с методами отдаленной гибридизации, а также гетерозиса. Наиболее ярким примером может служить получение триплоидных гетерозисных гибридов сахарной свеклы, арбуза, создание новой культуры тритикале.

Серьезным недостатком при получении искусственных полиплоидов является пониженная их фертильность, связанная с нарушениями в мейозе и образованием анеуплоидов, поэтому «сырые» полиплоиды подвергаются длительному отбору. Повысить эффективность получения хозяйственно ценных полиплоидов у них можно путем правильного выбора исходного материала, прошедшего предварительный отбор, перевода на

Национальная академия наук Беларуси

полиплоидный уровень разнообразных генотипов, преимущественного использования растений, продуктивной частью которых являются вегетативные органы (корнеплоды, листья и др.).

Наиболее удачным использованием достижений в области практической полиплоидии следует считать тритикале, занимающее в Беларуси площадь 360 тыс. га. Среди 43 районированных в Беларуси гибридов F_1сахарной свеклы 26 относятся к триплоидным.

Важным методом хромосомной инженерии, повышающим эффективность селекции растений, является гаплоидия (получение особей с одинарным набором хромосом). В природе гаплоиды могут возникать спонтанно с частотой один гаплоид на 10^5 - 10^6 растений. Гаплоидные растения отличаются меньшей высотой стебля, позднеспелостью и, как правило, стерильны. Для восстановления исходного набора хромосом гаплоиды обрабатывают колхицином, что позволяет получить фертильные растения, полностью гомозиготные по всем аллельным генам. Возможно и спонтанное восстановление уровня плоидности.

Применение гаплоидов в селекции растений позволяет решить следующие задачи:

1. Быстрое получение константного нерасщепляющегося материала после гибридизации (в F_2) гомозиготного по всем аллельным генам. В этом случае длительность селекционного процесса у самоопылителей сокращается на 3-4 года. Весьма перспективен такой подход для гетерозисной селекции, где создание инцухт-линий растянуто во времени на 5-6 лет.
2. Эффективный отбор генотипов, так как у гаплоидов отсутствует явление доминирования, и все гены фенотипически проявляются. Идет элиминация организмов, несущих летальные и полулетальные гены. Эффективен отбор аддитивных и эпистатических эффектов.
3. Получение моносомных линий и их использование для генетического анализа и хромосомной инженерии.

При получении гаплоидов широко используются методы in vitro. При этом возможны три подхода.

1. Андрогенез – развитие гаплоидных растений на искусственной питательной среде из изолированных пыльников или микроспор. Он применяется более чем для 250 видов растений, в том числе для таких хозяйственно ценных культур, как пшеница, рис, кукуруза, ячмень, лен, люцерна, виноград, яблоня и др.
2. Гиногенез – развитие гаплоидных растений на искусственной питательной среде из изолированных семяпочек. Он получил меньшее распространение в сравнении с андрогенезом, однако применяется для

Национальная академия наук Беларуси

получения гаплоидов у сахарной свеклы, подсолнечника, картофеля, риса, пшеницы, кукурузы, ячменя, хлопчатника и др.

3. Партеногенез – развитие гаплоидов из гибридного зародыша, у которого из-за несовместимости хромосом родителей потеряны отцовские хромосомы (метод гаплопродюсеров). Наиболее успешно этот метод применяется у ячменя, где в качестве гаплопродюсера используют вид *Hordeum bulbosum*. Для получения гаплоидов у пшеницы и овса в качестве гаплопродюсера используют кукурузу.

Регенеранты, полученные одним из описанных выше методов, различаются по генотипу (гаметоклональная изменчивость). Эта изменчивость может быть усилена при использовании для получения гаплоидов не константного материала, а гибридов F_1. Образующиеся гаметы у гибридов F_1 в результате рекомбиногенеза будут нести различные комбинации генов родителей. Перевод полученных гаплоидов на диплоидный уровень позволит быстро использовать широкий спектр изменчивости у константных гаплоидов. Получение дигаплоидов от гаплоидов возможно спонтанно или путем применения колхицина.

Гаплоиды, полученные in vitro, находят все большее применение в селекционной практике. Так, китайские селекционеры за короткий срок создали с применением культуры пыльников новые высокоурожайные сорта риса и пшеницы. Они занимают уже большие площади: рис – 170000 га, пшеница – 70 000 га. В США получены двойные межлинейные гибриды кукурузы, гаплоидию можно применять в селекции на гетерозис картофеля, люцерны, сорго, сахарной свеклы, рапса, подсолнечника, капусты, пшеницы, тритикале и других культур. В СНГ на основе гаплопродюсеров созданы два сорта ячменя - Исток и Одесский 115 (ВСГИ, Одесса), ведутся интенсивные работы по получению гаплоидов у пшеницы (Саратовский ГЦ), кукурузы (Саратовский ГЦ, Институт генетики АН Молдовы).

В Беларуси исследования по гаплоидам проводятся в ИГЦ (тритикале, секалотритикум, пшеница, лен, картофель, сахарная свекла), ИЗС (рапс, ячмень).

Обобщение опыта, накопленного зарубежными и белорусскими исследователями в области хромосомной инженерии (полиплоидия, гаплоидия, использование моносомиков) позволит повысить эффективность селекционного процесса и сократить сроки создания сортов растений.

Национальная академия наук Беларуси

УДК 575.234.2:633.1

Полиплоидия в селекции хлебных злаков: достижения и новые генетические подходы

Гордей И.А.
ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»
Беларусь, 220072, Минск, ул. Академическая, 27
E-mail: I.Gordej@igc.bas-net.by

«Только исключительные люди, подобно Николаю Вавилову, смогли увидеть, что хромосомы подвержены эволюции (как организмы) со своими собственными законами и что их эволюцию можно использовать»

Дарлингтон С. Д.

Введение

Полиплоидия является важнейшим фактором эволюции культурных злаков. Об этом свидетельствуют полиплоидные ряды у пшеницы, овса, ячменя и других родов. Виды с наибольшим числом хромосом имеют наиболее широкий ареал распространения и использования в сельскохозяйственном производстве: например, гексаплоидные (2n = 42) и тетраплоидные (2n = 28) виды пшеницы, гексаплоидные виды овса. По образному выражению П. М. Жуковского, «человечество питается в основном продуктами растительной полиплоидии» [1].

В последние годы наблюдается повышенный интерес селекционных центров и компаний к перестройкам в геноме в связи с расширением генетической изменчивости. Реконструкция геномов позволяет:

- проводить ресинтез видов и новых видовых форм;
- осуществлять межгеномные замещения и добавления хромосом;
- индуцировать хромосомные перестройки (транслокации, делеции, инверсии);
- переносить блоки генов, скоординированно работающие на признак;
- создавать рекомбинантные геномы;
- вызывать структурно-функциональные изменения ДНК;
- индуцировать гаметоцидный эффект чужеродных хромосом;
- активировать мобильные генетические элементы;
- изменять вклад отдельных хромосом в формирование хозяйственно-полезных признаков и свойств.

Прогрессивная роль полиплоидии в селекции хлебных злаков убедительно доказана созданием и

Национальная академия наук Беларуси

внедрением в производство тритикале и тетраплоидной ржи.

Тритикале (×Triticale Thch.)

Создание тритикале (×Triticale = Triticum L. × Secale L.) - новой зерновой культуры – одно из крупнейших достижений генетики и селекции растений на основе отдаленной гибридизации и экспериментальной аллоплоидиии. Идея совмещения у тритикале продуктивности и качества пшеницы с адаптивным потенциалом ржи стимулировало генетиков и селекционеров к созданию ржано-пшеничных амфидиплоидов. Во многих странах мира все шире разворачиваются селекционно-генетические исследования по тритикале. За последние 40 лет интенсивной селекции создан обширный генофонд исходного материала и ряд новых высокоурожайных сортов озимых и яровых тритикале. Посевные площади под этой культурой в мире в настоящее время превысили 5 млн. га и достигли 400 тыс. га в Беларуси (табл. 1).

Таблица 1. Посевные площади тритикале в мире

Страна или регион	**Посевная площадь, тыс. га**						
	1986	**1992**	**1995**	**1998**	**2000**	**2003**	**2005**
Польша	100,0	659,4	616,4	736,0	695,0	944,0	1000,0
Германия	30,0	207,0	288,6	438,0	499,5	560,5	650,0
Франция	300,0	175,7	183,5	165,0	233,0	280,0	300,0
Венгрия	5,0	5,0	64,0	64,0	91,0	91,0	100,0
Чехия	—	25,0	16,2	16,2	37,2	37,2	40,0
Дания	—	—	—	—	—	36,1	40,0
Испания	30,0	80,0	80,0	34,0	34,0	34,0	35,0
Австрия	1,0	2,0	19,3	19,3	27,5	27,5	30,0
Страны Прибалтики	—	—	25,2	24,5	38,4	44,9	50,0
Беларусь	—	—	38,0	65,0	250,0	360,0	450,0
Россия	250,0	500,0	450,0	450,0	400,0	400,0	400,0
Другие страны Европы	59,4	294,0	122,4	140,2	129,4	155,9	168,1
США	60,0	180,0	180,0	350,0	406,0	409,5	409,5
Мексика	8,0	3,0	3,0	6,0	144,0	144,0	150,0
Южная Америка	20,0	116,0	60,0	114,0	114,0	124,0	145,0
Канада	6,5	2,0	25,9	34,0	63,8	39,6	89,4
Китай	25,0	500,0	690,0	41,0	700,0	700,0	1000,0
Южная Азия	0,5	10,5	10,5	10,5	10,5	10,5	10,5
Австралия	160,0	121,8	223,1	247,0	266,0	288,0	302,0
Африка	20,4	119,4	86,4	76,4	76,4	86,4	99,4
∑ ≈	**1 100**	**3 000**	**3 200**	**3 000-3 600**	**4 200**	**4 500-4 900**	**4 650-5 500**

Национальная академия наук Беларуси

Однако, перед современной селекцией тритикале стоит ряд проблем:

ограниченность нового генофонда исходного материала, отсутствие естественного центра формо- и видообразования и необходимость постоянного синтеза тритикале в процессе селекции;

экологическая адаптивность: зимостойкость озимых тритикале; устойчивость к корневым гнилям, снежной плесени, септориозу, спорынье;

устойчивость к прорастанию зерна в колосе;

содержание белка в зерне, содержание и качество клейковины, хлебопекарные свойства.

Специфичность селекции тритикале связана также с особенностями структурной и функциональной организации генома:

разные механизмы видообразования у исходных родов - аллоплоидия у пшеницы, транслокации хромосом у ржи;

гибрид между родами с разной системой воспроизведения - автогамия у пшеницы и аллогамия у ржи;

эволюционная дивергентность родительских геномов пшеницы и ржи: уровень видоспецифичной ДНК (16 % и 22 %), размер гаплоидного генома (17,2 и 8,3 пг), соотношение разных фракций ДНК в геноме (УП : ПП) и порядок их расположения;

нерегулярность коньюгации хромосом пшеницы и ржи и низкий уровень межгеномных рекомбинаций;

различные механизмы генетического контроля мейоза пшеницы и ржи (Ph/5B у пшеницы и Sy-гены у ржи с менее строгой регуляцией коньюгации);

у тритикале не формируются стабильные межгеномные гетерозиготы;

различия в количестве и распределении гетерохроматина в хромосомах (теломерный гетерохроматин у ржи, интеркалярный - у пшеницы);

различия в генетическом контроле количественных признаков исходных видов - у пшеницы преобладают аддитивные эффекты, у ржи - неаддитивные (доминирование, сверхдоминирование, комплементарное взаимодействие неаллельных генов);

неполная экспрессия генома ржи в цитоплазме пшеницы (синтез тритикале с цитоплазмой ржи);

генотипическая специфичность взаимодействия геномов пшеницы и ржи (от летального, до комплементарного взаимодействия);

фенотип и урожайные характеристики тритикале определяются специфической комбинационной способностью (СКС) геномов пшеницы и ржи и формированием гомеологичного (межгеномного) гетерозиса;

не завершен прцесс формирования коадаптивных генов и блоков коадаптивных генов.

Успех создания тритикале в значительной степени зависит

Национальная академия наук Беларуси

от наличия достаточно эффективных методов преодоления несовместимости пшеницы с рожью и стерильности пшенично-ржаных амфидиплоидов F_1. В результате изучения межродовой генетической совместимости ржи с пшеницей и тритикале нами разработаны новые методы синтеза тритикале.

Метод прямого (одноэтапного) синтеза мейотических тритикале основан на индуцировании колхицином (0.25%) нередуцированных яйцеклеток у пшеницы и гибридизации ее с тетраплоидной рожью (А.С. № 1103378) [2]:

$$AABBDD \xrightarrow{\text{колхицин}} AABBDD \times RR \rightarrow AABBDDRR,\ 2n = 8x = 56$$
$$AABB \xrightarrow{\text{колхицин}} AABB \times RR \rightarrow AABBRR,\ 2n = 6x = 42$$

Предложенный метод обеспечивает создание мейотических высокофертильных окто - и гексаплоидных тритикале на генетической основе скрещиваний гекса - и тетраплоидных пшениц с тетраплоидной рожью, чего нельзя было достичь известными методами.

Метод рекомбинативного синтеза тритикале основан на использовании генетических систем совместимости пшеницы с рожью и нередукции гамет у амфигаплоидов F_1 (kr и fah-гены). Метод предусматривает создание рекомбинантов пшеницы, сочетающих рецессивные kr -гены высокой скрещиваемости с рожью (>30%) и fah-гены нередукции гамет и фертильности пшенично-ржаных амфидиплоидов F_1 (14.0-22.5%) с последующим использованием их для создания тритикале (А.С. № 1417223) [3]: ABD (kr- гены) x ABD (fah-система) $\rightarrow$ рекомбинант ABD (kr + fah) x R $\rightarrow$ F_1 ABDR $\rightarrow$ AABBRR, 2n = 6x = 42, AABBDDRR, 2n = 8x = 56.

Метод прямого синтеза трехвидовых тритикале включающий последовательные скрещивания гексаплоидных пшениц (AABBRR, 2n = 6x = 42) с тетраплоидными $A_1A_1B_1B_1$, 2n = 4x = 28), полученных межвидовых гибридов F_1 (AABBD, 5x = 35) с тетраплоидной рожью (RRRR, 4x = 28) (А.С. № 1824113) [4] : ABD x A_1B_1 $\rightarrow$ F_1 AA_1BB_1D x RR эмбриокультура AA_1BB_1/D $\rightarrow$ AA_1BB_1RR, 2n = 6x = 42). Особое значение в селекции тритикале приобретает необходимость разработки эффективных методов оценки на соответствие новых сортов критериям ООС (отличительность, однородность, стабильность) в связи с их патентоспособностью.

Селекционно-генетический анализ созданного генофонда тритикале показал, что у них не достаточно реализован генетический потенциал адаптивности ржи.

Национальная академия наук Беларуси

Таблица 2. Методы селекции тритикале на выполненность зерна и скороспелость по белковым маркерам

Методы	**Маркерный признак**	**Селектируемый признак**	**Генетический контроль**
Способ отбора форм тритикале на выполненность зерна А.с. №1454324 А1 (Василевская Г.А., Безлюдный Н.Н., Гордей И.А., Росенкова В.Е.) [5]	Низкая активность (ширина) ЭФ компонента *Rf20* α-ами-лазы и наличие дополнительных компонентов β-амилаз при добавлении трипсина	Увеличение массы 1000 зерен и выполненности эндосперма	Гены амилаза-ингибиторного комплекса α-*Amy* (7A,7B,7D,7R) β-*Amy* (2A,2B,2D,2R)
Способ отбора скороспелых форм озимых ожи и тритикале А.с. №1658927 А1 (Василевская Г.А., Мельникук К.Г., Гордей И.А., Гордей Г.М.) [6]	Наличие ЭФ компонентов водорастворимых белков зерна с *Rf* (ОЭП) = 0,15-0,17	Сокращение вегетационного периода на 10-12 суток	Система локусов *Vrn* (2B,5A,5B,5D,5R) *Pdd* (2A,2B,2D,2R)

Тритикале, как правило, уступают озимой ржи по морозо- и зимостойкости, а также по устойчивости к грибным болезням, что обусловлено неполной экспрессией генома ржи вследствии взаимодействия его с количественно преобладающими геномами и цитоплазмой пшеницы (из 5 геномов, входящих в состав гексаплоидных тритикале 4 принадлежат пшенице –А и В, геномы хлоропластов и митохондрий).

Поэтому необходим новый подход в селекции тритикале с целью усиления экспрессии генома ржи и устранения указанных недостатков. Нами проведены исследования по созданию нового типа ржано-пшеничных амфидиплоидов с цитоплазмой ржи - секалотритикум.

Создание секалотритикум направлено на решение следующих проблем:

усиления экспрессии генома ржи и повышения адаптивного потенциала тритикале;

расширения генофонда и увеличения генотипической изменчивости пшенично-ржаных гибридов;

повышения зимостойкости, устойчивости к болезням и экологической адаптивности;

расширения ареала распространения тритикале.

Результаты изучения генетической совместимости ржи с пшеницей и тритикале послужили основой для разработки нового метода

Национальная академия наук Беларуси

создания тритикале с цитоплазмой ржи - секалотритикум (А.С. № 1734602) [7].

Прямые скрещивания ржи с пшеницей (RR x AABBDD, RRRR x AABBDD) оказались безрезультатными вследствие сильной реакции односторонней несовместимости. Молекулярно-биохимические исследования показали, что самонесовместимые (СН) виды содержат S-специфические РНКазы, которые деградируют РНК пыльцы самосовместимых (СС) видов, что вызывает ингибирование и остановку роста пыльцевых трубок. Самосовместимые виды не содержат в пестикач S-специфических РНКаз, поэтому рост пыльцевых трубок СН видов в тканях пестика СС видов не ингибируется, не останавливается и при отсутствии других барьеров перекрестной несовместимости пыльцевые трубки как СС, так и СН видов могут беспрепятственно достигать завязи и оплодотворять яйцеклетку. Самосовместимые мутанты, выделенные из популяции СН видов, содержат РНКазы и ведут себя в скрещиваниях при использовании их в качестве материнских форм как СН виды [8].

Для преодоления односторонней несовместимости ржи с пшеницей нами использован вид-посредник (“bridge species”). Наиболее близким видом-посредником для гибридизации ржи с пшеницей являются тритикале, содержащие в своем полигеноме геномы пшеницы (AB) и ржи (R), что позволило существенно снизить прогамную несовместимость тетраплоидной ржи (RRRR, 4x=28) с гексаплоидными тритикале (AABBRR, 6x=42). Данный эффект связан, скорее всего, с наличием в пыльце тритикале ингибиторов S-РНКазы ржи, детерминируемых сайтспецифическими доменами. Один домен S - специфичзн и обеспечивает сохранение активности соответствующих S-РНКаз ржи. Второй домен – видоспецифичен и способен связывать и ингибировать пестичные РНКазы того вида, что и пыльца, т.е. РНКазы ржи.

Для скрещивания RRRR x AABBRR характерна прогамная несовместимость, а для RR x AABBRR – про- и постгамная, поэтому тетраплоидная рожь оказалась более совместима с гексаплоидным тритикале.

Метод создания секалотритикум включает гибридизацию тетраплоидной ржи (RRRR, 4x=28) с гексаплоидными тритикале (AABBRR, 6x=42), идентификацию ржано-тритикальных гибридов F1 методом электрофореза глиадинов и по наличию компонентов глиадина в α-зоне электрофореграмм, маркирующих геном секалотритикум, отбирают гибриды, так как у ржи – α-секалины (глиадины) отсутствуют. Идентификацию ржано-тритикальных гибридов F_1 можно проводить также цитологически – подсчетом числа хромосом. Идентифицированные амфидиплоиды F_1 (RRABR, 5x =35) беккроссируют на тритикале (рис. 1).

Национальная академия наук Беларуси

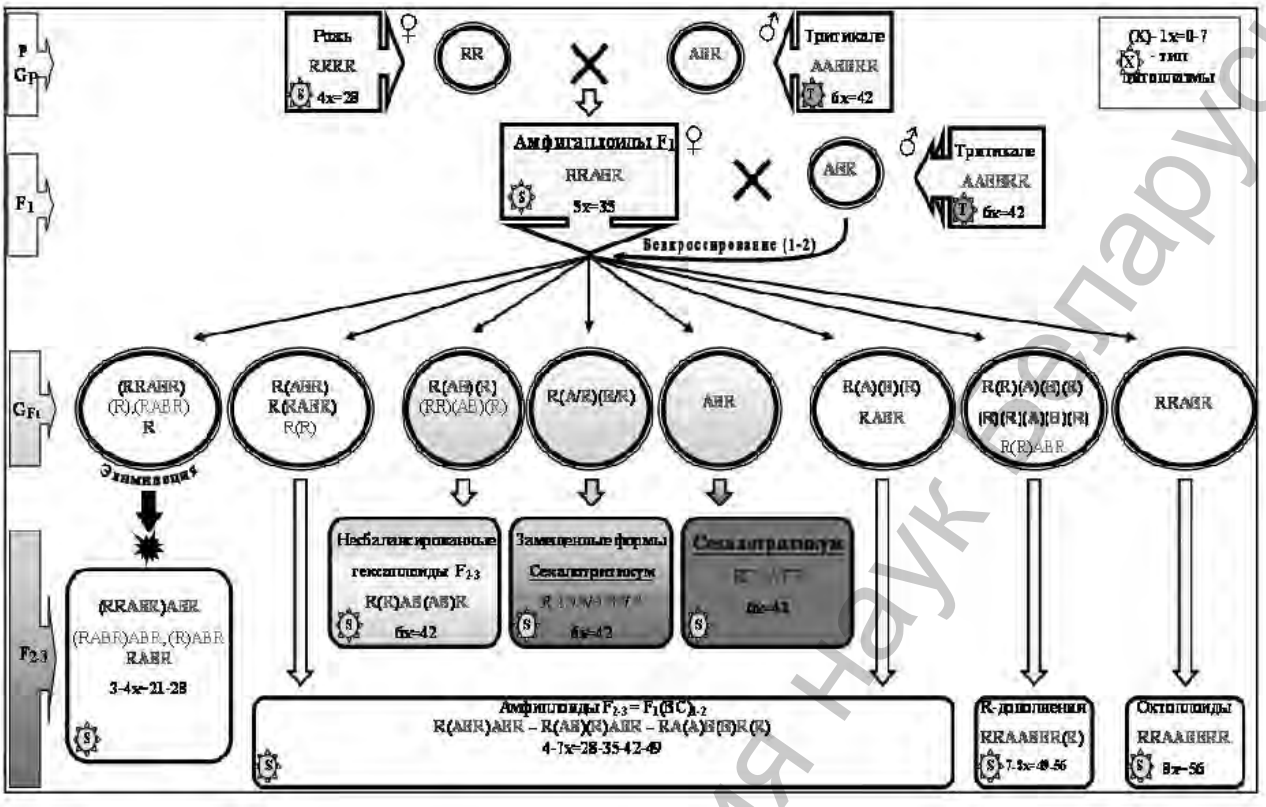


Рисунок 1 - Схема создания ржано-пшеничных амфидиплоидов – секалотритикум

Цитологический анализ показал, что ключевым этапом процесса формироания генома секалотритикум является геномный состав ржано-тритикальных пентаплоидов F_1 (RRABR, 5x =35),специфичность их мейоза и хромосомный состав жизнеспособных гамет [9].

Установлено, что тройная доза генома ржи (Edu - генв на хромосомах 5R, 6R и 7R) у пентаплоидов F_1 (RRABR) - обуславливает промоторный эффект на гомеологичную конъюгацию хромосом и эквационное деление унивалентов в А1. При этом число закрытых и открытых бивалентов достигает 14 вместо теоретически ожидаемых 7. Наличие наряду с редукционным эквационного деления унивалентов у ржано-тритикальных пентаплоидов F_1 (RRABR) разделение унивалентов на хроматиды в А1, приводит к формированию микроядер (1-17 на тетраду), которые не вовлекаются в дальнейший цикл деления и элиминируют.

Специфичность мейоза у ржано-тритикальных пентаплоидов F_1 (RRABR) обуславливает формирование жизнеспособных женских гамет с различным числом хромосом (14-21) и широкий диапазон распределения растений по числу хромосом у гибридов F_1 (BC_1) с варьированием в пределах 35-49 [10]. Регулярное деление хромосом базового диплоидного RR-генома ржи обеспечивает относительно высокую функциональность (жизнеспособность и фертильность) формирующихся гамет гибридов. Фертильность пыльцы и колоса ржано-тритикальных гибридов F_1

Национальная академия наук Беларуси

составляла в среднем 10,5% и 5,7% соответственно. Гексаплодные растения $F_1(BC)_1$ выщеплялись с частотой не менее 11-17%. Из них 15 – 20 % были гексаплоидными высокофертильными геномно сбалансированными формами F_1 секалотритикум, полученными с участием частично нередуцированных ABR-яйцеклеток с полным гаплоидным набором хромосом пшеницы и ржи.

Специфичность мейоза у ржано-тритикальных пентаплоидов F_1 (RRABR) и особенности спорогенеза являются основой для использования их в синтезе новых форм секалотритикум, хромосомной реконструкции и создания хромосно-замещенных форм, а также для получения рекомбинантных форм секалотритикум и тетраплоидной ржи.

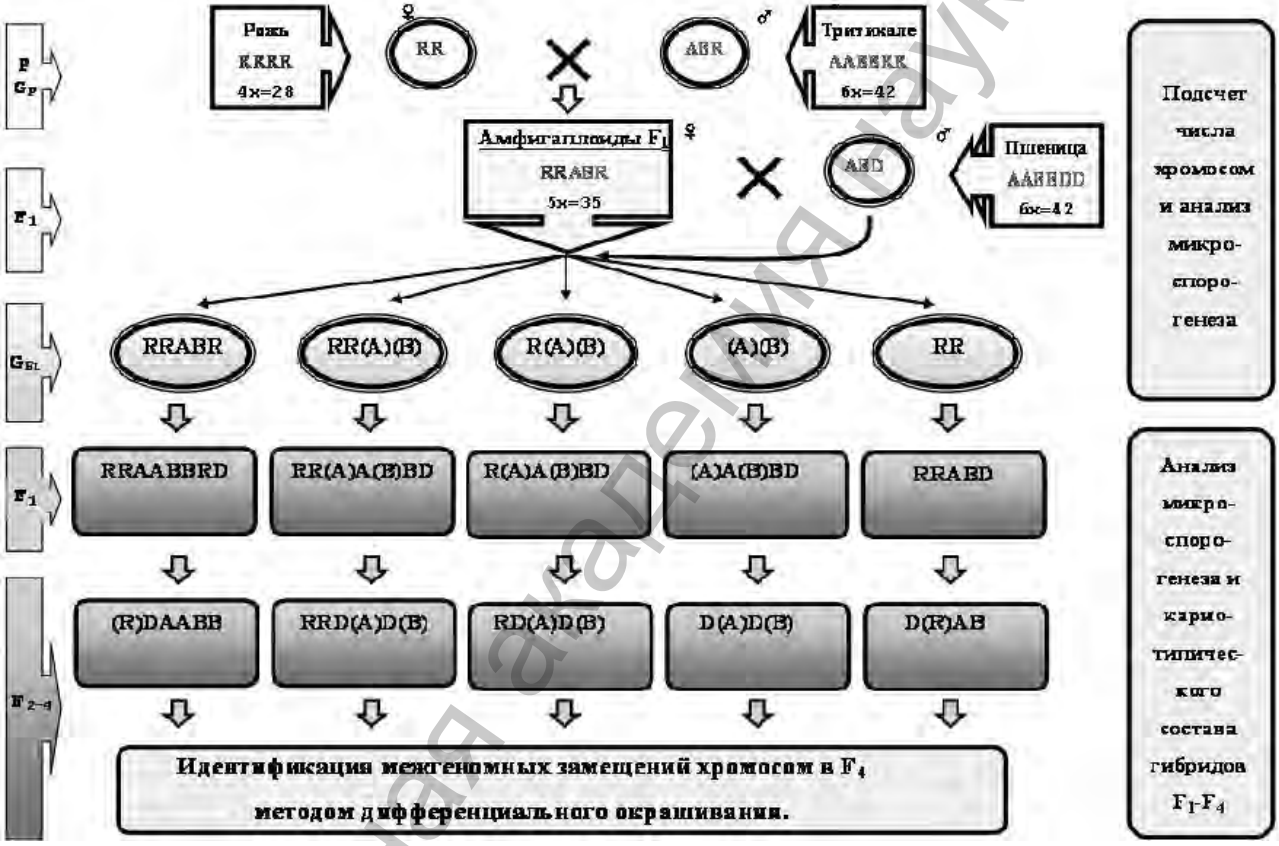


Рисунок 2 - Способ создания ржано-пшеничных хромосомно-замещенных форм секалотритикум

Явление элиминации отдельных хромосом у ржано-тритикальных гибридов F_1 открывает широкие возможности для реконструкции генома секалотритикум путем замещения элимированных хромосом A, B и R геномов на гомеологичные хромосомы D-генома пшеницы, ответственные за хлебопекарные свойства. На основе этого явления разработан метод создания ржано-пшеничных хромосомно-замещенных форм секалотритикум (рис. 2).

По данной схеме A/B/D/R-ржано-пшеничные гексаплоидные хромосомно-замещенные формы секалотритикум (RRAABB,

Национальная академия наук Беларуси

2n=6x=42) создаются на основе гибридизации тетраплоидной ржи (RRRR, 2n=4x==28) с гексаплоидными тритикале (AABBRR, 2n=6x=42) с последующим скрещиванием ржано-тритикальных гибридов F_1 (RRABR, 5x=35) в качестве материнской формы с мягкой пшеницей (AABBDD, 2n=6x=42). Идентификация хромосомно-замещенных форм осуществляется с применением методов дифференциального окрашивания хромосом.

Результаты селекционно-генетического анализа показывают, что создание новых форм тритикале не приводит к быстрому успеху. Первичные тиритикале и секалотритикум нуждаются в рекомбинационной селекции для получения вторичных. Наиболее результативными в селекции секалотритикум и тритикале могут быть рекомбинации на гексаплоидном уровне путем различных типов скрещиваний первичных секалотритикум и тритикале между собой (рис. 3).

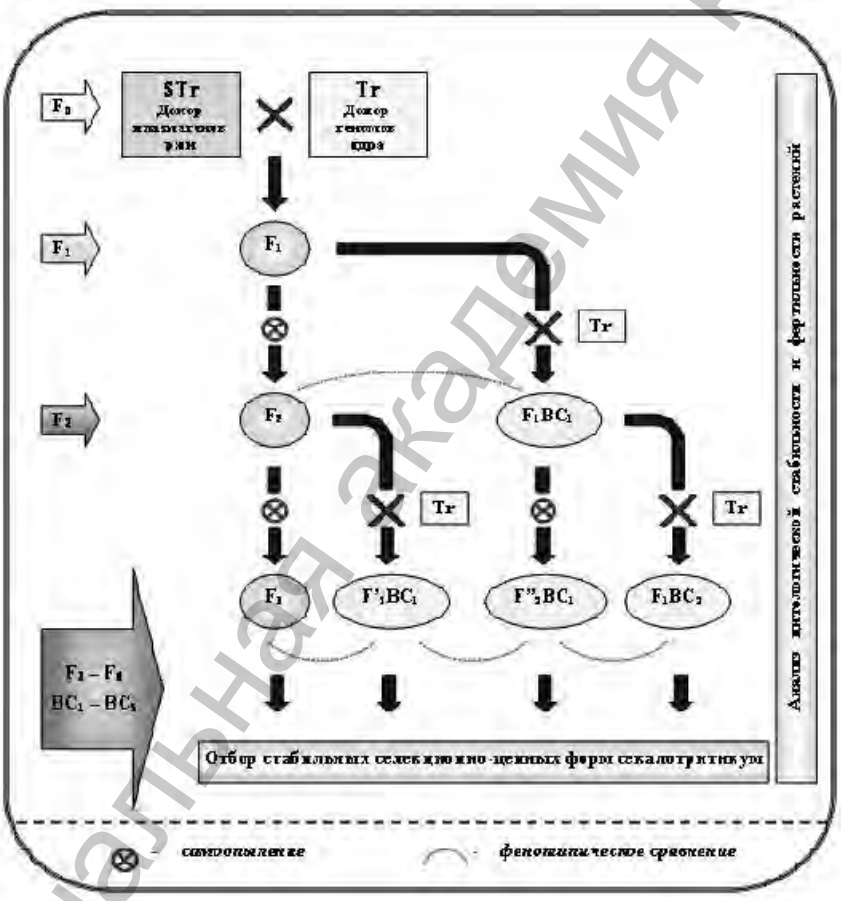
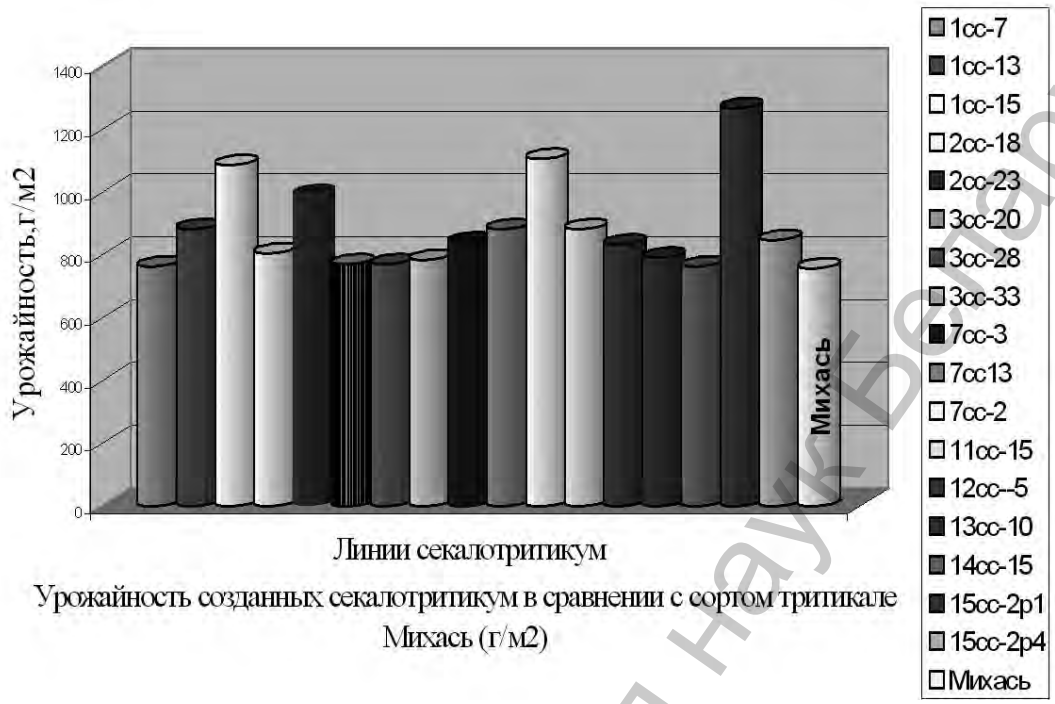


Рисунок 3 - Схема рекомбинационного синтеза вторичных секалотритикум

Селекционно-генетический анализ созданных форм секалотритикум показал, что по основным признакам продуктивности растений отдельные линии секалотритикум превосходят сорт-стандарт тритикале Михась (рис. 4.).

Национальная академия наук Беларуси



Урожайность созданных секалотритикум в сравнении с сортом тритикале Михась (г/м2)

Рисунок 4 - Продуктивность новых форм секалотритикум

Тетраплоидная рожь (S. cereale L. ssp. tetraploidum)

Второй важнейшей хлебной культурой Беларуси, в селекции которой полиплоидия сыграла прогрессивную роль, является рожь (Secale cereale L.). Впервые в мировой практике именно в Беларуси был создан тетраплоидный сорт озимой ржи Белта. В последующем с использованием полиплоидизации методом колхицинирования создан ряд высокопродуктивных сортов, которые получили широкое распространение в производстве. В существующей структуре посевных площадей ржи в Беларуси тетраплоидная рожь занимает 420,7 тыс. га, что составляет 78% [11]. В связи с тем, что исследования по созданию новых форм тетраплоидной ржи в последние 10 лет не проводились, в селекции этой культуры возник ряд проблем:

- узость генофонда исходного материала, исследования по созданию новых тетраплоидных форм ржи не проводится;
- в природе ареалы тетраплоидной ржи отсутствуют, необходимо создавать тетраплоиды в процессе селекции;
- сравнительно низкая эффективность традиционного метода получения колхицинированием тетраплоидных форм ржи (выход полиплоидов составляет 0,5 - 4,0%);
- отсутствие надежных генетических методов создания рекомбинантных форм тетраплоидной ржи;

Национальная академия наук Беларуси

- необходимость идентификации и отбора тетраплоидных форм;
- устойчивость к полеганию легче решается на тетраплоидном уровне;
- содержание бзлка на 0,54 - 1,16% выше у тетраплоидных сортов, что является важнейшим показателем кормового достоинства.

Извествестный метод полиплоидизации с использованием колхицина является низкоэффективным (0,3 – 4 %) и дорогостоящим. Поэтому возникла настоятельная необходимость разработки и использования более эффективных методов получения новых форм тетраплоидной ржи.

Нами проводятся исследования по разработке принципиально нового метода создания рекомбинантных форм тетраплоидной ржи на основе межсортовых замещений хромосом с использованием ржано-тритикальных гибридов. Метод позволит получать тетраплоиды ржи с включением генетического материала пшеницы и тритикале.

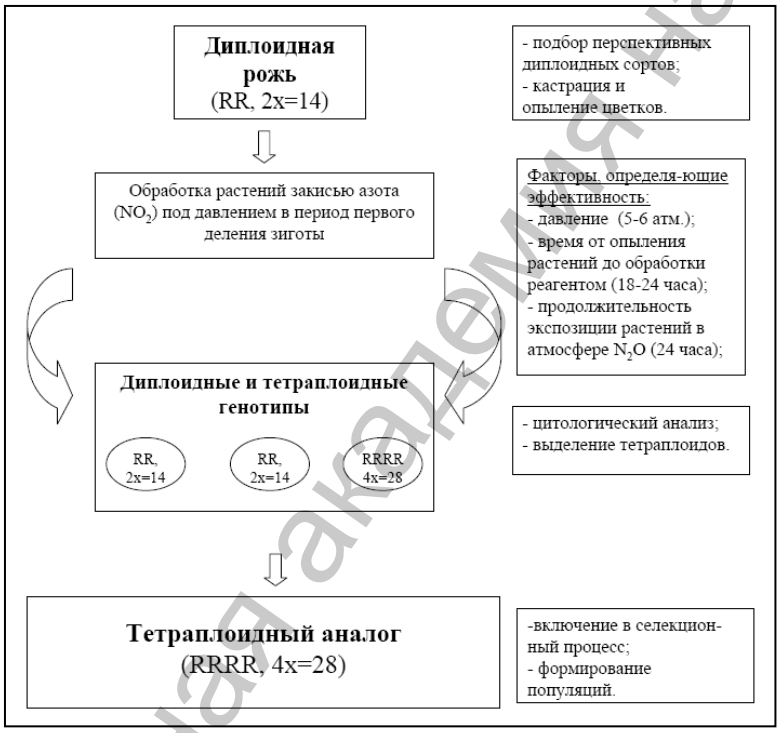


Рисунок 5. Схема создания тетраплоидов ржи методом закиси азота (N_2O)

Таким образом, новые генетические подходы и разработанные методы синтеза тритикале с пшеничной и ржаной цитоплазмой позволили экспериментально обосновать методологию расширения и обогащения генофонда этой культуры, создать качественно новый исходный и селекционный материал, что будет способствовать разработке новых генетических стратегий экспериментальной эволюции и дальнейшему повышению эффективности селекционного процесса по созданию высокопродуктивных и экологически адаптивных сортов.

Дальнейший прогресс в использовании полиплоидии в

Национальная академия наук Беларуси

селекции хлебных злаков будет связан:

- с расширением и обогащением генофонда исходного селекционного материала на основе вовлечения нового видового потенциала хлебных злаков;
- с разработками новых более эффективных методов создания полиплоидов различного геномного состава и ядерно-цитоплазматической структуры;
- с использованием приемов целенаправленной интрогрессивной и рекомбинационной селекцик на основе реконструкции геномов;
- с усовершенствованием и оптимизацией селекционного процесса с учетом структурной и функциональной организации геномов полиплоидов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Жуковский П.М. Эволюция культурных растений на основе полиплоидии / В кн. «Полиплоидия и селекция». Москва-Ленинград, 1963. – с. 5 – 17.
2. Гордей И.А., Гордей Г.М. Способ получения тритикале. А.с. № 1103378. 1984.
3. Гордей И.А., Гордей Г.М. Способ получения тритикале. А.С. № 1417223. 1988.
4. Гордей С.И., Хотылева Л.В., Гордей И.А. Способ получения трехвидовых тритикале. А.С. № 1824113, 1992.
5. Василевская Г.А., Безлюдный Н.Н., Гордей И.А., Гордей Г.М., Росенкова В.Е. Способ отбора форм тритикале на выполненность зерна А.с. № 1454324. 1988.
6. Василевская Г.А., Мельникук К.Г., Гордей И.А., Горжей Г.М. Рогова Н. Д. Способ отбора скороспелых форм озимых ржи и тритикале А.с. № 1658927. 1991.
7. Гордей И.А., Гордей .М.. Новикова Л.В. Создание ржано-пшеничных амфидиплоидов (секалотритикум) // Генетика. 1996. Т.32. № 6, С. 783-787.
8. Ермишин А.П. // Весці НАН Беларусі. Сер. біял. навук. 2001. № 3. С. 105–118.
9. Гордей И.А. Новые генетическое подходы и методы селекции тритикале (учебное пособие) / Мн.: 2000. НАНБ, 25 с.
10. Люсиков О.М., Белько Н. Б., Щетько И. С., Гордей И.А. Создание ржано-пшеничных амфидиплоидов с цитоплазмой ржи – секалотритикум (RRAABB, 2n=42): особенности мейоза у ржано-тритикальных гибридов F_1 (RRABR, 5x=35) // Генетика. 2005. Т. 41. № 7. С. 902 - 909.
11. Урбан Э.П. Селекция озимой ржи (S. cereale L.) в Беларуси (научные основы и результаты) / Автореф. докт. диссертации. – Жодино, 2006.

Национальная академия наук Беларуси

УДК 575.234.2:633.1

Полиплоидия в селекции хлебных злаков: достижения и новые генетические подходы

Гордей И.А.
ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»
Беларусь, 220072, Минск, ул. Академическая, 27
E-mail: I.Gordej@igc.bas-net.by

РЕЗЮМЕ

В статье изложены новые генетические подходы и методы селекции хлебных злаков (пшеница, рожь, тритикале, секалотритикум) на основе алло- и автополиплоидии. Показаны пути реконструкции аллополиплоидных геномов хлебных злаков, особенности их структурной и функциональной организации. Представлены методы создания нового типа ржано-пшеничных амфидиплоидов с цитоплазмой ржи – секалотритикум, их хромосомно-замещенных линий, а также схема получения тетраплоидов ржи методом обработки растений закисью азота (N_2O). Указаны пути дальнейшего использования полиплоидии в селекции хлебных злаков.

Polyploidy in breeding of cereals: achievements and new genetic approaches

I. A. Gordei

Institute of Genetics and Cytology at National Academy of Sciences of Belarus
Akademicheskaya st.27, 220072 Minsk, Belarus
E-mail: I.Gordej@igc.bas-net.bv

SUMMARY

The article concerns new genetic approaches and breeding methods for cereals (wheat, rye, triticale, secalotriticum) based on allo-and-autopolyploidy, with ways of reconstructing allopolyploid genomes of cereals, in particular features of their structural and functional organization being shown. The methods for developing a new type of rye-wheat amphidiploids with rye cytoplasm - secalotriticum, their chromosome-substitution lines, as well as the scheme for producing rye tetraploids by treating plants with nitrogen monoxide (N_2O) are presented. The ways of furvher polyploidy application in cereals breeding are shown.

Национальная академия наук Беларуси

УДК 631.527.52: 635.21

ОТБОР НА ДИПЛОИДНОМ УРОВНЕ И МАНИПУЛЯЦИИ С ПЛОИДНОСТЬЮ В СЕЛЕКЦИИ КАРТОФЕЛЯ

А.П. Ермишин
Институт генетики и цитологии НАН Беларуси

Введение

Культурный картофель – вегетативно размножаемая культура. В связи с этим его селекция относительно простая: любой генотип, имеющий уникальную комбинацию генов, можно сохранить, размножить и длительное время использовать в хозяйственных и иных целях. С другой стороны, селекция картофеля весьма сложная, поскольку картофель *S.tuberosum* является автотетраплоидом. Новые сорта получают путем гибридизации тетраплоидных гетерозигот, поэтому воспроизвести их половым путем практически невозможно. Для картофеля характерен т.н. тетрасомный тип расщепления, который определяется наличием четырех гомологичных хромосом, случайной их конъюгацией в мейозе и случайным распределением по гаметам. В зависимости от количества доминантных аллелей в определенном локусе хромосомы возможны следующие типы зигот: квадруплекс (АААА), триплекс (АААа), дуплекс (ААаа), симплекс (Аааа) и нуллиплекс (аааа) [1]. В зависимости от количества разных аллелей в локусе соответствующие зиготы носят названия: $a_ia_ja_ka_l$ - тетрааллель, $a_ia_ia_ja_k$ - триаллель, $a_ia_ia_ja_j$ - сбалансированная диаллель, $a_ia_ia_ia_j$ - несбалансированная диаллель, $a_ia_ia_ia_i$ - моноаллель [2].

По сравнению с диплоидами, у которых имеется только два варианта моногибридных скрещиваний, дающих расщепление по фенотипу (Аа × Аа и Аа × аа), у картофеля возможны пять вариантов: АААа × АААа (расщепление 35:1), АААа × Аааа (11:1), АААа × аааа (5:1), Аааа × Аааа (3:1), Аааа × аааа (1:1). Триплексы в скрещиваниях с другими гетерозиготами, нуллиплексом и при самоопылении расщепляются только по генотипу. Дуплексы при самоопылении и анализирующем скрещивании дают расщепление по фенотипу 35:1 и 5:1 соответственно. Расщепление по фенотипу в скрещиваниях симплексов не отличаются от диплоидов (3:1 и 1:1).

Количество возможных комбинаций генов определяется числом классов генотипов, возникающих в потомстве моногибридов. Так, у симплексов их 4 (1ААаа:2Аааа:1аааа), у дуплекса - 36 (1АААА:8АААа:18ААаа:8Аааа:1аааа). При полигибридном скрещивании число возможных комбинаций генов составляет соответственно 4^n и 36^n, где n - число генов. Отсюда общая

Национальная академия наук Беларуси

формула фенотипического расщепления имеет вид: для симплекса $(3A:1a)^n$, для дуплекса - $(35A:1a)^n$. Например, уже в случае дигибридного расщепления частота появления в потомстве от самоопыления дуплекса рецессивной гомозиготы составит лишь 1/1296 ($(35A:1a)^2$ = 1225AB:35A:35B:1ab).

Характер расщепления, обусловленного рекомбинацией хромосом, является лишь одной из форм наследования у тетраплоидов. Теоретически ожидаемые отношения, приведенные выше, характерны для генов, расположенных близко к центромере, и могут нарушаться, например, в случае т.н. хроматидного расщепления. Хроматидное расщепление характерно для генов, локус которых достаточно удален от центромеры, чтобы имел место регулярный кроссинговер. При хроматидном расщеплении обычно возникает избыток рецессивных форм, например, 0.86A:1a в анализирующих скрещиваниях симплексов, 2.48A:1a - при самоопылении вместо ожидаемых 1:1 и 3:1, соответственно. У дуплексов при анализирующем скрещивании вместо ожидаемого 5:1, наблюдается 3.67:1 [3].

В основе хроматидного расщепления одно из явлений, связанных с тетрасомным наследованием - двойная редукция. Суть его в том, что две хромосомы в гамете могут происходить от двух сестринских хроматид. В результате формируется квадривалент и происходит единичный перекрест между центромерой и определенным локусом. Сестринские хроматиды прикрепляются к двум разным центромерам. Эти центромеры с сестринскими хроматидами отходят в анафазе I к одному и тому же полюсу (вероятность равна 1/3). Эти же сестринские хроматиды отходят к одному полюсу и в анафазе II (обычно, с вероятностью равной 1/2).

Частота двойной редукции определяется коэффициентом a = qea/2, где q - частота квадривалентов; e - частота эквационного деления, которая зависит от расстояния ген-центромера; a - частота нестыковки (в норме равна 1/3). При a, близкой к нулю, ген расположен близко к центромере и наблюдается хромосомное расщепление (близкое к ожидаемому). При a=1/7, имеет место хроматидное расщепление [4].

Современная селекция растений предполагает широкое использование генофонда диких и полукультурных сородичей для расширения аллельного разнообразия культурных форм, интрогрессии в селекционный материал ценных генов устойчивости к болезням, вредителям, неблагоприятным факторам среды. Описано около 220 диких видов картофеля. Большинство из них являются диплоидами (22 вида - 2x 1EBN и 178 видов - 2x 2EBN). Имеется также ряд ценных полиплоидных видов (11 видов - 4x 2EBN и 8 видов - 6x 4EBN). За небольшим исключением, эти виды

Национальная академия наук Беларуси

практически не скрещиваются с культурным картофелем. Успех гибридизации при интерплоидных и межвидовых скрещиваниях у картофеля во многом зависит от так называемого показателя баланса эндосперма (EBN, эффективная плоидность) родительских форм. Эта величина характеризует способность вида формировать нормально функционирующий эндосперм в таких скрещиваниях. EBN не всегда совпадает с уровнем плоидности вида [5-8 и др.]. Как правило, для получения жизнеспособных семян при межвидовой гибридизации родители должны иметь одинаковые значения EBN. В связи с этим культурный картофель (4x, EBN4) относительно легко скрещивается лишь с некоторыми гексаплоидными видами (6x, EBN4), например, с *S.demissum*. Для гибридизации с другими дикими видами необходимо использовать специальные приемы. Наиболее перспективным из них является снижение уровня плоидности культурного картофеля до 2 (получение дигаплоидов картофеля). Дигаплоиды *S.tuberosum* (2n=2x=24, EBN 2) имеют балансовое число эндосперма, такое же, как у большинства диких видов картофеля. Благодаря этому они относительно легко скрещиваются с ними, формируя жизнеспособные семена и фертильное потомство.

Описанные генетические особенности культурного картофеля в значительной степени затрудняют селекцию этой важной сельскохозяйственной культуры. Для повышения ее эффективности предлагается использовать схему селекции, которая предполагает снижение уровня плоидности селекционного материала до диплоидного, проведение отбора на диплоидном уровне с последующим возвратом на тетраплоидный уровень. В общем виде эта схема имеет следующий вид:

- Получение дигаплоидов сортов картофеля;
- Гибридизация дигаплоидов с дикими диплоидными видами;
- Диплоидная селекция: комбинация и концентрация желаемых генов и элиминация нежелательных;
- Мейотическое удвоение хромосом у отобранных генотипов (гибридизация сортов картофеля с дигаплоидами, формирующими нередуцированные гаметы) [9,10].

1. Получение дигаплоидов картофеля

Термином "гаплоид" принято обозначать спорофит с гаметическим числом хромосом. Однако в генетике картофеля гаплоиды, полученные из тетраплоидов (2n=4x=48) обозначают как дигаплоиды (2n=2x=24), а гаплоиды от диплоидов (2n=2x=24) называют моноплоидами, моногаплоидами (2n=x=12). Т.е. термин "дигаплоид" не соответствует значению

Национальная академия наук Беларуси

"удвоенный гаплоид", который широко используется в генетике диплоидных видов растений [4].

Впервые дигаплоид картофеля выделила Е.В.Ивановская [11] в потомстве от опыления тетраплоидного сорта Аврора пыльцой *S.rybinii* (2n=2x=24). Согласно современной классификации [12] *S.rybinii* не является самостоятельным видом, а относится к *S.phureja*. Использование *S.phureja* в качестве гаплопродюсера у *S.tuberosum* оказалось в конечном счете наиболее эффективным, хотя в литературе описаны случаи применения для этой цели и других диплоидных видов картофеля [13].

Цитологический механизм, с помощью которого возникают дигаплоидные зародыши, т.н. псевдогамия, партеногенез, детально исследован многими авторами [14-16 и др.]. При опылении пыльцой *S.phureja* оба ядра (n=x=12) пыльцевого зерна сливаются с центральным ядром зародышевого мешка *S.tuberosum* (2n=4x=48), приводя к формированию гексаплоидного эндосперма. Ядро яйцеклетки (n=2x=24) остается неоплодотворенным, но стимулируется к дифференцировке. Зародышевый мешок с гексаплоидным эндоспермом и диплоидным зародышем является жизнеспособной структурой и развивается в нормальное семя. Как видим, поведение *S.phureja* (2x, EBN 2) выпадает из описанного выше правила, согласно которому успешными бывают скрещивания между родительскими формами с одинаковой эффективной плоидностью. Это является характерной особенностью *S.phureja*, благодаря чему удаются его скрещивания с видами, имеющими EBN, не равное 2, например, с *S.tuberosum* (4x, EBN 4), *S.etuberosum* (2x, EBN 1) и др.

Работы шотландских ученых [17-19] свидетельствуют, что индуцированные с помощью *S.phureja* дигаплоиды не всегда являются по происхождению чисто партеногенетическими.

Обнаружение у полученных дигаплоидов генетического материала *S.phureja* говорит о том, что ядро опылителя достигает яйцеклетки, однако в дальнейшем его большая часть элиминируется.

После того как R.W.Hougas, S.J.Peloquin [20,21] продемонстрировали возможность массового получения дигаплоидов картофеля с помощью *S.phureja*, идея перевода части селекционной работы с картофелем на диплоидный уровень стала реальной. В начале 60-х годов во многих странах были начаты исследования по генетике и теории селекции диплоидного картофеля [22]. За это время выделен ряд исключительно эффективных суперопылителей *S.phureja* [23-25]. Этапное значение имело, в частности, создание клонов, сочетающих высокую гаплопродуцирующую способность с гомозиготным состоянием генов «эмбрионального пятна», которые контролируют распределение антоциановой окраски к основанию многих органов растения, в том числе семядолей зародыша [24].

Национальная академия наук Беларуси

Поскольку эти гены практически не встречаются в европейских сортах картофеля, то при скрещивании их с такими суперопылителями возможно появление в потомстве следующих вариантов: 1) партеногенетические дигаплоиды с неокрашенными семядолями; 2) диплоиды *S.phureja* с "эмбриональным пятном", сформировавшиеся в результате андрогенеза; 3) тетраплоиды, возникшие из нередуцированных яйцеклеток (без окраски); 4) тетраплоиды с окраской семядолей - гибриды, полученные с участием нередуцированной пыльцы *S.phureja*; 5) триплоиды (с "эмбриональным пятном"), преодолевшие "триплоидную блокировку". Антоциановая окраска семядолей легко идентифицируется при рассмотрении семян под бинокулярной лупой. Поэтому с введением в практику подобных суперопылителей *S.phureja* появилась возможность с минимальными трудозатратами выделять дигаплоиды картофеля по отсутствию у них "эмбрионального пятна". Попавшие в эту же фракцию немногочисленные тетраплоиды несложно отделить по внешнему виду (они более мощные), а также по дополнительным показателям: числу хлоропластов в замыкающих клетках устьиц [26], путем подсчета числа хромосом. Наиболее широкое распространение в селекции картофеля получили голландские суперопылители *S.phureja* с "эмбриональным пятном" IvP 35, IvP 48, IvP 101. Таким образом, можно утверждать, что картофель является одной из немногих сельскохозяйственных культур, для которой разработан действительно эффективный метод снижения уровня плоидности, основанный на использовании индуцированного партеногенеза.

2. Восстановление тетраплоидного уровня. Мейотическое удвоение хромосом

В результате нарушений в ходе мейоза могут формироваться т.н. нередуцированные, или 2n-гаметы, которые имеют число хромосом спорофита, а не гаметофита. 2n-гаметы, образовавшиеся в ходе микроспорогенеза называют дипландроидами (2n-пыльца), а в ходе мегаспорогенеза - диплогиноидами (2n-яйцеклетки) [27]. Известно по крайней мере шесть способов (нарушений мейоза) получения 2n-гамет: промейотическое удвоение; рестituция типа первого деления (FDR); репликация хромосом во время мейотической интерфазы; рестituция типа второго деления (SDR); постмейотическое удвоение; аспория [10,28,29]. Для селекции картофеля с использованием манипуляций на диплоидном уровне наибольшее значение имеют FDR- и SDR-механизмы формирования 2n-гамет.

FDR (first division restitution) связывают с появлением слившихся (*fs*) [30,31] или параллельных (*ps*) [32] веретен деления в метафазе II. В результате формируются только два полюса с

Национальная академия наук Беларуси

двумя группами хромосом (Рис. 1). Мейоз заканчивается формированием только одной клеточной стенки (эквационного деления). Образуется диада 2n-микроспор. В лаборатории генетики картофеля Института генетики и цитологии НАН Беларуси проведено специальное исследование вопроса о роли кооориентации веретен в FDR [33,34]. Тщательное изучение корреляций между частотой *ps* и частотой диад у форм, продуцирующих и не продуцирующих 2n-пыльцу, применение математического моделирования позволило получить убедительные доказательства того, что "параллельные веретена" не являются нарушением мейоза, а образование диад связано с мутацией *fs*. В то же время полученные результаты не подтвердили предполагаемой в норме любой, чисто случайной [30] или только перпендикулярной [32] кооориентации веретен в мейозе. Проведенный анализ распределения углов взаимного расположения веретен деления свидетельствуют, что мейоциты разделяются на две равноценные группы с параллельной и перпендикулярной кооориентацией. Отклонения носят случайный характер. Поэтому тетраэдр вторичных фрагмопластов может с равной вероятностью образовываться как из параллельных, так и перпендикулярных первичных фрагмопластов.

В основе SDR (second division restitution) лежит эндомитоз интерфазных ядер между первым и вторым делением мейоза и преждевременное образование клеточной пластинки редукционного деления. В этом случае метафаза, анафаза и телофаза второго деления отсутствуют. D.W.C.Mok, S.J.Peloquin [35] этот тип SDR назвали механизмом преждевременного цитокинеза (мутации *pc-1* и *pc-2*). J.E.Werner, S.J.Peloquin [36,37] указывают, что доминирующий механизм образования 2n-яйцеклеток - утрата второго деления мейоза. Он контролируется одним рецессивным геном (*os*). Другой механизм образования 2n-яйцеклеток - утрата цитокинеза после второго деления мейоза, который контролируется одним рецессивным геном (*fc*). Генетическая структура 2n-яйцеклеток формируется с помощью любого механизма SDR.

Мейотическая полиплоидизация может быть как односторонней (в интерплоидных скрещиваниях 4x - 2x и 2x - 4x), так и двусторонней (2x - 2x). Имеется целый ряд публикаций, в которых обсуждается роль 2n-гамет в полиплоидизации и генетические последствия использования различных способов их формирования [10,28,38-45 и др.].

Основное различие между FDR и SDR заключается в том, что при FDR две хроматиды каждой хромосомы попадают в разные 2n-споры, что ведет к сохранению родительской гетерозиготности в

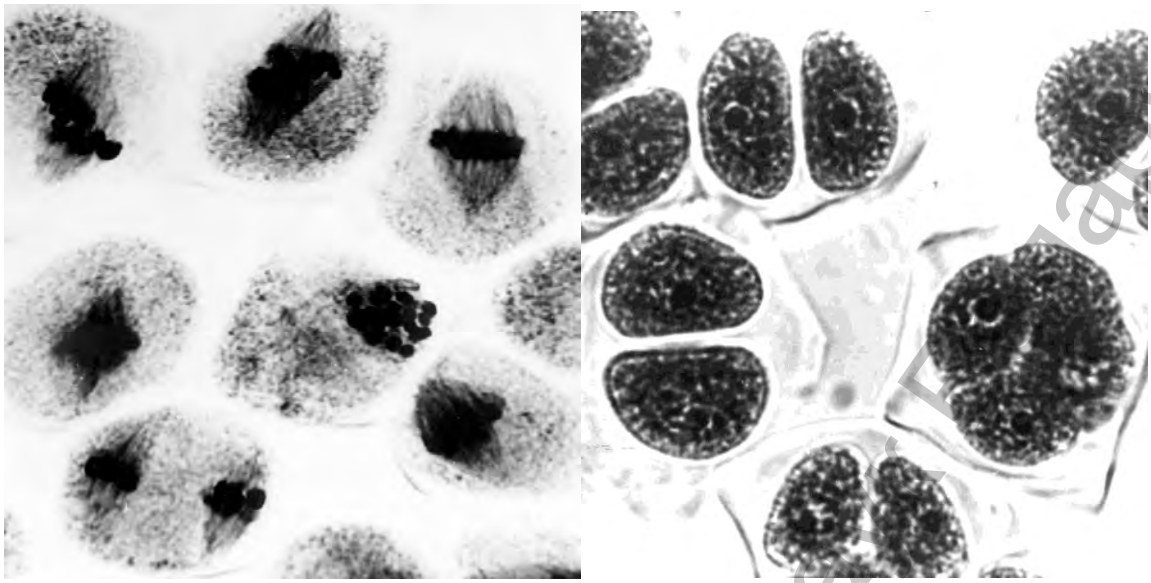
Национальная академия наук Беларуси

сформировавшихся гаметах. При SDR хроматиды каждой хромосомы попадают в одну из 2n-спор, что приводит к увеличению гомозиготности. J.G.Th.Hermsen [28] рассчитал, что средний процент родительской гетерозиготности, представленной в FDR- и SDR-гаметах для четырех типов хромосом с известными сайтами центромер и кроссоверов, составляет, соответственно 80.2% и 39.6%. G.C.C.Tai [42] сравнил средние и варианса потомства шести типов скрещиваний (FDR × FDR; FDR × SDR; SDR × SDR; 4x × FDR; 4x × SDR; 4x × 4x), предположив, что в скрещивания взяты диаллельные родительские генотипы Aa и AAaa при различных типах гипотетических моделей (аддитивная, доминирование и сверхдоминирование). Средние и варианса FDR-потомства, как полагает автор, были больше и меньше, соответственно, чем у SDR-потомства в случае, когда локус располагался ближе к центромере. Ситуация менялась на противоположную при расположении локуса в области, близкой к концу длинного плеча хромосомы. "Эффект положения" гена у SDR-гамет, как оказалось, более сильный, чем у FDR-гамет. 2n-гаметы оказывают большее влияние на продуктивность потомства в 2x - 2x скрещиваниях, чем в 4x - 2x. Аналогичные результаты получены K.Watanabe et al. [44]. По их мнению, наиболее надежный способ достижения высокой степени гетерозиготности тетраплоидного потомства - это использование в двусторонней полиплоидизации скрещиваний типа FDR × SDR.

Качественный признак наличия, либо отсутствия слияния веретен в мейозе и формирования 2n пыльцы имеет количественный характер проявления (частота слияния веретен в мейозе, частота 2n пыльцы). Частота формирования 2n пыльцы у растений природных популяций картофеля и образцов селекционного материала варьирует в широких пределах – от долей процента до 100% [29]. Весьма существенна вариация формирования 2n пыльцы у сибсов гибридных популяций, причем она имеет непрерывный характер [46-48]. Экспрессивность генов *fs* (частота 2n пыльцы) определяется генотипом исследуемых образцов, средовыми факторами и их взаимодействием [34,47,49] .

Вариация генотипов картофеля по частоте *fs* указывает на вероятное полигенное наследование данного признака или участие в его контроле полигенов. Впервые E. Jacobsen [50], анализируя уровень скрещиваемости диплоидных гибридов в системе 4x × 2x в зависимости от частоты формирования у них 2n пыльцы, пришел к заключению, что изучаемый показатель контролируется совместно главными рецессивными генами и полигенами. В 1980-х годах была предложена модель генетического контроля *fs*, где главные гены (ген) взаимодействуют с полигенами (генетическим фоном, модифицирующим экспрессию главных генов).

Национальная академия наук Беларуси



А Б

Рис 1 Нарушения в мейозе у дигаплоидов картофеля, связанные с формированием нередуцированных гамет FDR типа.
А. Проявление мутации «слившиеся веретена» во втором делении мейоза (внизу слева -клетка с нормальным протеканием мейоза: видны два веретена деления).
Б. Образование диад 2n-микроспор в результате нарушений мейоза, связанных с мутацией «слившиеся веретена» (внизу справа нормальные тетрады n-микроспор).

Применяя методологию анализа количественных признаков R.Ortiz и S.J.Peloquin [51], а также D.Y.Qu [52] рассчитали, что частота формирования 2n пыльцы (вариация экспрессивности *fs*) определяется действием двух-четырех локусов с равными эффектами. J.Mooney, S.J.Peloquin [53] показали возможность повышения частоты 2n пыльцы, а F.Serquen, S.J.Peloquin [54] частоты 2n яйцеклеток с помощью рекуррентного отбора.

3. Преимущества, связанные с использованием отбора на диплоидном уровне в селекции картофеля

В современной селекции картофеля при отборе принимается во внимание около 50 показателей. При этом целый ряд признаков, таких, как устойчивость к X,Y,S и M вирусам, нематодам, раку картофеля и др., контролируется главными генами [3,13]. Поскольку эти гены доминантные, получить нерасщепляющееся потомство по

Национальная академия наук Беларуси

ним на тетраплоидном уровне очень сложно. Так, если мы скрещиваем симплекс по гену устойчивости к нематоде *H1* с неустойчивой формой (нуллиплекс), то в потомстве будет только половина устойчивых форм. В случае использования в таких скрещиваниях дуплекса доля устойчивых форм будет 5/6 (расщепление 5:1). И только в потомстве триплекса расщепления по устойчивости к патогену не будет). В связи с этим, в современной селекции картофеля весьма перспективным считается создание родительских линий с комплексом генов устойчивости к болезням и вредителям, у которых названные гены представлены несколькими доминантными аллелями (мультиплексов) [55,56]. Использование таких линий в селекции позволяет получать потомство, заведомо обладающее определенной устойчивостью к патогенам. Следовательно, необходимость учета таких признаков при испытании селекционного материала не требуется. Учитывая же то, что процедура оценки многих показателей весьма сложная и трудоемкая (например, устойчивость к вирусу скручивания листьев (ВСЛК), некоторые признаки качества клубней, пригодности к промышленной переработке и т.п.), то использование подобного материала должно упростить селекционный процесс.

Однако создание мультиплексных линий на тетраплоидном уровне, учитывая названные выше генетические особенности культурного картофеля, - весьма сложный процесс. На диплоидном же уровне отбор соответствующих гомозигот вполне реален. Более того, при скрещивании дигаплоидов, формирующих нередуцированные гаметы, с тетраплоидными формами картофеля имеется возможность получать нерасщепляющееся по показателям устойчивости к болезням и вредителям потомство даже в случае использования диплоидных гетерозигот.

Поскольку FDR 2n пыльца дигаплоидов более гетерозиготна и более гомогенна, чем n-пыльца тетраплоидных сортов, это позволяет получать более продуктивные, экологически стабильные и гомогенные гибридные популяции. По данным R.Ortiz et al. [57] варианса ошибки в 4x-2x семьях была в три раза меньше, чем в соответствующих 4x-4x семьях. Следовательно, для достижения определенного селекционного результата размер гибридной популяции в первом случае может быть в три раза меньше, чем во втором, что позволяет сэкономить значительные материальные и трудовые ресурсы.

Около 70% описанных диких и культурных видов картофеля являются диплоидами [13]. Межвидовая гибридизация диплоидов в большинстве случаев не является сложной задачей. Поэтому использование широкого генофонда рода *Solanum* наиболее приемлемо именно на диплоидном уровне. С одной стороны, несложно привнести от диких видов ценный генетический материал, скрещивая

Национальная академия наук Беларуси

их с дигаплоидами *S.tuberosum* (или другими селекционно-продвинутыми диплоидными формами) [58]. С другой стороны, можно отобрать гомозиготы, например, с комплексной устойчивостью к вирусам, одновременно избавившись от неблагоприятных генов, полученных от диких предков, принимая во внимание более высокую частоту выщепления гомозигот и намного более простой характер расщепления у дигаплоидов по сравнению с тетраплоидами.

Согласно гипотезе гетероаллелизма [59, 60], у перекрестно-опыляющихся полиплоидных видов гибридная сила максимизирована наличием более двух аллелей на хромосомный локус. Чем выше уровень гетерозиготности генотипа, т.е. чем больше мультиаллельных (для картофеля три- и тетрааллельных) локусов, тем выше его продуктивность. У мультиаллельных локусов значительно большее, чем у диаллельных, количество межаллельных взаимодействий [38].

Использование отбора на диплоидном уровне у картофеля позволяет получать исключительно гетерозиготное 4х-потомство. Это достигается следующим образом. Во-первых, путем вовлечения в гибридизацию диплоидных видов *Solanum*, что позволяет расширить аллельное разнообразие материала. Во-вторых, возможно получение высокогетрозиготного потомства при гибридизации неродственных гомозиготных линий. Использование мейотической полиплоидизации позволяет сохранить достигнутый уровень гетерозиготности при переходе с диплоидного на тетраплоидный уровень. Как указывалось выше, средний процент родительской гетерозиготности, представленной в FDR 2n гаметах составляет около 80%, а в сочетании с мутацией десинапсиса (FDR NCO - FDR без кроссинговера) - приближается к 100% [61].

Таким образом, диплоидная селекция картофеля по сравнению с традиционной имеет следующие преимущества:

1. Благодаря более простому дисомному наследованию требуется меньший объем популяции для выделения сложных рекомбинантов, отвечающих запросам селекции. Аккумуляция желаемых и элиминация нежелательных генов происходит на диплоидном уровне быстрее, чем на тетраплоидном.
2. Возможность широкого использования генетического разнообразия диких диплоидных видов, интрогрессии селекционно-ценных генов диких видов в селекционный материал, расширения аллельного разнообразия *S.tuberosum*, достижения более высокого уровня гетерозиготности селекционного материала.
3. Благодаря мейотическому удвоению хромосом возможность получать более выровненные, продуктивные, экологически стабильные тетраплоидные гибридные популяции, не расщепляющиеся по комплексу признаков, отселектированных на диплоидном уровне, что позволяет существенно

Национальная академия наук Беларуси

повысить вероятность отбора в них селекционно-ценных генотипов.

За прошедшие со времени формулирования основ диплоидной селекции картофеля годы разработаны эффективные методы получения дигаплоидов картофеля [23,24], а также восстановления тетраплоидного уровня путем мейотического удвоения хромосом [27-31]. Изучены цитологические и генетические механизмы, лежащие в основе перехода с одного уровня плоидности на другой и обратно [29-36,45]. Выдвинута теория гетероаллелизма, объясняющая более высокую продуктивность тетраплоидов наличием у них мультиаллельных локусов [37, 59, 60]. Предложены и испытаны схемы селекции картофеля с использованием генетических манипуляций с материалом на диплоидном и тетраплоидном уровне [9, 10, 62].

В ходе развития рассматриваемого направления селекции картофеля подтверждены на практике его широкие возможности. Получены гибриды, превосходящие по продуктивности сорта картофеля, выведенные традиционными методами. Продемонстрирована возможность отбирать их в небольших по объему популяциях [2, 32, 63, 64]. Установлено, что такие формы имеют повышенную экологическую стабильность, устойчивость к стрессам [63,65].

Успешно осуществлен перенос генов, контролирующих селекционно-ценные признаки, от диких видов культурным сортам, показана возможность быстрого получения форм с комбинацией нужных признаков [66-75]. Обоснованы перспективы использования дипландроидов и диплогиноидов для целей семеноводства при выращивании картофеля из ботанических семян (TPS) [10, 61, 76].

Однако, несмотря на блестящие результаты, достигнутые за столь короткий срок, следует признать, что ни одна из существующих схем селекции не позволяет в полной мере реализовать преимущества отбора на диплоидном уровне. Это обусловлено наличием ряда проблем, связанных с биологией диплоидного картофеля, многие из которых до конца не решены.

4. Проблемы диплоидной селекции картофеля

В настоящее время только реализация первого этапа диплоидной селекции – получение дигаплоидов сортов картофеля - не имеет существенных проблем. Реализация других этапов связана с определенными трудностями [см.77-80].

Хотя большинство диплоидных видов картофеля относительно легко скрещивается с дигаплоидами *S.tuberosum,* имеется достаточно много перспективных для селекции диких видов, чей генофонд практически не используется. Это связано с наличием жестких репродуктивных межвидовых барьеров (как презиготных, так и постзиготных), затрудняющих интродукцию генов отдельных видов в геном культурного картофеля. Речь, в частности идет о таких ценных видах, как диплоидные 1EBN виды картофеля

Национальная академия наук Беларуси

из Мексики, являющиеся носителями, прежде всего, генов устойчивости к фитофторозу. Большие проблемы существуют с интрогрессией в селекционный материал ценных генов от неклубненосных диплоидных 1EBN видов картофеля, которые являются источниками генов устойчивости к вирусам. Практически неразработанной остается проблема использования в селекции генофонда аллополиплоидных видов картофеля. Изучение генетических механизмов, лежащих в основе межвидовой несовместимости, позволит разработать эффективные методы ее преодоления. Это, в свою очередь, сделает возможным использование генофонда тех видов картофеля, который ранее считался недоступным для селекции.

Одним из факторов, лимитирующих эффективность диплоидной селекции, является цитоплазматическая мужская стерильность (ЦМС) гибридов дигаплоиды *S.tuberosum*×диплоидные виды картофеля. ЦМС у таких гибридов обусловлена взаимодействием доминантных ядерных генов, присутствующих у большинства южноамериканских диплоидных видов, и цитоплазматических генов *S.tuberosum*. Тем не менее, выделены виды, способные давать фертильное потомство при гибридизации с дигаплоидами. Вопрос о наследовании генов, приводящих к ЦМС у межвидовых гибридов этих двух групп видов не изучался. Более углубленного анализа заслуживают и вопросы наследования генов-восстановителей фертильности, обнаруженных у *S.tuberosum.*

Отбор на диплоидном уровне предполагает проведение масштабных генетических манипуляций с полученным исходным материалом. В качестве источника признаков культурного картофеля рекомендуют использовать дигаплоиды *S. tuberosum*. Однако в большинстве случаев они мужски стерильны. Как полагают, причиной мужской стерильности дигаплоидов является переход в гомозиготное состояние рецессивных генов, оказывающих неблагоприятное влияние на процесс формирования пыльцы. Гибридизация первичных дигаплоидов с дикими видами во многих случаях приводит к восстановлению фертильности. Очевидно, доминантные аллели этих видов перекрывают неблагоприятные рецессивные аллели дигаплоидов. Однако в последующих поколениях (в ходе селекции на диплоидном уровне) преобладают формы с пониженной функциональной фертильностью пыльцы. Это существенно затрудняет проведение наиболее важного этапа диплоидной селекции.

При гибридизации дигаплоидов картофеля также возможны неудачи из-за самонесовместимости, которая может быть существенным препятствием в реализации селекционных программ, связанных с использованием самоопыления, близкородственных скрещиваний, беккроссирования. В семействе *Solanaceae* известен гаметофитный тип самонесовместимости, проявляющейся у большинства диплоидных диких и культурных видов рода *Solanum.* Механизмы

Национальная академия наук Беларуси

самонесовместимости пока еще до конца не выяснены. Таким образом, изучение генетики ЦМС, самонесовместимости, показателей фертильности популяций вторичных дигаплоидов картофеля имеет большое значение для повышения эффективности отбора на диплоидном уровне.

Фактор фертильности вторичных дигаплоидов картофеля имеет важное значение и для перевода исходного материала на тетраплоидный уровень с помощью мейотического удвоения хромосом. Благодаря наличию в генетическом пуле картофеля определенных мутаций, приводящих к образованию нередуцированных гамет, его применение может быть достаточно технологичным. Однако для эффективного использования мейотической полиплоидизации необходимо, чтобы в исходном материале, предназначенном для перевода на тетраплоидный уровень, с высокой частотой встречались генотипы, формирующие функционально фертильную пыльцу с определенной долей (15-20%) нередуцированных гамет. Специальные исследования, проведенные в нашей лаборатории (см. [78]), показали что естественный уровень мейотических мутаций и фертильности вторичных дигаплоидов картофеля является для этого недостаточным. Кардинальное решение проблемы видится в создании специального исходного материала для разных этапов диплоидной селекции, обладающего комплексом необходимых признаков [80].

5. Важнейшие результаты лаборатории генетики картофеля Института генетики и цитологии НАН Беларуси в области диплоидной селекции картофеля

В результате многолетних исследований, выполненных в лаборатории генетики картофеля Института генетики и цитологии НАН Беларуси, проведен глубокий анализ проблем диплоидной селекции картофеля, предложены подходы к решению многих из них, разработаны технологии осуществления отдельных этапов диплоидной селекции, создан ценный исходный материал [77, 78, 80]. В частности, отработана методика получения первичных дигаплоидов сортов картофеля, сформирована и оценена коллекция первичных дигаплоидов разного происхождения [81]. В результате изучения генетики мужской фертильности диплоидного картофеля и специальной селекции выведены высоко фертильные дигаплоиды, использование которых позволяет получать фертильные популяции диплоидного картофеля, в том числе путем гибридизации их с первичными дигаплоидами *S. tuberosum* [33, 34, 82-87]. Получены новые данные по генетике цитоплазматической мужской стерильности гибридов между дигаплоидами *S. tuberosum* и некоторыми южноамериканским дикими видами картофеля, предложены подходы к ее преодолению [88-90].

Изучение генетики и цитологических механизмов формирования нередуцированных гамет позволило разработать методы создания гибридных популяций с высоким

Национальная академия наук Беларуси

уровнем мутаций, необходимых для мейотического удвоения хромосом. Отобраны доноры таких мутаций, получены генотипы, сочетающие высокую мужскую фертильность и образование с высокой частотой нередуцированных гамет [33, 34, 91-94].

Предложены и реализованы оригинальные подходы преодоления межвидовых репродуктивных барьеров между *S. tuberosum* и дикими диплоидными видами картофеля из Мексики, аллотетраплоидными видами. Получен диплоидный селекционный материал, в который интрогрессированы ценные гены от этих видов [79, 95-101].

Начаты исследования и получены первые результаты по использованию молекулярных маркеров отдельных признаков. В частности, оптимизирована методика идентификации генотипов картофеля, устойчивых к нематоде с помощью ПЦР маркера CP113 гена H_1, с помощью которой осуществлен анализ большой коллекции сортов и форм картофеля, выделены носители данного гена [Воронкова и др. (в печати)]. Также освоена методика идентификации генотипов-носителей генов устойчивости к Y-вирусу картофеля (R_{ysto}). Использование маркеров позволит существенно повысить эффективность комбинирования признаков на диплоидном уровне. Предполагается создать в ближайшие годы диплоидные родительские линии с высокой продуктивностью и комплексной устойчивостью к болезням и вредителям, образующие с высокой частой фертильные нередуцированные гаметы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сложная генетическая природа культурного картофеля делает оправданным разработку новых методов селекции, основанных на снижении уровня плоидности селекционного материала, использовании отбора на диплоидном уровне с последующим восстановлением тераплоидного уровня с помощью мейотического удвоения хромосом. Преимущества этой селекционной стратегии очевидны: более эффективное использование ценного генофонда диких видов, высокая эффективность комбинативной селекции, возможность получать более выровненные, продуктивные, экологически стабильные тетраплоидные гибридные популяции, не расщепляющиеся по комплексу признаков, отселектированных на диплоидном уровне, что позволяет существенно повысить вероятность отбора в них селекционно-ценных генотипов.

Многочисленные проблемы диплоидной селекции не позволяют в полной мере использовать ее преимущества. Тем не менее, в результате исследований ученых многих стран изучена природа основных лимитирующих факторов диплоидной селекции, предложены подходы по их нивелированию, преодолению. Все это открывает перспективы для широкого внедрения новой стратегии, новых технологий, основанных на применении отбора на диплоидном уровне, в селекцию картофеля.

Национальная академия наук Беларуси

Аннотация

На основе анализа генетических особенностей культурного картофеля обоснована необходимость разработки новых методов селекции, основанных на манипуляциях с плоидностью селекционного материала и применением отбора на диплоидном уровне. Рассмотрены важнейшие преимущества диплоидной селекции картофеля по сравнению с традиционной, основные ее проблемы и подходы к их решению. Представлены важнейшие достижения белорусских ученых в области диплоидной селекции, перспективы использования новой стратегии для совершенствования селекции картофеля.

SUMMARY

Based on analyzing genetic features of cultivated potato, the necessity for developing new methods of breeding based on manipulation with ploidy of breeding material and application of selection at the diploid level, was substantiated. Important advantages of potato diploid breeding as compared with traditional one, its major problems and approaches to their solution were considered. Important achievements of Belarusian scientists in the field of diploid breeding as well as prospects of using a new strategy for potato breeding improvement were represented.

ЛИТЕРАТУРА

1. Яшина И.М., Склярова Н.П. Генетика полиплоидных видов картофеля// Генетика картофеля. М.: Наука, 1973. С. 82-103.
2. Mendiburu A.O., Peloquin S.J., Mok D.W.S. Potato breeding with haploids and 2n gametes// Haploids in higher plants. Guelph: Guelph University Press, 1974. P. 249-258.
3. Росс Х. Селекция картофеля. Проблемы и перспективы (Пер. с англ.). М.: Агропромиздат, 1989. 183 с.
4. Ortiz R., Peloquin S.J. Use of 24 chromosome potatoes (diploids and diplandroids) for genetical analysis// Potato genetics. Wallingford (UK): CABI, 1994. P. 133-154.
5. Den Nijs T.P.M., Peloquin S.J. The role of endosperm in hybridization // Am.Potato J. 1977. Vol.54. P. 488-489.
6. Johnston S.A., Hanneman R.E., Jr. Manipulations of endosperm balance number overcome crossing barriers between diploid Solanum species// Science. 1982. Vol.217. P. 446-448.
7. Ehlenfeldt M.K., Hanneman R.J., Jr. The use of endosperm balance number and 2n gametes to transfer exotic germplasm in potato// Theor. Appl. Genet. 1984. Vol.68. P. 155-161.
8. Hanneman R.J., Jr. The reproductive biology of the potato and its implication for breeding// Potato Res. 1999. Vol. 42/Extra edition. P. 283-312.
9. Chase S.S. Analitic breeding in Solanum tuberozum L.- A

Национальная академия наук Беларуси

scheme utilizing partenotes and other diploid stocks//Can. J. Genet. Cytol. 1963. Vol. 5. P. 359-363.
10. Peloquin S.J., Yerk G.L., Werner J.E., Darmo E. Potato breeding with haploids and 2n gametes // Genome.1989. V.31. P. 1000-1004.
11. Ивановская Е.В. Гаплоидное растение Solanum tuberosum// Доклады АН СССР. - 1939. Т. 24. С. 488-491.
12. Hawkes J.G. Origins of cultivated potatoes and species relationships // Potato genetics. Wallingford (UK): CABI, 1994. P. 109-132.
13. Будин К.З. Генетические основы селекции картофеля. Ленинград: Агропромиздат. Ленингр.отд-ние, 1986. -192 с.
14. Bender K. Uber die Erzeugung und Entstehung dihaploider Pflanzen bei Solanum tuberosum// Z. Planzenzuchtg. 1963. Bd.50. S. 141-166.
15. Montelongo-Escobedo H., Rowe P.R. Haploid induction in potato: Cytological basis for the pollinator effect// Euphytica. 1969. Vol. 18. P. 116-123.
16. Breukelen E.W.M.van, Ramanna M.S., Hermsen J.G.Th. Parthenogenetic monohaploids (2n=x=12) from Solanum tuberosum L. and S.verrucosum Sehl. and the production of homozygous potato diploids// Euphytica. 1977. Vol.26. P. 263-272.
17. Clulow S.A, Wilkinson M.J., Waugh R. et al. Cytological and molecular observations on Solanum phureja-induced dihaploid potatoes/ // Theor. Appl. Genet. 1991. Vol. 82. P. 545-551.
18. Clulow S.A., Wilkinson M.J., De Maine M.J. Dihaploid formation- a new hypothesis//Proc.Joint Conf. EAPR Breeding Var. Ass. Sec.& EUCARPIA Potato Sec.: Proc. int. conf. Plaudaniel: INRA, 1992. P. 165-169.
19. Clulow S.A., Wilkinson M.J., Burch L.R. Solanum phureja genes are expressed in the leaves and tubers of aneusomatic potato dihaploids// Euphytica. 1993. Vol. 69, N1/2. P. 1-6.
20. Hougas R.W., Peloquin S.J. A haploid plant of the potato variety Kathadin// Nature. 1957. Vol. 180. P. 1209-1210.
21. Hougas R.W., Peloquin S.J. The potential of potato haploids in breeding and genetic research// Amer. Potato J. 1958. Vol.35. P. 701-707.
22. Swiezynski K., Sawicka E., Suchtelen van N.J., Wagenvoort M. Potato (Solanum tuberosum L.) improvement by breeding at the diploid level // Ziemniak. 1985. P. 5-23.
23. Peloquin S.J., Hougas R.W. Decapitation and genetic markers as related to haploidy in Solanum tuberosum// Eur. Potato J. 1959. Vol. 2. P. 176-183.
24. Hermsen J.G.Th., Verdenius J. Selection from Solanum tuberosum group Phureja of genotypes combining high frequency haploid induction with homozygosity for embryo- spot//

Национальная академия наук Беларуси

Euphytica. 1973. Vol. 22. P. 244-259.
25. Hutten R.C.B., Scholberg E.J.M.M., Huigen D.J. et al. Analysis of dihaploid induction and production ability and seed parent x pollinator interaction in potato// Euphytica. 1993/ 1994. Vol.72, N 1/2. P. 61-64.
26. Frandsen N.O. Die Plastidenzahl als Merkmal bei der Kartoffel// Theor. Appl. Genet. 1968. Vol. 38. P. 153-167.
27. Mendiburu A.O., Peloquin S.J. Sexual polyploidization and depolyploidization: Some terminology and definitions// Theor. Appl. Genet. 1976. Vol. 48. P. 137-144.
28. Hermsen J.G.Th. Mechanisms and genetic implications of 2n-gamete formation// Iowa State J. Res. 1984. Vol.58, N 4. P. 421-434.
29. Veilleux R.E. Diploid and polyploid gametes in crop plants: mechanisms of formation and utilization in plant breeding// Plant Breeding Review. 1985. Vol. 3. P. 253-288.
30. Ramanna, M.S., 1979. A re-examination of the mechanisms of 2n-gamete formation in potato and its implications for breeding. // Euphytica 28(3):537-561.
31. Veilleux R.E., McHale N.A., Lauer F.I. Unreduced gametes in diploid Solanum: frequency and types of spindle abnormalities// Can. J. Genet. Cytol. 1982. Vol. 24. P. 301-314.
32. Mok D.W.S., Peloquin S.J. The inheritance of three mechanisms of diplandroid (2n pollen) formation in diploid potatoes// Heredity. 1975. Vol. 35, N 3. P. 295-302.
33. Podlisskikh V.E., Ankudo T.M., Anoshenko B.Yu. Formation of metaphase spindle in diploid potato clones with the meiotic abnormality "fused spindles"// 14 Trienial Conference of The European Association for Potato Research. (Sorento, Italy, May 2-7, 1999). Abstracts of conference papers, posters and demonstrations. 1999. P. 684-685.
34. Anoshenko, B.Yu., V.E. Podlisskikh, Analysis of variation of microsporogenesis abnormalities leading to FDR 2n pollen formation in diploid potatoes // 14 Trienial Conference of The European Association for Potato Research. (Sorento, Italy, May 2-7, 1999). Abstracts of conference papers, posters and demonstrations. 1999. P. 688-689.
35. Mok D.W.S., Peloquin S.J. Three mechnisms of 2n pollen formation in diploid potatoes// Can. J. Genet. Cytol. 1975. Vol.17. P. 217-225.
36. Werner J.E., Peloquin S.J. Inheritance and two mechanisms of 2n egg formation in 2x potatoes// J. Heredity. 1990. Vol. 81. P. 371-374.
37. Werner J.E., Peloquin S.J. Significance of allelic diversity and 2n gametes for approaching maximum heterozygosity in 4x potatoes// Euphytica. 1991. Vol. 58, N 1. P. 21-29.
38. Mendiburu A.O., Peloquin S.J., Mok D.W.S. Potato breeding with haploids and 2n gametes//

Национальная академия наук Беларуси

Haploids in higher plants. Guelph: Guelph University Press, 1974. P. 249-258.
39. Mendiburu A.O., Peloquin S.J. The significance of 2n gametes in potato breeding // Theor. Appl. Genet. 1977. Vol.49, N 2 . P. 53-61.
40. Hermsen J.G.Th. The potential of meiotic polyploidization in breeding allogamous crops// Iowa State J. Res. 1984. Vol. 58, N4. P. 435-448.
41. Tai G.C.C. Biometrical genetic analysis of tetrasomic inheritance based on matings of diploid parents which produce 2n gametes// Heredity. 1986. Vol. 57. P. 315-317.
42. Tai G.C.C. Biometrical methods in investigating 2n gametes in tetraploid-diploid and diploid-diploid crosses// Parental line breeding and selection in potato breeding. Wageningen: PUDOC, 1989. P. 15-21.
43. Tai G.C.C. Use of 2n gametes // Potato genetics. Wallingford (UK): CABI, 1994. P. 109-132.
44. Watanabe K., Peloquin S.J., Endo M. Genetic significance of mode of polyploidization: somatic doubling or 2n gametes// Genome.1991. Vol. 34, N 1. P. 28-34.
45. Werner J.E., Peloquin S.J. Occurence and mechanisms of 2n egg formation in 2x potato// Genome. 1991. Vol. 34, N 6. P. 975-982.
46. Ramanna M.S. First division restitution gametes through fertile desynaptic mutants of potato // Euphytica. 1983. Vol. 32. P. 337-350.
47. Bani-Aameur F., Laurer F.I., Veilleux R.E. Frequency of 2n pollen in diploid hybrids between *Solanum phureja* and *Solanum chacoense.* // Potato Res. 1992. Vol.35. P.161-172.
48. Склярова Н.П., Юдина Т.А. Наследование признака формирования нередуцированной пыльцы у картофеля // В кн.: Гаметная и зиготная селекция растений. Кишинев: Штиница, 1987. С.106-108.
49. Filotico F., Carputo D., Barone A. 2n pollen production in *Solanum phureja – S. tuberosum* hybrids. // J. Genet. Breed. 1995. Vol.49. P. 255-260.
50. Jacobsen E. Diplandroid formation and its importance for the seed set in 4x × 2x crosses in potato// Z. Pflanzenzuchtg. 1980. Vol. 84. P. 240-249.
51. Ortiz R., Peloquin S.J. Recurrent selection for 2n gamete production in 2x potatoes. // J.Genet.Breed. 1992. Vol.46. P.383-390.
52. Qu D.Y., Zhy D., Ramanna M.S., Jacobsen E. A comparison of progeny from diallel crosses of diploid potato with regard to the frequencies of 2n-pollen. // in Qu D.Y.'s Ph. D. Thesis. Wageningen Agr. University. Wageningen, 1996. P.22-30.
53. Mooney J., Peloquin S.J. Phenotypic recurrent selection for 2n pollen frequency// Amer. Potato J. 1992. Vol.69, N 9. P. 599.
54. Serquen F., Peloquin S.J. Recurrent selection for 2n eggs and their use in TPS breeding//

Национальная академия наук Беларуси

Amer. Potato J. 1993. Vol.70, N 11. P. 839.
55. Свежиньский К. Создание исходного материала для селекции картофеля в Польше// Картофель: селекция, семеноводство, технология возделывания. Мн.: Ураджай, 1988. С. 135-150.
56. Bradshaw J.E., Mackay G.R. Breeding strategies for clonally propagated potatoes // Potato genetics. Wallingford (UK): CABI, 1994. P. 109-132.
57. Ortiz R., Peloquin S.J., Freyre R., Iwanaga M. Efficiency of potato breeding using FDR 2n gametes for multi-trait selection and progeny testing//Theor. Appl. Genet. 1991. Vol. 82, N 5. P. 602-608.
58. Hermundstad S.A., Peloquin S.J. Germplasm enhancement with potato haploids// J.Heredity. 1985. Vol. 76. P. 463-467.
59. Mendoza H.A., Haynes F.L. Genetic basis of heterosis for yield in autotetraploid potato// Theor. Appl. Genet. 1974. Vol.45, N 1. P. 21-25.
60. Bingham E.T. Maximizing heterozygosity in autopolyploids// Polyploidy: Biological Relevance. New York: Plenum Press, 1980. P. 471-489.
61. Hermsen J.G.Th., Ramanna M.S., Jongedijk E. Apomictic approach to introduce uniformity and vigour into progenies from true potato seeds (TPS)// Present and future strategies for potato breeding and improvement. Lima: CIP, 1985. P. 99-114.
62. De Maine M.J. Comparisons of tetraploid progenies of potato dihaploids their chromosome-doubled derivatives and second generation dihaploids// Potato Res. 1994. Vol.37, N 2. P. 173-181.
63. De Jong H., Tai G.C.C., Russell W.A. et al. Yield potential and genotype-environment interactions of tetraploid-diploid (4x-2x) potato hybrids// Amer.Potato J. 1981. Vol.58, N 4. P 191-199.
64. Masson M. F., Peloquin S.J. Heterosis for tuber yields and total solids content in 4x-2x FDR-CO crosses in potato// The production of new potato varieties: technological advances. Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1987. P. 213-217.
65. Consilio L., Peloquin S.J. Evaluation of the 4x-2x breeding scheme in a potato breeding program adapted to local conditions// J. Genet.& Breed. 1991. Vol.45, N 1. P. 13-18.
66. De Maine M.J. An evaluation of the use of dihaploids and unreduced gametes in breeding for quantitative resistance to plant pathogenes// J. Agric. Sci.1982. Vol. 99. P. 78-83.
67. De Maine M.J., Stewart H.E., Phillips M.S. The production of dihaploids with combined quantitative resistance to potato cyst nematode (Globodera pallida) and foliage blight (Phytophtora infestans)// Potato Res. 1989. Vol.39, N 4. P. 425-430.
68. Langton F.A., Ross H. The effect of colchicine doubling of potato

Национальная академия наук Беларуси

dihaploid x wild species hybrids on eelworm resistance and pollen "stainability" // Potato Res. 1982. Vol.25, N 3. P. 257-263.
69. Iwanaga M., Jatala P., Ortiz R., Guevara E. Use of FDR 2n pollen to transfer resistance to root-knot nematodes into cultivated 4x potatoes // J. Amer. Soc. Hort. Sci. 1989. Vol.114, N 6. P. 1008-1013.
70. Zimnoch-Guzowska E., Dziewonska M.A. Breeding potato at diploid level// Parental line breeding and selection in potato breeding. Wageningen: PUDOC, 1989. P. 163-171.
71. Herriot A.B., Haynes F.L., Shoemaker P.B. Inheritance of resistance to early blight disease in tetraploid x diploid crosses of potatoes// Hort. Sci. 1990. Vol. 25. P. 224-226.
72. Jansky S.H., Peloquin S.J., Yerk G.L. Use of potato haploids to put 2x wild species germplasm in usable form// Plant Breeding.1990. Vol. 104. P. 290-294.
73. Watanabe K., El-Nashaar H.M., Iwanaga M. Transmission of bacterial wilt resistance by first division restitution (FDR) 2n pollen via 4x-2x crosses in potatoes// Euphytica. 1992. Vol. 60, N1. P. 21-26.
74. Watanabe K.N., Valkonen J.P.T., Gregory P. Use of plant biotechnology tools in plant protection, genetic resources management and crop genetic improvement. An interdisciplinary approach with potatoes at the International Potato Center// Plant Biotechnology Transfer to Developing Countries. RG Landes Company, 1995. P.179-190.
75. Gebhardt C., Bellin D., Henselewski H., Lehmann W., Schwarzfischer J., Valkonen J.P.T. Marker-assisted combination of major genes for pathogen resistance in potato//Theor.Appl. Genet. 2006. Vol. 112. P.1458-1464.
76. Kidane-Mariam H.M., Arndt G.C., Macaso A.C., Peloquin S.J. Comparisons between 4x-2x hybrid and open pollinated true-potato-seed families // Potato Res. 1985. Vol. 28, N 1. P. 35-42.
77. Ермишин А.П. Генетические основы селекции картофеля на гетерозис. Минск: Технология, 1998. 183 с.
78. Yermishin A.P. The development of initial parental material for breeding disease resistant potatoes at the diploid level// Plant Breeding and Seed Science. 2000. Vol. 44. N 2. P. 105-115.
79. Ермишин А.П. Несовместимость при межвидовой и внутривидовой гибридизации диплоидного картофеля и пути ее преодоления// Вести НАН Беларуси. Сер. биол. наук. 2001. № 3. С. 105-118.
80. Ермишин А.П.Пути повышения эффективности диплоидной селекции картофеля // Молекулярная и прикладная генетика. Научные труды, 2005. Том 1 . С.17-21.
81. Воронкова Е.В., Подлисских В.Е., Соколова Е.В., Ермишин А.П. Создание и изучение

Национальная академия наук Беларуси

коллекции первичных дигаплоидов сортов картофеля// Генетика и селекция в XXI веке. Материалы VIII съезда генетиков и селекционеров Беларуси. 23-25 июля 2002. Минск, 2002. С.27-29.
82. Ермишин А.П., Савчук А.В., Калашникова Н.В. Влияние общей и специфической скрещиваемости родительских форм на эффективность гибридизации дигаплоидов картофеля// Весці АН Беларусі. Сер. біял. навук. 1997. N 3. С. 37-40.
83. Ермишин А.П., Воронкова Е.В. Показатели фертильности гибридного потомства вторичных дигаплоидов картофеля// Весці НАН Беларусі. Сер. біял. навук. 1998. N 3. С. 45-52.
84. Подлисских В.Е., Воронкова Е.В., Аношенко Б.Ю. Проявление и наследуемость признака «функциональная фертильность пыльцы» у диплоидных форм картофеля межвидового происхождения // Вести НАН Беларуси. Сер.биол.наук. 1999. № 2. С.34-38.
85. Anoshenko, B.Yu., Podlisskikh V.E. Effect of functional female and male fertilities on crossability in diploid potato breeding// Potato Research. 2000. Vol.43. P. 125-134.
86. Voronkova E.V., Dedjulja K.L., Podlisskikh V.E., Anoshenko B.Ye., Yermishin A.P. The genetic control of functional male fertility in potato *S.tuberosum* dihaploids // Abstracts of 15th Triennial Conference of the EAPR (14-19 July 2002, Hamburg). Hamburg, 2002. P. 51.
87. Савчук А.В., Ермишин А.П. Селекция дигаплоидов картофеля на фертильность// Генетика и селекция в XXI веке. Материалы VIII съезда генетиков и селекционеров Беларуси (Минск, 23-25 июля 2002). Минск, 2002. С.146-147.
88. Лукша В.И., Воронкова Е.В., Савчук А.В., Ермишин А.П. Влияние направления скрещиваний на фертильность межвидовых гибридов картофеля //«Принципы и методы оптимизации селекционного процесса сельскохозяйственных растений»: Материалы междунар. науч.-практ. конф. (Жодино, 14-15 июля 2005). Минск, 2005. С.213-218.
89. Лукша В.И., Воронкова Е.В., Савчук А.В., Ермишин А.П. Включение генофонда диплоидных видов, дающих гибриды с ЦМС на цитоплазме *S.tuberosum*, в процесс селекции картофеля на устойчивость к болезням и вредителям // «Актуальные проблемы защиты картофеля, плодовых и овощных культур от болезней, вредителей и сорняков»: Материалы междунар. науч.-практ. конф. (Самохваловичи, 9-12 августа 2005 г.). Минск, 2005. С. 228-233.
90. Лукша В.И., Воронкова Е.В., Ермишин А.П. ЦМС и

Национальная академия наук Беларуси

восстановление фертильности у межвидовых гибридов картофеля с участием различающихся по степени мужской фертильности дигаплоидов *Solanum tuberosum* // Факторы экспериментальной эволюции организмов: Сб. науч. трудов/ Укр. об-во генетиков и селекционеров им. Н.И.Вавилова. Т.3. К.: Логос, 2006. С. 265-269.

91. Подлисских В.Е., Калашникова Н.В., Савчук А.В. Изучение цитогенетических механизмов формирования нередуцированной пыльцы у исходного материала для селекции картофеля на диплоидном уровне // Цитология и генетика. 1996. Т.30. №2. С.11-16.
92. Подлисских В.Е., Подлисских В.Л., Аношенко Б.Ю. О возможности использования в селекции картофеля фертильных дигаплоидных образцов - доноров мейотических мутаций// Сельскохозяйственная биология, 1999, N3, с.54-60.
93. Podlisskikh V.E. Genetic analysis of the meiotic abnormality ―fused spindles" // Breeding research for resistance to pathogens and for quality traits. EAPR and EUCARPIA section meeting (Warsaw, July 3-7, 2000). Warsaw, 2000. P. 58.
94. Подлисских В.Е., Т.М. Анкудо, Б.Ю. Аношенко. Особенности формирования веретена деления и поведения хромосом в мейозе у образцов диплоидного картофеля с мутацией «слияние веретен»// Цитология. 2002. Том 44, № 10. С.996-1003.
95. Ермишин А.П., Маханько О.В., Воронкова Е.В., Хлебникова Л.М. Подходы к использованию в селекции соматических гибридов между дигаплоидами *Solanum tuberosum L.* и диплоидными дикими видами картофеля из Мексики// ―The Biology of Plant Cells in vitro and Biotechnology". Abstracts VIII Intern.Conf. (Saratov September 9-13, 2003). Саратов, 2003. С. 369.
96. Ермишин А.П., Тельцова Ю.В., Савчук А.В., Маханько О.В. Создание линий-посредников с sc-системой от *Solanum verrucosum* для преодоления межвидовой несовместимости у картофеля // Отдаленная гибридизация. Современное состояние и перспективы развития (Материалы Международной конференции по отдаленной гибридизации, Москва, 16-17 декабря 2003 г.) М.: Издательство МСХА. 2003 б. С.96-100.
97. Маханько О.В., Ермишин А.П. О возможности использования тетраплоидных соматических гибридов *S.tuberosum+S.bulbocastanum* в селекции картофеля на устойчивость к фитофторозу // «Актуальные проблемы защиты картофеля, плодовых и овощных культур от болезней, вредителей и

Национальная академия наук Беларуси

сорняков»: Материалы междунар. науч.-практ. конф. (Самохваловичи, 9-12 августа 2005 г.). Минск, 2005. С. 294-299.

98. Ермишин А.П., Маханько О.В., Воронкова Е.В. Использование в селекции соматических гибридов между дигаплоидами картофеля *Solanum tuberosum* и дикими диплоидными видами из Мексики: получение и беккроссирование дигаплоидов соматических гибридов// Генетика. 2006. Т.42, № 12. С. 1674-1682.

99. Воронкова Е.В., Ермишин А.П. Особенности включения в геном *Solanum tuberosum* генофонда аллополиплоидных видов картофеля // Молекулярная и прикладная генетика. Научные труды, 2005. Том 1 . С.160.

100. Воронкова Е.В., Лисовская В.М., Ермишин А.П. Использование генофонда аллотетраплоидных видов в диплоидной селекции картофеля на устойчивость к болезням и вредителям // Фитосанитарное оздоровление экосистем. Материалы Второго Всероссийского съезда по защите растений. ВИЗР, С.-Петербург, 2005. – Т. 1. – С.420 – 422.

101. Воронкова Е.В., Лисовская В.М., Ермишин А.П. Диплоидные гибриды между аллотетраплоидными дикими видами картофеля *Solanum acaule* Bitt., *S. stoloniferum* Schltdl. и дигаплоидами *S.tuberosum* L. // Генетика.2007.Т.43.№8. С.1065-1073.

Национальная академия наук Беларуси

УДК 57.085.23

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ПЫЛЬЦЕВОГО ЭМБРИОГЕНЕЗА И ЕГО ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В СЕЛЕКЦИИ РАСТЕНИЙ

П.А.Орлов, Е.В.Антоненко
ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»
Беларусь, 220072, Минск, ул.Академическая, 27,
E-mail: P.Orlov@igc.bas-net.by

Введение

В ходе естественного развития микроспоры растений проходят несколько этапов дифференцировки и превращаются в пыльцевые зерна. Однако при определенных условиях в культуре клеток и тканей *in vitro* они могут менять программу дифференцировки и развиваться по пути формирования эмбриоидов – структур, идентичных соматическим зародышам. Такой путь развития называется пыльцевым эмбриогенезом [1]. В этом случае реализуется программа развития, приводящая к формированию гаплоидного зародыша, а затем гаплоидного растения из отдельных клеток микроспор. Если в процессе развития происходит спонтанное или индуцированное удвоение числа хромосом, то формируются полностью гомозиготные фертильные растения – удвоенные гаплоиды (дигаплоиды). В естественных условиях частота андрогенеза крайне низка и описана лишь в единичных случаях [2, 3, 4, 5]. Обычно его индукция отмечается лишь при определенных условиях в результате воздействия ряда физических и химических факторов. В настоящее время у большинства экономически важных растений, как однодольных (пшеница, кукуруза, рис, рожь и др.), так и двудольных (капуста, морковь, табак, рапс и др.) удалось с той или иной частотой индуцировать в культуре пыльников процессы пыльцевого эмбриогенеза [6,7].

Индукция и прохождение морфогенетических процессов в культуре пыльников возможно в нескольких направлениях:

1) прямой эмбриогенез – регенерация;

2) прямой эмбриогенез – каллусообразование – вторичный эмбриогенез – регенерация;

3) каллусообразование – индукция эмбриогенеза – регенерация.

Прямой соматический эмбриогенез заключается в формировании вегетативного зародыша из одной или нескольких клеток ткани экспланта без стадии промежуточного каллуса. Такое явление наблюдается у цитрусовых, у которых ткани нуцеллуса способны как *in vivo*, так и *in vitro*, давать начало нуцеллярным зародышам, а также в других случаях, когда культивируемые зародыши начинают почковаться [8]. Этот процесс может отмечаться и

Национальная академия наук Беларуси

при культивировании пыльников.

Непрямой соматический эмбриогенез отличается тем, что после помещения экспланта в культуру клеток сначала индуцируется образование каллуса, после переноса которого на питательную среду, способствующую регенерации формируются биполярные зародыши, способные прорастать с образованием растений-регенерантов.

В культуре изолированных микроспор в большинстве случаев развитие идет по пути прямого эмбриогенеза [9]. Культивирование изолированных микроспор в отличие от культуры пыльников имеет ряд специфических особенностей. За последние 10 лет основные успехи в культивировании изолированных микроспор были достигнуты у таких растений как кукуруза [10], ячмень [11,12], рис [13]. В большинстве случаев исследователям удалось получить фертильные растения регенеранты. Активно используется технология изолированных микроспор для создания сортов растений. Единичные растения регенеранты были получены при изоляции микроспор с помощью блендера [14,15,16] или растиранием предварительно выделенных пыльников [17,18,19]. Более успешными были эксперименты, в которых использовалось совместное культивирование семяпочек и микроспор [16, 18].

Индукция пыльцевого эмбриогенеза у растений лежит в основе многих современных технологий получения трансгенных форм, создания новых рекомбинантных генотипов, селекции в культуре клеток и тканей *in vitro* и других. Его использование позволяет значительно сократить сроки выведения линий и сортов экономически ценных культур, легко обнаружить рецессивные мутанты, проводить селекцию клеточных линий, устойчивых к патогенам, экстремальным условиям, засухе, засолению, получать высоко эмбриогенные культуры протопластов и др. [20].

Эффективность и масштабы применения пыльцевого эмбриогенеза существенно снижены из-за того, что до настоящего времени не идентифицированы гены, контролирующие признаки, характеризующие способность растений к перестройке морфогенетических процессов в культуре гаметофитных тканей и последующей регенерации растений.

Целью данной работы является анализ литературных и собственных данных авторов по проблеме пыльцевого эмбриогенеза и его использования в практической селекции.

Материалы и методы

Материалом для исследования служили дигаплоидные линии пшеницы, полученные ранее методом культуры пыльников, сорта пшеницы белорусской селекции и гибриды первого поколения, полученные от скрещиваний между ними.

Национальная академия наук Беларуси

Растения выращивали на экспериментальном поле БОС Института генетики и цитологии НАН Беларуси. Срезанные колосья выдерживали в течение 5-7 дней при 5-7°С. Пыльники изолировали на стадии поздних одноядерных микроспор, высаживали на питательные среды в чашки Петри размером 40 мм с питательной средой РЕ-2 [21] или С17 [22], заклеивали парафильмом, выдерживали 2 недели в темноте при 31°С, затем при 26°С. Образующиеся эмбриоиды пересаживали на модифицирующую среду и через месяц на среду для регенерации [23]. Регенеранты высаживали в почву.

Оценивали следующие параметры: частота индукции эмбриогенеза (от числа посаженых пыльников); частота регенерации зеленых растений, частота регенерации альбиносных растений (от числа эмбриоидов), доля альбиносных растений.

Изоляцию и культивирование микроспор проводили согласно ранее опубликованной методике [24].

Статистическую оценку результатов проводили с помощью пакета Exell.

Использование пыльцевого эмбриогенеза в селекции растений

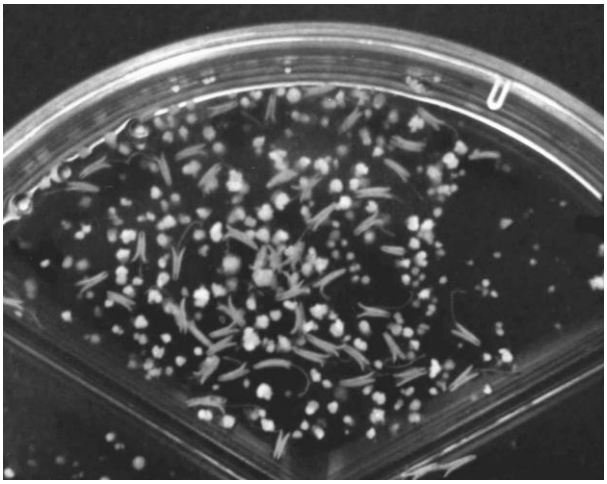
Метод культуры пыльников получил широкое развитие и непосредственное использование в селекционных программах самых разных сельскохозяйственных культур. В сочетании с гибридизацией он особенно эффективен при создании новых форм пшеницы, риса, кукурузы, табака. При этом большое внимание уделяется подбору исходного материала, от которого в значительной степени зависит успех работы.

Гаплоидные растения, берущие начало из микроспор открывают совершенно новые перспективы производства гомозиготных линий благодаря тому, что тому, что каждое растение продуцирует огромное количество микроспор, из которых очень быстро могут быть получены эмбриоиды (рис.1) и затем фертильные дигаплоидные регенеранты [8,25]. Это дает мощный инструмент для гибридного семеноводства и реализации потенциала генетической изменчивости.

Клеточные и тканевые культуры, индуцированные при культивировании пыльников, позволили существенно сократить сроки получения гомозиготного материала [26], клеточных линий, устойчивых к различным химическим соединениям [27], выделения жизнеспособных протопластов [28], используются в экспериментах по генетической инженерии [15]. Успешным оказалось использование метода культивирования пыльников для ускоренной передачи хозяйственно-ценных признаков от одних генотипов другим. Примером могут служить данные о передаче устойчивости к сетчатой пятнистости от шестирядного ячменя двухрядному менее, чем за два года [29], устойчивости к вирусу желтой мозаики ячменя [30] и др.

Национальная академия наук Беларуси

Национальная академия наук Беларуси



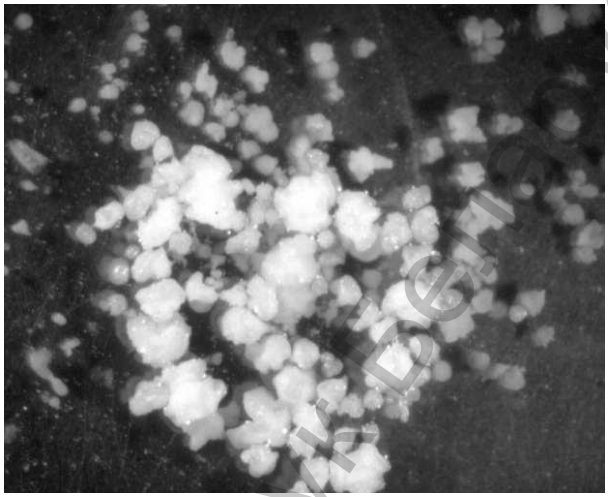


Рисунок 1 - Эмбриоиды, полученные в культуре пыльников (а) и изолированных микроспор (б) пшеницы

Культивирование пыльников гибридов первого поколения позволяет получать стабильные, гомозиготные формы, сочетающие те или иные полезные признаки родительских форм за счет рекомбинативной или сомаклональной изменчивости. Дальнейшие их размножение и отбор дают возможность создавать новые ценные рекомбинантные формы, либо сорта. Так, с использованием культуры пыльников созданы сотни сортов, таких растений как ячмень, пшеница, рапс, рис, тритикале, табак и др. С помощью культуры изолированных микроспор созданы сорта рапса, ячменя, капусты [1].

Принципиальное отличие технологий, включающих культивирование пыльников от классических методов селекции заключается в том, их применение позволяет ускорить минимум в 2-3 раза процесс создания стабильных не расщепляющихся форм. Кроме того, во многих случаях, особенно при межвидовых скрещиваниях, удается получить новые уникальные сочетания генов, определяющих хозяйственно-ценные признаки, которые при использовании традиционных методов выделить крайне трудно.

Эффективность индукции зависит от многих факторов, в том числе и от видовой принадлежности растений. Все положительные результаты были получены с использованием схемы экспериментов, включающей несколько основных этапов, среди которых наиболее важными являются предобработка эксплантов с помощью стрессовых воздействий, индукция пыльцевого эмбриогенеза, регенерации растений и их укоренение в почве (рис. 2).

Основные направления использования пыльцевого эмбриогенеза следующие:

Национальная академия наук Беларуси

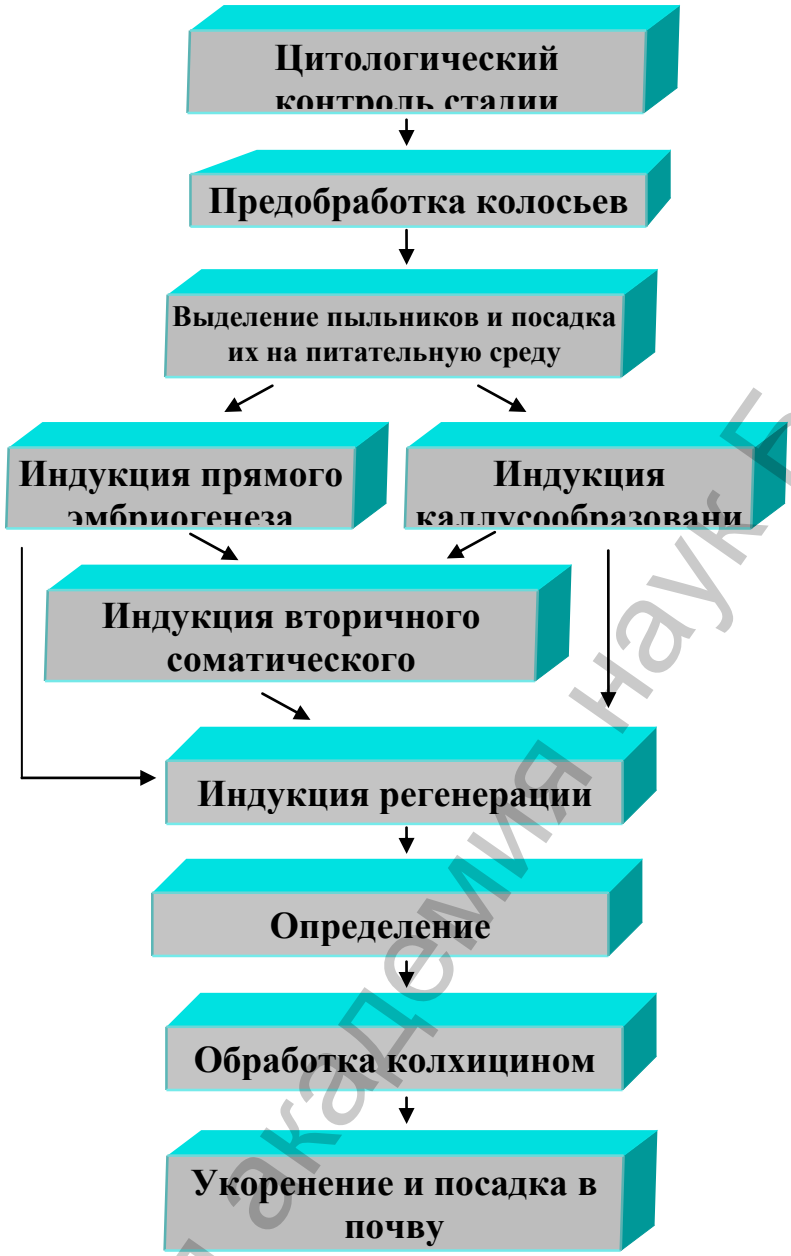


Рисунок 2 - Основные этапы создания удвоенных гаплоидов в культуре пыльников растений

Факторы, определяющие эффективность индукции пыльцевого эмбриогенеза

Индукция пыльцевого эмбриогенеза и получение дигаплоидных растений регенерантов это сложный процесс, требующий строгого соблюдения ряда условий. Основными факторами, влияющими на эффективность их индукции, являются генотип, условия выращивания донорных растений, тип предобработки донорных растений и колосьев, фаза развития микроспор, состав питательных сред.

Влияние генотипа на эффективность индукции андрогенеза в культуре пыльников и

Национальная академия наук Беларуси

изолированных микроспор проявляется как на внутривидовом, так и межвидовом уровнях. На внутривидовом уровне различия между отдельными генотипами могут варьировать от 0 до 100% (табл. 1.).

Таблица 1. Выход эмбриоидов и регенерантов в культуре пыльников (в пересчете на 100 пыльников)

Генотип	Число посаженных пыльников	Число эмбриоидов	Число регенерантов	
			зелёных	этиоли-рованных
Dh 64-18	252	22,62	0	0
Dh 66-(2)-6	646	23,37	0,46	0,15
Рассвет	619	6,14	0	0
Людмила	396	3,03	0	0
BOR 25115	627	0,80	0	0
Копылянка	719	1,25	0	0
Росстань	1000	0,90	0	0
Дарья	524	101,91	0	0
Dh 220-2-2	429	5,13	0	0
Флорида	627	12,44	2,23	0
Людмила × BOR 25115	125	2,50	0	0
BOR 25115 × Людмила	125	2,40	0	0
Росстань × Dh 64-18	252	3,57	0	0
Dh 64-18 ×Росстань	47	36,17	2,13	10,64
Копылянка × Флорида	859	4,07	0	0,12
Флорида × Копылянка	536	4,48	0,19	0,56
Dh 61-14 × Dh 222-1-1	238	203,36	35,71	10,92
Dh 222-1-1 × Dh 64-18	75	80,00	14,67	1,33

На межвидовом уровне различия также очень велики. Так, по данным различных исследователей наиболее высокие уровни отзывчивых пыльников (число пыльников и каллусами и эмбриоидами в расчете на 100 посаженных пыльников) для различных культур составляли, 87% у пшеницы [31], 17% у кукурузы [32], 10% - у ячменя [30, 33], 43% у ржи [34].

Пыльники очень чувствительны к различным воздействиям, которые влияют на эффективность пыльцевого эмбриогенеза в культуре пыльников. Одним из таких факторов является физиологическое состояние растений доноров пыльников, в свою очередь определяемое множеством причин. Так показано, что значительное влияние на выход отзывчивых пыльников и регенерантов

Национальная академия наук Беларуси

оказывают уровень азота при выращивании донорных растений [35], освещение и температура их выращивания [36,37] изменение фотопериода и интенсивности освещения [38]. Существенное значение имеет возраст растений и стадия развития пыльников. Механизмы, реализующие эти эффекты пока не известны. Возможно, что они определяют процентное содержание компетентных к эмбриогенезу Р-зерен, существование которых предполагается гипотезой Heberle-Bors [37]. В то же время, все эти факторы, так или иначе, влияют на регулярность процесса мейоза [39], что является возможной первопричиной повышения выхода отзывчивых пыльников.

Эффективность индукции резко повышается при использовании стрессовых воздействий. Голодание или осмотический стресс возникающие при инкубировании пыльников на растворе маннитола повышают частоту эмбриогенных пыльников у ячменя [40]. У пшеницы при воздействии повышенных температур (30-32^{o}C) число отзывчивых пыльников увеличивалось примерно в 3-4 раза, а выход зеленых регенерантов примерно на 10% [41,42].

Комбинация голодания и теплового шока применяется при культивировании пыльников пшеницы и табака [19,43]. Тепловой шок достаточен для предобработки пыльников рапса и перца [44,45]. Показано положительное действие на выход новообразований центрифугирования, гербицидов [46], лазерного облучения [47] и др. Менее эффективно использование колхицина [48,49], азотного голодания [50], ауксина [40,51], гамма облучения [52].

В случае индукции соматического эмбриогенеза важную роль играют также различные экзогенные факторы, добавляемые в питательные среды, такие как ауксины, кинетины, абсцизовая кислота [53,54], осмотический шок, отсутствие источников углеводов, ионы тяжелых металлов [55]. В случае же зиготического эмбриогенеза более важны эндогенные факторы, например увеличение после оплодотворения синтеза этилена и повышение уровня эндогенных ауксинов [56,57].

Реакция растений на температурный стресс зависит от вида растений и их генотипа. Предполагается, что она наследуется как полигенный признак [58]. Сложный характер этого признака подтверждается косвенно и тем, что в некоторых случаях число отзывчивых к эмбриогенезу пыльников увеличивается в результате комбинированной обработки высокими и низкими температурами. Эффективность применения комплексной обработки, также как и реакция на пониженные температуры, зависела от генотипа сорта растений [41,59], а также типа цитоплазмы [24].

Следующим фактором, влияющим на эффективность образования эмбриогенных структур при культивировании пыльников, является стадия развития пыльцы. По данным Prakash и Gill более чем у 150 видов пыльцевой эмбриогенез

Национальная академия наук Беларуси

был индуцирован при изоляции пыльников на стадии одноядерной или двуядерной пыльцы [60].

Для растений пшеницы, ячменя, кукурузы, риса, ржи оптимальной стадией является стадия одноядерных микроспор [11,61]. (Mordhorst, Lorz, 1993; Горбунова и др., 1993). Известны отдельные работы, в которых описано успешное получение андрогенных структур при культивировании пыльников и на более ранних стадиях. Сообщалось, например, об эффективной индукции пыльцевого эмбриогенеза у кукурузы и наперстянки на стадии тетрад микроспор. Попытки же индуцировать этот процесс из пыльников, изолированных на стадии мейотического деления у большинства растений были неудачными, за исключением арабидопсиса, томата и винограда [62].

Поскольку предобработка пыльников является для них, прежде всего стрессовым воздействием, то обычно в качестве возможного пути сигнальной трансдукции рассматривают "стрессовый гормон" - абсцизовую кислоту (АБК).

Впервые важная роль АБК в ходе индукции пыльцевого эмбриогенеза была отмечена Imamura и Harada, которые обнаружили пик повышения уровня эндогенной АБК через 24 часа предобработки пыльников табака маннитолом [63]. Позже точно такая реакция была описана и для пыльников ячменя [64]. Ингибитор синтеза АБК флюридон уменьшал регенерационную способность андрогенных структур ячменя [65]. Стимулирующий эффект добавок АБК был отмечен в экспериментах по индукции ПЭ в культуре пыльников пшеницы [14] и табака [50].

Предполагается, что стресс-индуцируемый АБК-сигналинг у растений может активировать каскад митоген активируемой киназы, индуцируя деление клеток и дифференцировку микроспор в новом направлении [66]. АБК модулирует также экспрессию генов семейства алкоголь дегидрогеназ [67] и повышенный синтез одной из них (АДГ3) тесно связан с высокой частотой индукции регенерации в культуре пыльников ячменя и пшеницы после стрессовой предобработки [64,68].

Множественный скрининг показал, что в процессе индукции пыльцевого эмбриогенеза с помощью маннитола в микроспорах снижается уровень экспрессии ключевых генов, участвующих в биосинтезе крахмала, таких как сахароза синтазы 1, фосфоглюкомутазы, УДФ-глюкозо 4-эпимеразы, глюкозо-1-фосфат аденилтрансферазы, УТФ-глюкозо-1-фосфат уридилилтрансферазы и грануло-связанной крахмал синтазы. Одновременно индуцируются гены мальтазы и инвертазы, которые участвуют в расщеплении, соответственно, крахмала и сазарозы [69].

На следующем этапе отмечаются радикальные изменения организации клеток – ядро смещается к центру, от него к периферии отходят многочисленные тяжи, между которыми располагаются фрагменты вакуоли.

Национальная академия наук Беларуси

Формируется структура типа многолучевых звезд. По мнению большинства исследователей, такая перестройка клеток является необходимым этапом для их последующей дифференцировки и наблюдается при самых разных типах предобработки пыльников или микроспор, таких как голодание [24,68,70], тепловой шок [71,72], выдерживание при пониженных температурах [73,74], обработка митотическими ядами [48] и др. На наш взгляд, к этому моменту времени формируются новые внутриклеточные паттерны экспрессии генов, необходимые, для реализации программы пыльцевого эмбриогенеза.

Происходят процессы перестройки клеточного скелета. Это хорошо иллюстрируется с помощью химических веществ блокирующих веретено клеточного деления. Например, обработка микроспор колхицином приводит к смещению ядра в центр клетки и активирует процесс андрогенеза [48,75].

Большинство генов, дифференциально экспрессирующихся в ходе предобработки связаны с синтезом стрессовых гормонов, метаболизмом сахаров, протеолитическими процессами, защитой клетки от стресса [76,77]. В частности, отмечается увеличение синтеза абсцизовой кислоты [65]. У пшеницы уже через 6 часов после индукции андрогенеза на среде содержащей ауксин регистрируется экспрессия гена, кодирующего ранний цистеин содержащий белок II металллотионин класса (EcMt). Промоторный район гена EcMt содержит АБК отзывчивый элемент, и его повышающая регуляция тесно коррелирует с пиком выработки эндогенной АБК в ходе индукции пыльцевого эмбриогенеза [78]. В передаче АБК сигналинга, ведущего к экспрессии гена EcMt принимают участие ионы Ca2+, а, следовательно, вполне вероятно и калмодулин [79].

В культуре микроспор табака, в ходе воздействия на них азотного голодания отмечен избыточный синтез NtEPc фосфопротеина, который имеет гомологию с несколькими связывающими медь гликопротеинами 1-типа, и ранним нодулином. Экспрессия NtEPc гена ингибируется кинетином [80].

У арабидопсиса при такой обработке отмечается согласованное повышение экспрессии генов, участвующих в реутилизации углеводов и внутриклеточного азота [81] и повышением экспрессии генов, определяющих отдельные компоненты протеаз и убиквитин26S протеосомного протеолитического пути [69,82,83]. Сходная картина отмечается и в случае дедифференцировки клеток при индукции соматического эмбриогенеза [84,85].

Поскольку для индукции пыльцевого эмбриогенеза используются стрессовые воздействия, то логично, что в клетках микроспор включаются определенные защитные механизмы. В частности у многих видов растений в ходе индукции пыльцевого эмбриогенеза резко повышается синтез белков теплового шока (БТШ) [45,86]. В то же время у

Национальная академия наук Беларуси

рапса андрогенез может быть индуцирован колхицином без заметного изменения уроня БТШ [71]. Поэтому, можно предположить, что БТШ косвенно участвуют в регуляции ПЭ посредством модуляции активности других регуляторных белков.

Наряду с БТШ в процессе индукции ПЭ [87] и ауксин-индуцируемого соматического эмбриогенеза [84] у ячменя отмечается также повышение уровней экспрессии генов семейства глютатион S-трансферазы, кодирующих белки, участвующие в детоксикации ксенобиотиков и защите клетки от окислительного стресса [88].

Генетические явления, происходящие в ходе реализации программы пыльцевого эмбриогенеза

Чтобы полностью понять механизмы индуцированного пыльцевого эмбриогенеза, а также выяснить основные причины таких генетических событий, происходящих в ходе культивирования, как сомаклональная изменчивость, апоптоз, спонтанная диплоидизация, альбинизм и других, необходимо идентифицировать гены, участвующие в перестройке программы развития со спорофитного на гаметофитный путь развития. К сожалению, в настоящее время информация по этому вопросу крайне ограничена. Хотя еще в 1981 было показано, что в андрогенных микроспорах *Hyoscyamus niger* уже через 1 час после начала их культивирования происходит синтез мРНК, необходимой для пролиферации по пути соматического эмбриогенеза [89]. (Raghavan, 1981).

При изучении эмбриогенных микроспорах Brassica sp. выявлено несколько генов, экспрессирующихся в ходе пыльцевого эмбриогенеза [90]. Это уже упоминавшийся нами ранее АБК зависимый ген металлотионина у пшеницы, экспрессия которого отмечается на ранних этапах индукции пыльцевого эмбриогенеза [78], а также гены запасных белков семян напинов и специфических белков теплового шока [44,91].

Вероятно, в качестве маркеров пыльцевого эмбриогенеза могут служить три фрагмента ДНК, обнаруженные в кДНК библиотеках ячменя [87]. Однако это сообщение требует дальней проверки.

Современные методы изучения экспрессии генов в ходе индукции и реализации программы пыльцевого эмбриогенеза, такие как дифференциальный скрининг, анализ проб кДНК, показали, что индуцируемому стрессом репрограммированию клеточного метаболизма предшествует экспрессия ключевых генов регуляторов эмбриогенеза, таких как транскрипционный фактор BABY BOOM, репрессия генов, имеющих отношение к биосинтезу крахмала, а также индукция протеолитических генов, например, компонентов 26S протеосом, металлопротеаз, цистеина, аспартат протеаз и стрессовых белков, таких как GST, HSP, BI-1, ADH [92].

Национальная академия наук Беларуси

Особенно интересен ген BABY BOOM (BBM), член AP2/ERF семейства транскрипционных факторов, который преимущественно экспрессируется в ходе андрогенеза и зиготического эмбриогенеза. Его эктопическая экспрессия у рапса и арабидопсиса приводит к образованию зародышеподобных структур на листьях молодых проростков [91].

Другой регуляторный ген, имеет важное значение в ходе индукции клеточных делений и кодирует AGAMOUS-подобный 15 белок (AGL15), член MADS семейства транскрипционных факторов. Показано, что перед началом делений в ходе зиготического и соматического эмбриогенеза, апомиксиса и андрогенеза белок AGL15 перемещается в ядро [93].

На более поздних этапах, после того, как в клетках микроспор индуцируются клеточные деления, в них отмечается активация регуляторных генов, управляющих программой эмбриогенеза. У арабидопсиса это такие гены как LEAFY COTYLEDON1 (LEC1), LEAFY COTYLEDON2 (LEC2), FUSCA3 (FUS3), выявленные при дифференциальном скрининге мутантов [94]. Предполагается, что они координируют прохождение фазы приобретения компетенции и дальнейших этапов развития зародыша. Ген WUSCHEL (WUS) кодирует гомеодоменный белок, который стимулирует переход от вегетативного развития к эмбриогенному [95].

В компетентных микроспорах кукурузы на стадии индукции андрогенеза обнаружена специфическая экспрессия гена ZmSERK1, кодирующего лейцин-богатую трансмембранную рецептор-подобную киназу. Предполагается, что этот фермент может играть важную роль в индукции эмбриогенного развития микроспор [96].

В развивающихся 5-7 дневных эмбриоидах кукурузы выявляется экспрессия специфичных для эндосперма генов ZmAE1 и ZmAE3. По времени этот совпадает с образованием ценоцитных структур сходных с инициалями эндосперма [97].

В ходе развития зиготы благодаря асимметричным делениям клеток, предположительно за счет изменений распределения ауксинов, устанавливается апикально-базальная ось [98,99]. Паттерны клеточных делений в эмбриогенных микроспорах пшеницы и кукурузы также могут строго контролироваться и, как правило, образуют две зоны: домен из маленьких клеток и более крупный домен, состоящий из многоядерных клеток. Эти домены сравнимы с соответствующими инициалями меристемы и эндосперма в ходе зиготического эмбриогенеза [97,100].

После образования эпидермиса, развитие эмбриоидов протекает аналогично зиготическим зародышам они проходят последовательно сердцевидную и торпедовидную стадии [101]. У ячменя это находит отражение и в сходстве времени экспрессии регуляторных белков 14-3-3 семейства [102,103].

Национальная академия наук Беларуси

В ходе индукции пыльцевого эмбриогенеза большая часть микроспор гибнет. Предполагается, что этот процесс осуществляется посредством апоптоза. Это подтверждается тем, что ДНК, выделенная из популяции неэмбриогенных гибнущих микроспор, не образует при электрофорезе четкой полосы, а характеризуется непрерывным спектром – "лестницей" [104]. Кроме того, для них характерно протеолитическое расщепление С-конца изоформы 14-3-3A белка [68]. Этих изменений не наблюдается во фракции увеличенных эмбриогенных микроспор. Для последних типична также экспрессия BAX INHIBITOR 1 (BI-1) гена [69].

Следует отметить, что существует, по крайней мере, два критических фактора при культивировании микроспор: жизнеспособность микроспор в начале культивирования и число клеток способных к пролиферации по пути индукции эмбриогенеза. В наших экспериментах в течение первых трех дней культивирования отмечалось до 95-99% жизнеспособных микроспор. Затем происходило резкое уменьшение популяции живых клеток. Возможно, необходима некоторая стабилизация жизнеспособных клеток для того, чтобы способные к индукции пыльцевого эмбриогенеза клетки могли реализовать свой потенциал. Во всяком случае, высокая жизнеспособность начальной популяции выделенных микроспор не обязательно гарантирует высокий уровень индукции эмбриогенеза и вполне вероятно, что существует другой механизм переключения микроспор с гаметофитного на спорофитный путь развития [25].

Гибель микроспор в течение первых трех дней после изоляции может происходить в результате дефицита специфических веществ, необходимых для их развития. По крайне мере, кокультивирование завязей пшеницы или ячменя увеличивало число клеток, способных развиваться по пути пыльцевого эмбриогенеза и последующей регенерации растений [16,18,43]. В наших экспериментах также не отмечалось индукции пыльцевого эмбриогенеза при использовании свежей среды С17. Лишь культивирование на кондиционированной среде дало возможность получить эмбриоиды и регенеранты [24].

Процессы программируемой клеточной смерти характерны для развития многих структур растений. В частности они необходимы для осуществления правильного паттернинга зиготических и соматических зародышей [105,106].

Другим важным генетическим явлением, происходящим в ходе реализации программы пыльцевого эмбриогенеза, является повышенная изменчивость культивируемых клеток. Такая изменчивость, наблюдаемая среди растений-регенерантов и их потомства, получила название сомаклональной [27,107].

Изменения, встречаемые у регенерантов, могут быть обусловлены разными причинами. В одних случаях они являются

Национальная академия наук Беларуси

результатом мутаций ядерных, либо цитоплазматических генов [108,109], в других – хромосомными нарушениями [27], в третьих – эпигенетической изменчивостью, сформировавшейся под влиянием различных факторов культивирования *in vitro* [110].

Генетические изменения, наблюдаемые у растений-регенерантов, включают изменения уровня плоидности, транслокации, инверсии и делеции хромосом, амплификацию генов, хлоропластные геномные перестройки и другие [107].

Сомаклональная изменчивость отмечена многими авторами по ряду морфологических признаков и свойств регенерировавших растений различных культур [108,111,112,113]. У пшеницы она выявлена по устойчивости к фитопатогенам [114] и компонентному составу запасного белка зерновки – глиадина [115]. Отмечено также возникновение карликовых растений, растений с укороченной длиной междоузлий, измененной формой колоса, ветвистых форм и т.д. [107].

При культивировании пыльников характеристики полученных растений зависят от того, возникли ли они путем прямого эмбриогенеза *in vitro* или регенерации из каллусных тканей. При прямом эмбриогенезе можно ожидать получение истинных гаплоидов или спонтанно удвоенных гаплоидов – дигаплоидов, тогда как из каллуса могут быть получены растения-регенеранты с разным уровнем плоидности. От соотношения между числом гаплоидов и числом спонтанных дигаплоидов зависит эффективность получения гомозиготных линий при андрогенезе [37,42]. Зрелые гаплоидные растения легко идентифицируются по морфологическим признакам. Как правило, они отличаются от обычных диплоидных растений меньшей высотой стебля, иной формой листа, меньшими размерами соцветий, стерильностью пыльцы, отсутствием семян [6].

Наряду с ядерными генами сомаклональная изменчивость может быть обусловлена изменениями в геномах цитоплазматических органелл, впервую очередь митохондрий и хлоропластов. Так, селекция в культуре клеток и тканей клонов устойчивых к грибному патогену *Cochliobolus heterostrophus*, приводит к изменениям в геноме митохондрий [116]. В большинстве же случаев митохондриальный геном растений-регенерантов, полученных в культуре тканей, практически не изменяется по сравнению с исходными формами [117,118]. Скорее всего, это связано с летальностью митохондриальных мутаций либо неспособностью измененных форм к регенерации растений. В результате этого большинство растений с измененным митохондриомом выпадают из поля зрения исследователей.

Значительно больше имеется сообщений о том, что культивирование клеток и тканей в культуре *in vitro* может приводить к изменениям в геноме хлоропластов. Фенотипически это часто

Национальная академия наук Беларуси

выражается в регенерации альбиносных растений регенерантов [119].

Проблемы в использование пыльцевого эмбриогенеза и пути их преодоления

Широкому внедрению методов культуры изолированных пыльников и микроспор в селекционную практику препятствует ряд обстоятельств: низкая эффективность индукции пыльцевого эмбриогенеза у многих генотипов, сравнительно низкий выход растений-регенерантов, низкая отзывчивость многих генотипов, появление растений-альбиносов, анеуплоидия (Орлов, 2001).

Решение проблемы отзывчивости растений к индукции пыльцевого эмбриогенеза от генотипа растений доноров может включать предварительный скрининг отзывчивых генотипов, подбор условий предобработок и культивирования, оптимизацию состава питательных сред, а также использование гибридных растений.

Поиск высоко отзывчивых генотипов и их дальнейшее использование в селекционном процессе обусловили значительный прогресс у таких культур как ячмень, пшеница, кукуруза, картофель, рапс [6,8,120].

Роль условий предобработок и культивирования и оптимизации состава питательных сред в повышении эффективности пыльцевого эмбриогенеза также велика и рассмотрена нами ранее. Этот подход в настоящее время является обязательным этапом работы при планировании фундаментальных и прикладных исследований с использованием пыльцевого эмбриогенеза.

Очень перспективным для повышения эффективности индукции пыльцевого эмбриогенеза, на наш взгляд, является использование гибридных генотипов. Так, Tuvesson et al. сообщили о существенном превышении (в 4-12 раз) числа эмбриоидов у гибридов первого поколения по сравнению с родительскими формами [121]. Скрещивание сортов пшеницы, характеризующихся высокой и низкой андрогенетической способностью в культуре пыльников, в ряде случаев приводило к передаче признака от лучшего родителя гибридам F_1 [122], что свидетельствует о доминантном характере наследования.

Имеется ряд работ, в которых показано превосходство межсортовых гибридов F1 пшеницы, тритикале над их родителями по способности образовывать андроклинные структуры и по частоте регенерации растений [25,123,124]. В Институте генетики и цитологии НАН Беларуси показана реальная возможность создания гибридов F_1, имеющих повышенную способность к индукции пыльцевого эмбриогенеза и регенерации растений в культуре пыльников *in vitro*, с участием хорошо отзывчивых дигаплоидных линий [125].

При этом определяющее значение имеет генотип материнского компонента

Национальная академия наук Беларуси

скрещивания. В отдельных комбинациях скрещиваний, где материнская форма имела низкую частоту индукции пыльцевого эмбриогенеза, наблюдалось сверхдоминирование. Анализ комбинационной изменчивости дигаплоидных линий показал, что наибольшая часть изменчивости по изучаемым признакам приходится на долю общей комбинационной способности, т.е. в наследовании этих признаков преобладает эффект аддитивности.

Второй по значимости проблемой в использовании культуры пыльников и микроспор в селекционном процессе является регенерация альбиносных растений. В некоторых случаях частотах появления может достигать 100%. Это серьезно препятствует использованию на практике и в фундаментальных исследованиях методов индуцированного андрогенеза. Механизмы возникновения альбиносных растений до сих пор не выяснены.

Опубликовано также несколько работ, касающихся выявления структурных изменений генома. Показано наличие делеций как в ядерном, так и в хлоропластном геноме, а также отсутствие транскриптов некоторых ядерных и хлоропластных генов [126,127].

Появление альбиносных растений сопровождается изменением экспрессии генов, контролирующих морфогенез листьев, что проявляется в изменении паттернов формирования клеток паренхимы и проводящих пучков, преждевременной вакуолизации клеток, их старении, а также изменении ультраструктурной организации цитоплазмы и ее органелл [128]. Эти отклонения, однако, не затрагивают отдельные компоненты хлоропластной белоксинтезирующей системы. В клетках альбиносных растений регенерантов происходит резкое снижение синтеза предшественников хлорофилла (АЛК, АЛКД, порфириногена) по сравнению с контрольными зелеными растениями [129].

Ряд исследований указывает на то, что возникновение альбиносов *in vitro* во многом обусловлено изменениями в хлоропластном геноме. Такие растения могут быть лишены хлоропластов и содержать их рудиментарные предшественники - пропластиды. К тому же у них может наблюдаться отсутствие 16S и 23S хлоропластных рРНК и рибулозобифосфаткарбоксилазы, кодируемых хлоропластным геномом [130,131].

Анализ альбиносных растений методом ПЦР в двух высоко изменчивых, «горячих» районах генома хлоропластов - D и G областях [132] показал, что у альбиносных растений всех исследованных генотипов, полученных методом культуры пыльников, с определенной частотой не выявлялись шесть из семи исследованных генов. Наиболее часто у дигаплоидных линий не обнаруживался ген atp B, кодирующий β-субъединицу CF1 комплекса АТФ-синтазы [129].

Попытки выявить ядерные гены, участвующие в контролировании частоты появления альбиносов дали лишь

Национальная академия наук Беларуси

приблизительную информацию. В ряде работ показано, что индукция альбинизма находится под воздействием ядерных генов [133,134]. Agache et al. показали увеличение образования альбиносов при замещении в различные генотипы *Chinese Spring* 5B хромосомы [133]. Возможной причиной сильного влияния ядерных генов является зависимость появления растений альбиносов от таких факторов, как физиологическое состояние донорных растений, условия культивирования и предобработки пыльников, стадия развития микроспор и др. [121,135].

В исследованиях Mc Hale et. al. указывается на ядерно-цитоплазматическое взаимодействие в индукции возникновения альбиносов [130]. В ходе экспериментов ими была открыта рецессивная ядерная мутация у табака, *Nicotiana sylvestris*, вызывающая нарушения в синтезе хлоропластных пигментов. Ядерно-цитоплазматическая детерминация этого процесса косвенно подтверждается также зависимостью процессов, протекающих в хлоропластах, от ядерных генов.

Естественно, нельзя исключать влияние на степень альбинизма физиологического состояния доноров, условий культивирования, стадии развития микроспор (в культуре пыльников). Однако именно генотип растения - вся совокупность генов плазмона и ядра, по мнению многих авторов, определяет соотношение зеленых и альбиносных растений [121,131,135,136,137].

В исследованиях Mouritzen et al. при культивировании пыльников ячменя выявлены делеции и транслокации в участках P2 и P3 пластидного генома. Однако не было никаких изменений в IR и SSC регионах, которые, как считается, необходимы для репликации ДНК хлоропластов. Это подтверждалось наличием в геноме хлоропластов генов psbA, psbC и psbD, ответственных за начало репликации [136].

Mouritzen et al. основываясь на результатах своих исследований пришли к заключению, что делеционные изменения в пластидном геноме отсутствуют до регенерации растений и возникают лишь в момент, когда апикальная меристема начинает дифференцироваться в морфогенетические структуры, постепенно увеличиваясь во время корневой и ростовой инициации [136]. Напротив, Caredda et al. считают, что дефекты ядерной или хлоропластной ДНК, связанные с андрогенетическим альбинизмом присутствуют в микроспорах перед введением их в культуру *in vitro* [119].

Для преодоления появления альбиносных растений-регенерантов основным экспериментальным подходом был поиск условий предобработки донорных растений и пыльников с целью снижения доли альбиносных регенерантов. При этом показано, что у некоторых генотипов можно увеличить долю зеленых растений-регенерантов до 100% [138,139].

Перспективным методов преодоления явления альбинизма

Национальная академия наук Беларуси

может быть создание гибридных комбинаций, которые обеспечивают оптимальные соотношения генов и характеризуются выходом, главным образом зеленых растений-регенерантов [1,129].

Заключение

Длительная целенаправленная селекция, которую проводили многие поколения селекционеров, привела к значительному росту урожайности сельскохозяйственных культур. Этому способствовало применение комплексного подхода, при котором сочетаются методы классической генетики и современные методы экспериментальной полиплоидии, индуцированного мутагенеза, отдаленной гибридизации и другие. Эти успехи были оплачены значительным сокращением генетического разнообразия селекционных образцов. С другой стороны интенсивное антропогенное давление на окружающую среду постоянно приводило и приводит к сокращению генетического фонда дикорастущих растений. Поэтому в настоящее время актуальна разработка новых эффективных методов улучшения растений. Большой потенциал в этом плане имеет использование технологий, основанных на использовании современных биотехнологических подходов, а также их сочетания с классическими методами селекции.

Внедрение в селекционный процесс новых биотехнологий позволяет существенно повысить его эффективность и значительно сократить сроки создания новых сортов. Привлекаемые для этой цели современные методы основаны на использовании культуры клеток и тканей, выращивании *in vitro* в стерильных условиях изолированных клеток, тканей и органов растений.

Массовое применение метода культуры пыльников в исследованиях на пшенице все еще представляет значительную сложность в связи с тем, что эффективность индукции пыльцевого эмбриогенеза сильно зависит от генотипа донорных растений, условий их выращивания, а также предобработок пыльников и условий культивирования.

Анализ имеющихся литературных данных и результатов собственных исследований авторов позволяет сделать следующие заключения:

1. Индукция пыльцевого эмбриогенеза – это перспективный экспериментальный подход, позволяющий существенно повысить эффективность применения в фундаментальных и прикладных исследованиях многих современных биотехнологий, таких как селекция на устойчивость в культуре клеток и тканей, генетическая инженерия, слияние протопластов, создание ценных рекомбинантов в культуре пыльников, создание новых сортов и др.

2. Программа индуцированного андрогенеза включает минимум 5 этапов: остановка действующей программы, приобретение компетенции к развитию в новом направлении, клеточные деления, дифференцировка и реализация

Национальная академия наук Беларуси

программы соматического эмбриогенеза, регенерация растений.

3. Использование пыльцевого эмбриогенеза в практической селекции требует предварительной подготовительной работы, включающей, скрининг отзывчивых генотипов, подбор оптимальных условий предобработок и культивирования растительного материала, изучения взаимодействия генов, определяющих отзывчивость к индукции пыльцевого эмбриогенеза, регенерации растений, выхода зеленых растений-регенерантов.

4. Использование дигаплоидных линий с высокой комбинационной способностью позволяет создавать гибридные комбинации, значительно превышающие исходные формы по признакам, характеризующим эффективность пыльцевого эмбриогенеза.

Список литературы

1. Орлов П. А. Клеточные и генно-инженерные технологии модификации растений. Минск: Тонпик, 2006. 248 с.

2. Rammana M.S. The origin and *in vivo* development of embryoids in the anthers of *Solanum* hybrids// Euphtytica. 1974. Vol. 23. P. 623–632.

3. Rammana M.S., Hermsen J.G.T.H. Embryoid formation in the anthers of some interspecific hybrids in *Solanum*// Euphytica. 1974. Vol. 23. P. 423–427.

4. Koul A.K., Karihaloo J.L. In vivo embryoids from anthers of *Narcissus bioflorus Curt.*// Euphytica.. 1977. Vol. 26. P. 97–102.

5. Орлов П.А. Ядерный и цитоплазматический контроль фертильности пыльцы: Автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.15/ИГиЦ АН БССР. Минск.- 1985.- 17 с.

6. Wenzel G. Biotechnology in Agriculture - an Overview/ In: Biotechnology. Vol 66. (Rehm H.J. and G.Reed eds.) VCH Verlags sellschaft. Weinheim. 1988. P. 772-796.

7. Reynolds T.L. Pollen embryogenesis// Plant Mol. Biology. 1997. Vol. 33. P. 1-10.

8. Wang M., Van Bergen S., Van Duijn B. Insights into a Key Developmental Switch and Its Importance for Efficient Plant Breeding// Plant Physiol. 2000. Vol. 124. P. 523-530.

9. Орлов П.А. Функциональная геномика морфогенеза. Минск: Право и экономика. 2005. 518 с.

10. Gaillard A., Vergne P., Beckert M. Optimisation of maize microspore isolation and culture conditions for reliable plant regeneration// Plant Cell Reports. 1991. Vol. 10. P. 55-58.

11. Mordhorst A.P., Lörz H. Embryogenesis and development of isolated barley (*Hordeum vulgare L.*) microspores are influenced by the amount and composition of nitrogen sources in culture media// J. Plant Physiol. 1993. Vol. 142. P. 485-492.

12. Jähne A., Becker D., Brettschneider R., Lörz H. Regeneration of transgenic, microspore-derived, fertile barley// Theor Appl Genet. 1994. Vol. 89. P. 525-533.

13. Cho M.S., Zapata F.J. Plant regeneration from isolated microspore of indica rice// Plant Cell Physiol. 1990. Vol. 31. P. 881-885.

Национальная академия наук Беларуси

14. Hu T.C., Ziauddin A., Simion E., Kasha K.J. Isolated microspore culture of wheat (*Triticum aestivum L.*) in a defined media: I. Effects of pretreatment, isolation methods and hormones// *In Vitro* Cell Dev. Biol. 1995. Vol. 31. P. 79-83.

15. Gustafson V.D., Baenziger P.S., Wright M.S., Stroup W.W., Yang Yen Isolated wheat microspore culture// Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 1995. Vol. 42. P. 207-213.

16. Puoliomatka M., Laine S., Pauk J. Effect of ovary co-cultivation and culture medium on embryogenesis of directly isolated microspores of wheat// Cereal Res. Com. 1996. Vol. 24. P. 393-400.

17. Tuvesson D.I.K., Öhlund R.Ch.V. Plant regeneration through culture of isolated microspores of Triticum aestivum L.// Plant Cell And Organ Culture. 1993. Vol. 34. P. 163-167.

18. Mejza S.J., Morgant V., DiBona D.E., Wong J.R. Plant regeneration from isolated microspores of Triticum aestivum// Plant Cell Reports. 1993. Vol. 12. P. 149-153.

19. Touraev A, Pfosser M, Vicente O, Heberle-Bors E. Stress as the major signal controlling the developmental fate of tobacco microspores: towards a unified model of induction of microspore/pollen embryogenesis// Planta. 1996 Vol. 200. P. 144–152.

20. Саратова Т. Н. Некоторые генотипические и онтогенетические особенности реакции кукурузы в культуре пыльников // Цитология и генетика. 1997. Т. 31. № 3. С. 60-64.

21. Chuang C., Ouyang T.W., Chou S.M., Ching C.K. A set of potato medium for wheat anther culture// In: Proc. Symp. Plant Tissue Culture (Peking/:Sci. Press). 1976. P. 51-56.

22. Wang P., Chen Y.R. A study of the application of C17 medium for anther culture// Acta Botanica Sinica. 1986. Vol. 28. P. 38-45.

23. Орлов П.А., Маврищева Е.Б., Палилова А.Н. Взаимодействие генома и плазмона при индукции морфогенетических реакций растений пшеницы в культуре пыльников// Генетика. 1995. Т. 31, N 2. С. 333-336.

24. Orlov P.A., Becker D., Shewe G., Lörz H. Cytoplasmic effects on pollen embryogenesis induction in wheat microspore culture// Cereal Res. Comm. 1999. Vol. 27. N 4. P. 357-363.

25. Орлов П.А. Взаимодействие ядерных и цитоплазматических генов в детерминации развития растений. Мн., 2001. 170 с.

26. Kudirka D.T., Schaeffer G.W., Baenziger P.S. Wheat: genetic variability through anther culture./ Biotechnology in agriculture and forestry. (Ed. Bajaj Y.B.S.). Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag. 1986. VOL. 2. Crops 1. P. 52-75.

27. Сидоров В.А. Биотехнология растений. Клеточная селекция. Киев: Навукова думка, 1990. 280 с.

28. Salmenkallio-Martilla M., Kauppinen V. Efficient regeneration of fertile plants from protoplasts isolated from microspore culture of barley (*Hordeum vulgare L.*).// Plant Cell Rep. 1995. Vol. 14. P. 253-256.

29. Rossnagel B.G., Kao K.N., Weller J.A. Use of anther culture for rapid transfer of ~~–~~spot-form" net blotch (*Pyrenophora teres f.sp. maculata*) tolerance from six-rowed to two-rowed

Национальная академия наук Беларуси

barley// Canad. J. Plant Sci. 1989. Vol. 69. P. 545.

30. Foroughi-Wehr B., Friedt W. Rapid production of recombinant barley yellow mosaic virus resistant *Hordeum vulgare* lines by anther culture// Theor. Appl. Genet. 1984. Vol. 67. P. 377-382.

31. Wei Z.M. Pollen callus culture in *Triticum aestivum*// Theor. Appl. Genet. 1982. Vol. 63. P. 71-73.

32. Ting Y.C., Yu M., Zheng W.Z. Improved anther culture of maize (*Zea mays*)// Plant Sci. Let. 1981. Vol. 23. P. 139-145.

33. Белинская Е.В., Наумова Л.Н., Манзюк О.Т. Генотипические особенности индукции гаплоидов в культуре пыльников ячменя// Цитология и генетика. 1993. Т. 27. N 5. С. 84-88.

34. Wenzel G., Hoffmann F., Thomas E. Increased induction and chromosome doubling of androgegetic haploid rye// Theor. Appl. Genet. 1977. Vol. 51. P. 81-86.

35. Sunderland N. Strategies on the improvement of yields in anther culture// Proc. Symp. Plant. Tussue. Cult. 1978. P. 65-86.

36. Суханов В.М., Тырнов В.С. Получение гаплоидов *in vitro* из гаметических клеток// Гаплоидия и селекция. М.: Наука. 1976. С. 99-110.

37. Heberle-Bors E. *In vitro* haploid formation from pollen: a critical review// Theor.and Appl. Cenet. 1985. Vol. 71. P. 361-374.

38. Тырнов В.С. Использование гаплоидов в генетических исследованиях// Гаплоидия и селекция. М.: Наука, 1976. С. 140-151.

39. Константинов А.В. Мейоз. Минск, 1971. 180 с.

40. Stirn S., Mordhorst A.P., Fuchs S., Lörz H. Molecular and biochemical markers for embryogenic potential and regenerative capacity of barley (*Hordeum vulgare L.*) cell cultures// Plant Sci. 1995. Vol. 106. P. 195-206.

41. Li H.C., Qureshi J.A., Kartha K.K The influence of different temperature treatments on anther culture response of spring wheat (*Triticum aestivum L.*)// Plant Sci. 1988. Vol. 57. P. 55-61.

42. Kasha H.J., Production of haploids in cereals// In: Current Options for Cereal improvement (Maluszynski M. ed.) Kluwer Academic Publishers. 1989. P. 71-80.

43. Touraev A., Indrianto A., Vicente O., Wratschko O., Heberle-Bors E. Efficient microspore embryogenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.) induced by starvation at high temperature// Sexual Plant Reproduction. 1996. Vol. 9. P. 209–215.

44. Custers J.B.M., Cordewener J.H.G., Nöllen Y., Dons J.J.M., van Lookeren Campagne M.M. Temperature controls both gametophytic and sporophytic development in microspore cultures of *Brassica napus*// Plant Cell Reports. 1994. Vol. 13. P. 267–271.

45. Bárány I., Testillano P.S., Mitykó J., Risueno M.C. The switch of the microspore program in *Capsicum* involves HSP70 expression and leads to the production of haploid plants// International Journal of Developmental Biology. 2001. Vol. 45. P. 39–40.

46. Schmid J., Keller E.R. Effect of gametocide on the induction of haploids in *Triticum aestivum L.*// Genetic Manipulation in Plant

Национальная академия наук Беларуси

Breeding. Walter de Gruyteral Co. Berlin, New-York. 1986. P. 347-349.

47. Суханов В.М. Андроклиния и ее особенности у пшеницы, автореф. дис. ... канд биол. наук:03.00.15/СГУ . М. 1984. 17 с.

48. Obert B., Barnabás B. Colchicine induced embryogenesis in maize// Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 2004. Vol. 77. P. 283–285.

49. Zhao J.P., Simmonds D.H., Newcomb W. Induction of embryogenesis with colchicine instead of heat in microspores of *Brassica napus* L. cv. Topas// Planta. 1996. Vol. 189. P. 433–439.

50. Kyo M., Harada H. Control of the developmental pathway of tobacco pollen *in vitro*// Planta. 1986. Vol. 168. P. 427–432.

51. Reynolds T.L., Kitto S.L. Identification of embryoid-abundant genes that are temporally expressed during pollen embryogenesis in wheat anther cultures// Plant Physiology. 1992. Vol. 100. P. 1744–1750.

52. Zheng M.Y., Liu W., Weng Y., Polle E., Konzak C.F. Culture of freshly isolated wheat (*Triticum aestivum* L.) microspores with inducer chemicals// Plant Cell Reports. 2001. Vol. 20. P. 685–690.

53. de Vries S.C., Booij H., Meyerink P., Huisman G., Wilde H.D., Thomas T.L., van Kammen A. Acquisition of embryogenic potential in carrot cell-suspension cultures// Planta. 1988. Vol. 176. P. 196–204.

54. Nishiwaki M., Fujino K., Koda Y., Masuda K., Kikuta Y. Somatic embryogenesis by the simple application of abscisic acid to carrot (*Daucus carota* L.)// Planta. 2000. Vol. 211. P. 756–759.

55. Ikeda-Iwai M., Umehara M., Satoh S., Kamada H. Stress-induced somatic embryogenesis in vegetative tissues of *Arabidopsis thaliana*// The Plant Journal. 2003. Vol. 34. P. 107–114.

56. Ribnicky D.M., Cohen J.D., Hu W.S., Cooke T.J. An auxin surge following fertilization in carrots: a mechanism for regulating plant totipotency// Planta. 2002. Vol. 214. P. 505–509.

57. Mòl R., Filek M., Machaova I., Matthys-Rochon E. Ethylene synthesis and auxin augmentation in pistil tissues are important for egg cell differentiation after pollination in maize// Plant and Cell Physiology. 2004. Vol. 45. P. 1396–1405.

58. Ouyang J.W., Zhou S.M., Jia S.E. The response of anther culture to culture temperature in *Triticum aestivum*// Theor. Appl. Genet. 1983. Vol. 66. P. 101-109.

59. Lasar M.D., Schaeffer G.W., Baenzinger P.S. The physical cultivar environment in relation to high frequency callus and plantlet development in anther cultures of wheat (*Triricum aestivum L.)* cv. Chris// Plant Physiol. 1985. Vol. 121. P. 103-109.

60. Prakash J., Giles H.L. Induction and Growth of Androgenic Haploids// Int. Rev. of Cytol. 1987. Vol. 107. P. 273-292.

61. Горбунова В.Ю., Круглова Н.Н., Батыгина Т.Б. Андрогенез в культуре изолированных пыльников злаков: цитолого-эмбриологические аспекты// Успехи современной биологии. 1993. Т. 113. N 1. С. 19-35.

62. Gresshoff P.M., Doy C.H. Zea mays: Methods of diploid callus culture and the subsequent differentiation of

Национальная академия наук Беларуси

various plant structures// Z. Pflanzen. Physiol. 1974. Vol. 73. P. 132-1377.

63. Imamura J., Harada H. Effects of abscisic acid and water stress on the embryo and plantlet production in anther culture of *Nicotiana tabacum* cv Samsun// Z. Pflanzenphysiol. 1980. Vol.100. P. 285-289.

64. van Bergen S., Kottenhagen M.J., van der Meulen R.M., Wang M. The role of abscisic acid in induction of androgenesis: a comparative study between *Hordeum vulgare L.* cvs Igri and Digger// Journal of Plant Growth Regulation. 1999. Vol. 18. P. 135–143.

65. Hoekstra S., van Bergen S., van Brouwershaven I.R., Schilperoort R.A., Wang M. Androgenesis in *Hordeum vulgare* L.: effects of mannitol, calcium and abscisic acid on anther pretreatment// Plant Science. 1997. Vol. 126. P. 211–218.

66. Hirt H. Connecting oxidative stress, auxin and cell cycle regulation through a plant mitogen-activated protein kinase// Proc. Natl. Acad. Sci., USA. 2000. Vol. 14. P. 2405-2407.

67. Macnicol P.K., Jacobsen J.V. Regulation of alcohol dehydrogenase gene expression in barley aleurone by giberellin and abscisic acid// Physiologia Plantarum. 2001. Vol. 111. P. 533–539.

68. Maraschin S.F., Lamers G.E.M., de Pater B.S., Spaink H.P., Wang M. 14-3-3 isoforms and pattern formation during barley microspore embryogenesis// Journal of Experimental Botany. 2003. Vol. 51. P. 1033–1043.

69. Maraschin S.F., Caspers M., Potokina E., Wülfert F., Corredor M., Graner A., Spaink H.P., Wang M. Androgenic switch in barley microspores. II. cDNA array analysis of stress-induced gene expression in barley androgenesis// PhD thesis, Leiden University. 2005. The Netherlands.

70. Indrianto A., Barinova I., Touraev A. Heberle-Bors E.. Tracking individual wheat microspores *in vitro*: identification of embryogenic microspores and body axis formation in the embryo// Planta. 2001. Vol. 212. P. 163–174.

71. Zhao J.P., Newcomb W., Simmonds D. Heat-shock proteins 70 kDa and 19kDa are not required for induction of embryogenesis of *Brassica napus* L. cv. Topas// Plant and Cell Physiology. 2003. Vol. 44. P. 1417–1421.

72. Binarova P., Hause G., Cenklóva V., Cordewener J.H.G., van Lookeren Campagne M.M. A short severe heat shock is required to induce embryogenesis in late bicellular pollen of *Brassica napus* L.// Sexual Plant Reproduction. 1997. Vol. 10. P. 200–208.

73. Wallin M., Stromberg E. Cold-stable and cold-adapted microtubules// International Review of Cytology. 1995. Vol. 157. P. 1–31.

74. Sopory S.K., Munchi M. Anther culture/ In: Monhanjain S.M., Sopory S.K., Veilleux R.E., eds. *In vitro* haploid production in higher plants. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1996. P. 145–176.

75. Gervais G., Newcomb W., Simmonds D.H. Rearrangement of the actin filament and microtubule cytoskeleton during induction of microspore embryogenesis in *Brassica napus* L. cv. Topas// Protoplasma. 2000. Vol. 213. P. 194–202.

76. Mordhorst A.P., Toonen M.A.J., de Vries S.C. Plant

Национальная академия наук Беларуси

embryogenesis// Critical Reviews in Plant Sciences. 1997. Vol. 16. P. 535–576.

77. Touraev A., Vicente O., Heberle-Bors E. Initiation of microspore embryogenesis by stress// Trends in Plant Science. 1997. Vol. 2. P. 297–302.

78. Reynolds T.L., Crawford R.L. Changes in abundance of an abscisic acid-responsive, early cysteine-labeled metallothionein transcript during pollen embryogenesis in bread wheat (*Triticum aestivum*)// Plant Molecular Biology. 1996. Vol. 32. P. 823–826.

79. Reynolds T.L. Effects of calcium on embryogenic induction and the accumulation of abscisic acid, and an early cysteine-labeled metallothionein gene in androgenic microspores of *Triticum aestivum*// Plant Science. 2000. Vol. 150. P. 201–207.

80. Kyo M., Miyatake H., Mamezuka K., Amagata K. Cloning of cDNA encoding NtPEc, a marker protein for the embryogenic differentiation of immature tobacco pollen grains cultured *in vitro*// Plant and Cell Physiology. 2000. Vol. 41. P. 129–137.

81. Lee E.J., Koizumi N., Sano H. Identification of genes that are up-regulated in concert during sugar depletion in *Arabidopsis*// Plant, Cell and Environment. 2004. Vol. 27. P. 337–345.

82. Beers E.P., Jones A.M., Dickerman A.W. The S8 serine, C1A cysteine and A1 aspartic protease families in Arabidopsis. Phytochemistry. 2004. Vol. 65. P. 43–58.

83. Smalle J., Vierstra R.D. The ubiquitin 26S proteasome proteolytic pathway// Annual Review of Plant Biology. 2004. Vol. 55. P. 555–590.

84. Thibaud-Nissen F., Shealy R.T., Khanna A., Vodkin L.O. Clustering of microarray data reveals transcript patterns associated with somatic embryogenesis in soybean// Plant Physiology. 2003. Vol. 132. P. 118–136.

85. Mitsushashi W., Yamashita T., Toyomasu T., Kashiwagi Y., Konnai T. Sequential development of cysteine proteinase activities and gene expression during somatic embryogenesis in carrot// Bioscience, Biotechnology and Biochemistry. 2004. Vol. 68. P. 705–713.

86. Smykal P., Pechan P.M. Stress, as assessed by the appearance of sHsp transcripts, is required but not sufficient to initiate androgenesis// Physiologia Plantarum. 2000. Vol. 110. P. 135–143.

87. Vrienten P.L., Nakamura T., Kasha K.J. Characterization of cDNAs expressed in the early stages of microspore embryogenesis in barley (*Hordeum vulgare*) L.// Plant Molecular Biology. 1999. Vol. 41. P. 455–463.

88. Marrs K.A. The functions and regulation of glutathione *S*-transferases in plants// Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology. 1996. Vol. 47. P. 127–158.

89. Raghavan V. Distribution of poly(A) RNA during normal pollen development and during induced embryogenesis in *Hyoscyamus niger*// J. Cell Biol. 1981. Vol. 89. P. 593-606.

90. Pechan P.M., Bartels D., Brown D.C.W., Schell J. Messenger-RNA and protein changes associated with induction of *Brassica* microspore

Национальная академия наук Беларуси

embryogenesis// Planta. 1991. Vol. 184. P. 161–165.

91. Boutilier K., Offringa R., Sharma V.K., *et al*. Ectopic expression of BABY BOOM triggers a conversion from vegetative to embryogenic growth// The Plant Cell. 2002. Vol. 14. P. 1737–1749.

92. Maraschin S.F., de Priester W., Spaink H.P., Wang M. Androgenic switch: an example of plant embryogenesis from the male gametophyte perspective// Journal of Experimental Botany. 2005. Vol. 56. P. 1711-1726.

93. Perry S.E., Lehti M.D., Fernandez D.E. The MADS-domain protein AGAMOUS-like 15 accumulates in embryonic tissues with diverse origins// Plant Physiology. 1999. Vol. 120. P. 121–129.

94. Harada J.J. Role of *Arabidopsis LEAFY COTYLEDON* genes in seed development// Journal of Plant Physiology. 2001. Vol. 158. P. 405–409.

95. Zuo J., Niu Q.W., Frugis G., Chua N.H. The *WUSCHEL* gene promotes vegetative-to-embryonic transition in *Arabidopsis*// The Plant Journal. 2002. Vol. 30. P. 349–359.

96. Baudino S., Hansen H., Brettschneider R., Hecht V.F.G., Dresselhaus T., Lörz H., Dumas C., Rogowsky P.M. Molecular characterisation of two novel maize LRR receptor-like kinases, which belong to the *SERK* gene family// Planta. 2001. Vol. 213. P. 1–10.

97. Magnard J.L., Le Deunff E., Domenech J., Rogowsky P.M., Testillano P.S., Rougier M., Risueño M.C., Vergne P., Dumas C. Genes normally expressed in the endosperm are expressed at early stages of microspore embryogenesis in maize// Plant Molecular Biology. 2000. Vol. 44. P. 559–574.

98. Jürgens G. Apical–basal pattern formation in *Arabidopsis* embryogenesis// EMBO Journal. 2001. Vol. 20. P. 3609–3616.

99. Friml J., Vieten A., Sauer M., Weijers D., Schwarz H., Hamann T., Offringa R., Jürgens G. Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of *Arabidopsis*// Nature. 2003. Vol. 426. P. 147–153.

100. Bonet F.J., Olmedilla A. Structural changes during early embryogenesis in wheat pollen// Protoplasma. 2000. Vol. 211. P. 94–102.

101. Hause B., van Veenendaal W.L., Hause G., van Lammeren A.A. Expression of polarity during early development of microspore-derived and zygotic embryos of *Brassica napus* L. cv Topas// Botanica Acta. 1994. Vol. 107. P. 407–415.

102. Testerink C., van der Meulen R.M., Oppedijk B.J., de Boer A.H., Heimovaara-Dijkstra S., Kijne J.W., Wang M. Differences in spatial expression between 14-3-3 isoforms in germinating barley embryos// Plant Physiology. 1999. Vol. 121. P. 81–87.

103. Maraschin S.F., Vennik M., Lamers G.E.M., Spaink H.P., Wang M. Time-lapse tracking of barley androgenesis reveals position-determined cell death within pro-embryos// Planta. 2005. Vol. 220. P. 531–540.

104. Wang M., van Bergen S., Lamers G.E.M., Oppedijk B.J., Schilperoort R.A. Programmed cell death during androgenesis in *Hordeum vulgare L.*/ In: –Anther and pollen: from biology to biotechnology”.

Национальная академия наук Беларуси

Sprigler-Verlag, 1999. P. 201-210.

105. Bozhkov P.V., Filonova L.H., Suarez M.F., Helmersson A., Smertenko A.P., Zhivotovsky B., von Arnold S. VEIDase is a principal caspase-like activity involved in plant programmed cell death and essential for embryonic pattern formation// Cell Death and Differentiation. 2004. Vol. 11. P. 175–182.

106. Suarez M.F., Filonova L.H., Smertenko A., Savenkov E.I., Clapham D.H., von Arnold S., Zhivotovsky B., Bozhkov P.V. Metacaspase-dependent programmed cell death is essential for plant embryogenesis// Current Biology. 2004. Vol. 14. P. 339–340.

107. Larkin P.J., Scowcroft W.R. Somaclonal variation – a novel source of variability from cell cultures for plant improvement // Theor. Appl. Genet. 1981. Vol. 60. P. 197-214.

108. Evans D.A., Sharp W.R., Medina-Filho H.P. Somaclonal and gametoclonal variation // Amer. J. Bot. 1984. Vol. 71. P. 759-774.

109. Umbeck P.F., Gengenbach B.G. Reversion of male-sterile T-cytoplasm maize to male fertility tissue culture // Crop. Sci. 1983. Vol. 23 P. 584-588.

110. Meins F.J. Heritable variation in plant cell culture // Ann. Rev. Plant Physiol. 1983. Vol. 34. P. 327-346.

111. Гостимский С.А., Багрова А.М., Ежова Т.А. Обнаружение и цитогенетический анализ изменчивости, возникшей при регенерации растений из культуры тканей посевного гороха// Докл. АН СССР. 1985. Т. 283. С. 1007-1011.

112. Исаева Н.А., Бородько А.В. Изучение морфологической изменчивости в растениях-регенерантах ячменя// Цитология и генетика. 1988. Т. 22. С. 27-31.

113. Malepszy S., Nadolska-Orczyk A. *In vitro* culture of Cucumis sativus VII. Variation in the progeny of phenotypically not altered R1 plants // Plant Breed. 1989. Vol. 102. P. 66-72.

114. Tyryshkin L.G., Tyryshkina N.A. Resistance to diseases in wheat collection samples and somaclonal variants// Czech. J. Genet. Plant Breed. 2003. Vol. 39. P. 1-3.

115. Larkin P.J., Ryan S.A., Brettell R.I.S., Scowcroft W.R. Heritable somaclonal variation in wheat // Theor. and Appl. Genet. 1984. Vol. 67. P. 443-455.

116. Levings C.S. III Thoughts on cytoplasmic male sterility in cms-T maize// Plant Cell. 1993. Vol. 5. P. 1285-1290.

117. Rode A., Hartmann C., Dron M., Picard E., Quetier F. Organelle genome stability in anther-derived doubled haploids of wheat (*Triticum aestivum L.,* cv. 'Moisson')// Theor. and Appl. Cenet. 1985. Vol. 71. P. 320-324.

118. Kemble R.J., Yarrow S.A., Wu S.-C., Barsby T.L. Absence of mitochondrial and chloroplast recombinations in *Brassica napus* plants regenerated from protoplasts, protoplast fusions and anther culture// Theor. and Appl. Cenet. 1988. Vol. 75. P. 875-881.

119. Caredda S and Clement C. Androgenesis and albinism in Poaceae : influence of genotype and carbohydrates// In: Anther and pollen. Berlin: Springer-Verlag, 1999. 263 p.

120. Logue S.J. Genetic stability in microspore derived doubled haploids // *In Vitro* Haploid Production in Higher Plants. Eds. Jain S.M., Sopory

Национальная академия наук Беларуси

S.K., Veilleux R.E.. Netherlands: Kluwer, 1996. Vol. 2. P. 1-51.

121. Tuvesson I.K.D., Pedersen S., Andersen S.B. Nuclear genes affecting albinism in wheat (Triticum aestivum L.) anther culture// Theor. and Appl. Cenet. 1989. P. 879-883.

122. Bullock W.P., Baenziger P.S., Schaeffer G.W. et al. Anther culture of wheat (*Triticum aestivum L.*) F1's and Their reciprocal crosses.// Theor Appl Genet. 1982. Vol. 62. P. 155-159.

123. Матвеенко С. Н., Хотылева Л. В., Каминская Л. Н. Генетический анализ эффективности культуры пыльников тритикале *in vitro* // Генетика. 1994. 30, № 9. С. 1238-1243.

124. Анапияев Б.Б. Влияние генотипа на частоту регенерации растений в культуре микроспор Triticum aestivum L.// Генетика. 2000. 36. С. 505-509.

125. Ленивко С.М., Орлов П.А., Хотылева Л.В. Оценка параметров пыльцевого эмбриогенеза у дигаплоидов мягкой яровой пшеницы и их гибридов первого поколения// Материалы международной конференции, посвященной 100-летию со дня рождения Н.В. Тимофеева-Рисовского. Минск, 2000. С. 100-102.

126. Day A., Ellis T.H.N. Deleted forms of plastid DNA in albino plants from cereal anther culture// Current Genetics. 1985. Vol. 9. P. 671-678.

127. Dunford R., Walden R.M. Plastid genome structure and plastid-related transcript levels in albino barley plants derived from anther culture// Curr. Genet., 1991. Vol. 20. P. 339-347.

128. Мозгова Г. В., Орлов П. А., Шалыго Н. В., Трухановец Н. Л. Возможные механизмы альбинизма в культуре пыльников пшеницы// ДАН Беларуси. 2005. Т. 49. № 5. С. 77-80.

129. Мозгова Г.В., Орлов П.А., Шалыго Н.В. Особенности процесса хлорофиллообразования в альбиносных растениях-регенерантах, полученных в культуре пыльников пшеницы// Доклады НАН Беларуси. 2006. Т. 50. № 2. С. 55-58.

130. Mc Hale N.A., Hanson K.R., Zelitch I. A nuclear mutation in Nicotiana sylvestris causing a thiamine - reversible defect in synthesis of chloroplast pigments// Plant. Physiol. 1988. VOL. 88. P. 930-935.

131. Harada T., Sato T., Asaka D., Matsukawa I. Large - scale deletions of rice plastid DNA in anther culture// Theor. Appl. Genet. 1991. VOL. 81. P. 157-161.

132. Ogihara Y., Tsunewaki K. Diversity and evolution of chloroplast DNA in *Triticum* and *Aegilops* as revealed by restriction fragment analysis// Theor. Appl. Genet. 1988. VOL. 76. P. 321–332.

133. Agache A., Bachelier B., Buyser J., Henry Y., Snape S. Genetic analysis of anther culture response in wheat using aneuploid, chromosome substitution and translocation lines// Theor Appl Genet. 1989. Vol. 77. P. 7-11.

134. Козырева О.Г., Дунаева С.Е. Генетика регенерации в культуре *in vitro* злаков// Генетика. 1994. Т. 30. N10. С. 1432- 1440.

135. Vasil I.K. Developing cell and tissue culture systems for the improvement of Cereal and Grass

Национальная академия наук Беларуси

crops// J. Plant Physiol. 1987. Vol. 128. P. 192-218.

136. Mouritzen P., Holm P.B. Chloroplast genome breakdown in microspore cultures of barley (*Hordeum vulgare L.*) occurs primarily during regeneration // Plant Physiol. 1994. Vol. 144. P. 586-593.

137. Brisibe E.A., Olsen A., Andersen S.B. Characterization of anther culture - derived cell suspension exclusively regenerating green plantlets in wheat (*Triticum aestivum L.*)// Euphutica. 1997. Vol. 93. p. 321-329.

138. Kasha K.J., Hu T.C., Oro R., Simion E., Shim Y.S. Nuclear fusion leads to chromosome doubling during mannitol pretreatment of barley (*Hordeum vulgare L.*) microspores// Journal of Experimental Botany. 2001. Vol. 52. P. 1227–1238.

139. Cistué L., Ramos A., Castillo A. M. Influence of anther pretreatment and culture medium composition on the production of barley doubled haploids from model and low responding cultivars// Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 1999. Vol. 55. P. 159–166.

Аннотация

В работе приводятся результаты анализа литературных и собственных данных авторов по проблеме пыльцевого эмбриогенеза. Оцениваются основные направления использования явления пыльцевого эмбриогенеза в фундаментальных и прикладных исследованиях, факторы, определяющие эффективность его индукции, молекулярно-генетические механизмы, лежащие в основе данного явления, основные проблемы его применения и пути их преодоления.

Ключевые слова: пыльцевой эмбриогенез, генетический контроль, молекулярно-генетические механизмы, использование в селекции

Summary

The paper presents the results of the survey of literary and own authors' data on the problem of pollen embryogenesis. Basic trends of using pollen embryogenesis phenomenon in fundamental and applied investigations, factors determining the efficiency of its induction, molecular-genetic mechanisms underlying the given phenomenon, major problems of its application and the ways of their overcoming are estimated.

Национальная академия наук Беларуси

УДК 633.413: 575.234.2 + 631.527.12

ПОЛИПЛОИДИЯ И ГАПЛОИДИЯ В СЕЛЕКЦИИ САХАРНОЙ СВЕКЛЫ (*Beta vulgaris* L.)

А.М.Свирщевская
ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»
Беларусь, 220072, Минск, ул. Академическая, 27
E-mail: A.Svirshchevskaya@igc.bas-net.by

Введение. Уровни плоидности у видов свеклы и первые сведения о ее полиплоидных растениях.

Ботанический род *Beta* L. включает дикорастущие и культурные формы свеклы, в естественных условиях у которых наблюдаются разные уровни плоидности. Гаплоидный набор хромосом равен 9. Сахарная свекла, как и другие представители культурной свеклы (кормовая, столовая, лиственная) характеризуется диплоидным набором хромосом (2n=18). Но среди диких видов встречаются не только диплоиды, но и тетраплоиды – например, *B. corolliflora* (2n=36) и гексаплоиды - *Beta trigyna* (2n=54) [1].

Поскольку полиплоидные формы растений обычно отличаются увеличенным размером репродуктивных органов и более развитой вегетативной массой, то наряду с использованием встречающихся в природе естественных полиплоидов, исследователи получают полиплоидные формы экспериментальным путем. У свеклы известны мейотические полиплоиды и митотические полиплоиды.

Если естественные полиплоиды получаются обычно в ходе оплодотворения в результате сочетания нередуцированных, возникших из-за специфических отклонений в мейозе, гамет, то искусственные - в вегетативной фазе, в результате изменений, вносимых искусственно в митоз. На основании этого и различают способы полиплоидизации. Необходимой предпосылкой для мейотической полиплоидизации является образование и участие в оплодотворении нередуцированных гамет, т.е. гамет с диплоидным набором хромосом. Они могут возникать как в первом, так и втором мейотическом делении. Причины нарушений связывают с влиянием факторов среды - температуры, радиации и т.д.[2а]. Из различных вариантов валентных скрещиваний у сахарной свеклы, наиболее удачными в смысле выделения мейотических тетраплоидов являются комбинации триплоидов между собой (до 20%) и триплоидов с мужской стерильностью (МС) с тетраплоидами [2б].

Первые тетраплоидные (2n=4x= 36) растения сахарной свеклы являлись митотическими полиплоидами и были получены

Национальная академия наук Беларуси

колхицинированием в конце 30-х годов XX века. В начале работ по полиплоидии сахарной свеклы большинство исследователей оптимистично полагали, что такая полиплоидизация (непосредственно увеличением набора хромосом) приведет к значительному повышению ее урожайности.

Однако уже первые испытания полиплоидов сахарной свеклы не подтвердили этих ожиданий. Так, при сравнении тетраплоидов, полученных колхицинированием, с исходными диплоидными сортами, показатели и урожайности и сахаристости корней полиплоидов были ниже, к тому же они имели повышенную чувствительность к заморозкам и были более позднеспелыми, но наличие отдельных тетраплоидных линий, обладающих хорошей энергией роста, свидельствовало о том, что путем отбора можно будет вывести ценный селекционный материал со специфическими свойствами, например, пониженной цветушностью и сниженным числом плодов в клубочках [3].

Непосредственным результатом удвоения хромосом является увеличение объема клеток. Однако увеличение размеров клеток у полиплоидов не обязательно ведет к ожидаемому «гигантизму», т.к. полиплоидные растения, хотя и содержат крупные клетки, но общее число клеток у них обычно меньше, чем у диплоидных растений. Вместе с тем, автополиплоиды всегда имеют сильно сниженную фертильность из-за аномалий в процессе мейоза. Они также характеризуются позднеспелостью по сравнению с исходными диплоидами. Поэтому, если даже отдельные органы становятся более крупными и мощными, то общая продуктивность полиплоидов может уменьшаться по сравнению с продуктивностью диплоидного материала [2в].

Полиплоидия.

Автополиплоидия: получение и характеристика тетраплоидов сахарной свеклы.

Работы, выполненные украинскими, белорусскими, российскими и европейскими исследователями в 60-70 годы прошлого века, позволили обобщить черты, характеризующие тетраплоидные растения сахарной свеклы в сравнении с исходными диплоидными. Они следующие:

1. урожай корней и сбор сахара у тетраплоидов ниже, чем у их диплоидных исходных форм
2. тетраплоиды имеют меньше листьев по сравнению с соответствующими диплоидами, но листья их с более толстой листовой пластинкой и более короткими и утолщенными черешками
3. цветки и семенные клубочки тетраплоидов больше по размерам
4. тетраплоиды образуют меньшее количество пыльцы, и она худшего качества по сравнению с диплоидами

Национальная академия наук Беларуси

Вместе с морфологическими изменениями следуют физиологические изменения:

5. у тетраплоидов более замедленный рост и они требуют более длительного вегетативного периода, чем диплоиды для реализации их потенциала продуктивности.

Цитологические свойства автополиплоидов сахарной свеклы обусловлены тем, что у автотетраплоидов (4x=36) каждая хромосома представлена четырьмя гомологами, характеризуются нарушениями попарной конъюгации хромосом во время мейоза, и у них с высокой частотой образуются квадриваленты, триваленты и унивалеты, что ведет к неправильному распределению гомологичных хромосом в клетке и образованию макро – и микроспор с аномальным числом хромосом – чаще всего на 1 больше или на 1 меньше, чем у 2x=18. Ситуация различается от мейоцита к мейоциту в зависимости от степени спаривания, количества и распределения хиазм. Показано, что хотя унивалеты и триваленты часто приводят к неравному распределению четырех гомологичных хромосом в метафазе первого деления MI, большинство анеуплоидных гамет у сахарной свеклы является результатом неравного расхождения хромосом в квадривалентах. Как следствие, в среднем порядка 45% гамет, продуцируемых эуплоидными 36-хромосомными растениями, являются хромосомно несбалансированными, что негативно сказывается на урожайности автотетраплоидов.

Каковы же теоретические предпосылки, которые дают нам основания ожидать, что полиплоидия открывает новые возможности по сравнению с селекцией на диплоидном уровне? Их, определяющих наследование у автополиплоидов, несколько. Во-первых, благоприятный аллель с дозовым и сильно выраженным индивидуальным эффектом у диплоида может встречаться только в удвоенном состоянии, а у тетраплоида – четырехкратно. Во-вторых, у тетраплоидов возрастает многообразие комбинационных возможностей в связи с тем, что в отношении одного гетерозиготного локуса при двух аллелях (A и a) у тетраплоидов возможны 5 сочетаний генов (AAAA, AAAa, AAaa, Aaaa, aaaa) вместо трех (AA, Aa, aa), которые возможны у диплоидов. Причем, теоретически возможное расширение диапозона изменчивости у тетраплоидов могло бы иметь практическое значение не потому, что в этом случае будет больше генотипов (ведь все разнообразие генотипов никогда не может быть практически реализовано), а потому, что возрастает вероятность проявления генотипов, сильно отличающихся друг от друга. В-третьих, у тетраплоидов в отношении каждого гетерозиготного локуса при наличии двух аллелей возможны 3 гетерозиготных состояния (AAAa, AAaa, Aaaa) вместо одного (Aa) у диплоидов. Соответственно, процент гетерозигот в тетраплоидных популяциях

Национальная академия наук Беларуси

значительно выше, чем в диплоидных, при равновесном состоянии популяции. Более высокая степень гетерозиготности, достигаемая в тетраплоидных популяциях, дает возможность им полнее проявлять гетерозис, а следовательно, иметь более высокий потенциал урожайности [4].

В селекции сахарной свеклы первоначально ставилась задача получить высокоурожайные тетраплоидные сорта, но положительные результаты были достигнуты путем создания триплоидных гибридов, получаемых от скрещивания тетраплоидных форм с диплоидами. Триплоидные гибриды по урожайности, как правило превосходят диплоиды, а диплоиды со своей стороны оказываются по продуктивности выше тетраплоидов.

Ранняя (негибридная) селекция у сахарной свеклы: синтетические сорта – диплоидные синтетики и анизоплоидные синтетики. Триплоидия

Компонентами для диплоидных сортов синтетиков служат более или менее гетерогенные семьи от популяций различного происхождения, созданные на основе отбора в потомствах и линейной селекции. После оценки всех потенциальных компонентов на урожайность, содержание сахара, устойчивость к цветушности и т.д. эти популяции, которые хороши сам по себе, тестируются на общую комбинационную способность (в топ-кроссах,). Чтобы выяснить, какие части популяции лучше комбинируются , необходимо затем оценить их потомство в тест-кроссе в ряду сортоучастков и повторить тест-кроссы в течение 2-3 лет.

Семена анизоплоидных синтетиков (иногда их называют полиплоидными сортами) получаются тогда, когда диплоидные и тетраплоидные семенные растения свеклы располагаются вперемешку и соответственно, свободно переопыляют друг друга. Семена, которые в результате собирают с этих семенных растений, дают смесь из диплоидных, триплоидных и тетраплоидных растений в определенных пропорциях. Поскольку тетраплоиды дают меньшее количество пыльцы, и пыльца эта менее эффективна по сравнению с диплоидной, то растения материнских диплоидных и тетраплоидных компонентов должны быть перемешаны в соотношении 1:3 для того, чтобы получить коммерческие семена, содержащие диплоиды, триплоиды и тетраплоиды в соотношении 25% : 50% : 25% [5а].

Первый в Швеции полигибрид был Hilleshog R poly, в СССР – Белоцерковский полигибрид 1. В Беларуси в создании анизоплоидных синтетиков Белорусский полигибрид 27 и Белорусский полигибрид 31 участвовали ученые Института генетики и цитологии НАН Беларуси – В.Е.Бормотов, Б.Ф.Матросов, Е.А.Бычко.

Национальная академия наук Беларуси

Продуктивность гибридных анизоплоидных сортов в значительной мере зависит от качества тетраплоидных компонентов, наличия у них форм с несбалансированным набором хромосом – анеуплоидов. Выбраковка анеуплоидных форм способствует не только повышению продуктивности, но и значительно улучшает качество семян. Районированные в СССР анизоплоидные сорта содержали от 30 до 50% триплоидов.

Особое значение триплоидной свеклы заключается в значительном снижении отрицательной корреляции меду весом корнеплодов и их сахаристостью, обычно наблюдаемой у диплоидных сортов. Ценными свойствами этих триплоидных гибридов являются их меньшая цветушность и уменьшение количества зародышей на клубочек, что приближает триплоиды многосемянных сортов к односемянным.

Причины, обуславливающие преимущества триплоидов у сахарной свеклы, разными авторами объяснялись по-разному. Одни связывали повышенную продуктивность триплоидов с уровнем плоидности, утверждая, что этот уровень для свеклы наиболее оптимальный, другие рассматривали это свойство как результат проявления гетерозиса и считали, что решающее значение имеет комбинационная ценность родительских популяций – тетраплоидной и диплоидной, от скрещивания которых пролучают триплоидные семена. Селекция триплоидных гибридов сахарной свеклы с этой точки зрения – разновидность гетерозисной селекции. Что касается селекции 3х гибридов, следует считать доказанным, что подбор тетраплоидного и диплоидного компонентов для скрещивания надо проводить главным образом на основании проверки их комбинационной ценности с учетом других агрономически важных признаков, а методика скрещивания должна обеспечивать по возможности увеличение триплоидной фракции, получаемой в семенах.

Основания для гибридной селекции сахарной свеклы. ЦМС.

В производстве диплоидных и анизоплоидных синтетических сортов-популяций стояла задача использовать эффекты гетерозиса, полученные от скрещивания с некоторыми неблизкородственными генотипами. Однако открытие цитоплазматической мужской стерильности (ЦМС) у сахарной свеклы в 1945 году Оуэном сделало возможным делать это более эффективно за счет использования МС линий в производстве простых гибридов и в последние годы гибриды заместили синтетические сорта практически в большинстве стран, производящих сахарную свеклу. Частично эти серьезные перемены произошли потому, что и ЦМС и признак одноростковости семян стали доступными для селекционеров практически в одно и то же время – в конце 50х годов.

Национальная академия наук Беларуси

Оуэн установил, что признак ЦМС у сах свеклы обусловлен действием двух пар рецессивных генов (xxzz) и влиянием стерильной плазмы S. Он различал полностью стерильные растения по этим признакам, а именно (S) xxzz) растения с белыми нерастрескивающимися пыльниками с малым количеством нежизнеспособной пыльцы I типа и два типа полустерильных растений, которые являлись гетерозиготами (S) Xxzz , (S) xxZz и (S) XxZz, при этом II тип растений имел светло-желтые нерастрескивающиеся пыльники с мелкой нежизнеспособной пыльцой, а III тип растений имел светло-желтые нерастрескивающиеся пыльники с мелкой частично жизнеспособной пыльцой.

Фертильные растения Оуэн также разделял на обычные растения с нормальной цитоплазмой N и обоими доминантными генами (N) XXZZ и растения – закрепители стерильности с нормальной цитоплазмой N, но с рецессивными ядерными генами (N) xxzz – так называемые растения О-типа (опылители-закрепители стерильности).

Для получения от мужски стерильного растения потомства, которое само мужски стерильно, ЦМС растения должны быть опылены именно этими растениями закрепителями О-типа, которые несут те же гены стерильности, что и мужски стерильные, но имеют нормальную цитоплазму (N) xxzz. Такие растения с низкой частотой существуют в большинстве свекольных популяций и могут быть идентифицированы только путем тест-скрещивания перспективных О типов с ЦМС растениями. Если все потомство от такого скрещивания мужски стерильное, растение-опылитель из тест кросса является О-типом. Инбредные лини О-типа и их ЦМС аналоги могут быть получены путем повторяюшегося самоопыления идентифицированного О типа и его одновременным повторяющимся бэккроссированием на ЦМС линию. Обычно при свободном скрещивании сахарной свеклы не достигается полного перекрестного опыления и наряду с гибридами получают формы материнского и отцовского типа, что снижает эффект гетерозиса [6].

Источников однорostковости – два, из США и СССР. Американский SLC 101 - самофертильный, обусловлен одним рецессивным геном m. При этом mm - однорostковость, MM и Mm – многорostковость, в проявлении признака задействованы также гены-модификаторы. У Mm меньше многосемянных плодов, чем у MM. Среди односемянных гомозиготных растений могут быть и двусемянные кластеры из-за сегрегации генов, которые привнесены из многосемянного родителя и модифицирующих действие гена m. Ген m не оказывает влияния на урожай или качество корней, но часто проявляется вместе с фасциацией семенников [7]. Источник однорostковости из СССР- полигенный.

Использование в качестве материнского компонента

Национальная академия наук Беларуси

стерильной по пыльце формы дает возможность увеличить количество гибридов и повысить эффект гибридизации.

Методы гибридной селекции и развитие гибридных сортов

а) отбор и получение инбредных закрепителей стерильности (О-типов) и их стерильных аналогов

Производство гибридных семян, которое основано на ЦМС, требует получения инбредных линий генотипа закрепителя. Из этих закрепляющих линий могут быть получены МС линии аналоги путем повторяющихся бэккроссов на растения со стерильной цитоплазмой.

Линии закрепители, или О-типы, должны быть идентифицированы через тест-кроссы с ЦМС растениями. Эти скрещивания могут проводиться в теплице или на поле под изоляторами. Из двух сборов семян тот, который снят с опылителя – результат самоопыления и он используется, чтобы сохранить генотип опылителя, пока скрещивание не будет оценено на мужскую стерильность.

Поскольку сахарная свекла обычно самостерильна, получение инбредных линий О-типа из такого источника популяций может представлять серьезные трудности, поскольку в условиях изоляции самостерильная свекла не завязывает или мало завязывает семена, поэтому такие линии можно поддерживать вегетативным размножением. В последние десятилетия для целей размножения можно эффективно использовать приемы микроклонального размножения в культуре *in vitro*.

Затем продолжают инбридинг О-типов через самоопыление в последующих поколениях, с или без одновременных бэккроссов на линии с ЦМС. Инбридинг сопровождается отбором на жизнеспособность и различные свойства семян. Линии, которые выжили после трех поколений самоопыления, тестируют на комбинационную способность. Если линия хорошая, а ЦМС линию аналог одновременно с инбридингом О-типа не размножали, то тогда необходимо сделать это позже.

Размножение О-типов и МС линий должно проводиться в условиях строгой изоляции. Если изоляция не соблюдается и мужски стерильные растения зацветают раньше растений О-типа, есть вероятность того, что они могут быть опылены чужеродной пыльцой.

Идентификация и получение инбредных О-типов и их ЦМС аналогов – это наиболее трудоемкая и дорогостоящая часть программы гибридной селекции у свеклы. Главная причина этого заключается в том, что О-типов с хорошими технологическими характеристиками и комбинационной способностью очень мало. Генотипы, способные продуцировать выдающиеся гибриды, крайне редки. Ситуация осложнена не только низкой частотой О- типов в популяциях, но и

Национальная академия наук Беларуси

необходимостью того, чтобы материнская форма гибрида была однорostковой. Таким образом, только ограниченная часть генетической изменчивости свеклы доступна в однорostковых популяциях в сравнении с генофондом лучших многорostковых популяций с хорошей урожайностью и качественными показателями.

б) тестирование на комбинационную способность и включение отобранных материалов в гибридные сортопопуляции

Линии, которые выжили после трех поколений самоопыления, тестируют на общую комбинационную способность (ОКС). Семена для этого теста могут быть получены путем размножения каждого инбредного О-типа и его ЦМС аналога вместе с неродственным гибридом или инбредным ЦМС тестером, который известен своей хорошей ОКС. Поскольку один и тот тестер используется для всех О-типов для оценки на ОКС, его можно назвать общим мужски стерильным тестером. Выращиваются растения семенники всех трех форм для свободного переопыления, а завязавшиеся семена собираются строго раздельно. Семена, которые собраны с общего мужски стерильного тестера, используются в полевых испытаниях для оценки ОКС линий О-типа.

Эти новые О-типы с удовлетворительной ОКС могут быть тестированы в скрещиваниях с лучшими существующими ЦМС линиями – тогда это ускорит коммерческое использование самых лучших линий О-типов. На основании результатов этих скрещиваний, лучшие F1 гибридные комбинации с мужски стерильными линиями отбираются и скрещиваются с диплоидными или тетраплоидными опылителями [5б].

Диплоидные и триплоидные гибриды сахарной свеклы

У сахарной свеклы возможны триплоидные и диплоидные типы гибридов. Диплоидные гибриды могут быть созданы несколькими путями с использованием большего или меньшего числа инбредных или открыто пылящих компонентов. У свеклы редко используются только инбредные линии. Чаще всего используют F1 гибрид между инбредной МС линией и неродственным О-типом как материнский компонент и открыто пылящую линию или популяцию как отцовский компонент-опылитель. Причина этого заключается в том, что гибриды от такого опылителя (с широкой генетической основой) дают более стабильные урожаи при различных условиях окружающей среды по сравнению с гибридом от инбредного опылителя. Кроме того, в производстве коммерческих однорostковых гибридных семян необходимо, чтобы только материнская форма была однорostковой и поэтому можно для завершающего скрещивания использовать отличные многорostковые популяции, хотя на практике для лучших

Национальная академия наук Беларуси

коммерческих гибридов используют диплоидные инбредные многоростковые линии.

Триплоидные гибриды в принципе могут быть получены на основе либо диплоидной либо тетраплоидной мужски стерильной материнской формы. В реальности все коммерческие триплоидные гибриды были основаны на скрещивании диплоидных мужски стерильных линий на тетраплоидные опылители.

А для реципроков (тетраплоидные МС-ы х диплоидный опылитель) это заняло много лет, поскольку идентификация и развитие тетраплоидных О-типов через тест кроссы в тетраплоидных популяциях очень сложна. Этого и не было до тех пор, пока хорошие диплоидные однорostковые О-типы и их МС аналоги были получены, что и сделало возможным создание их тетраплоидных версий путем удвоения хромосом и затем использование их для производства триплоидных гибридов. Но таких триплоидов все таки мало.

В двух путях получения триплоидов есть свои положительные и свои отрицательные стороны. Так тетраплоиды дают меньще пыльцы и худшего качества, пылят поздно утром. Диплоидные МС линии и тетраплоидные опылители, растущие вместе быстрее могут быть контаминированы гаплоидной пыльцой, чем тетраплоидные МС линии, растущие вместе с диплоидными опылителями. С другой стороны, очень трудно продуцировать триплоидные однорostковые семена с хорошей прорастающей способностью на тетраплоидных семенниках, и таких 4х МС х 2х опылитель коммерческих гибридов пока нет [5в].

В культуре *in vitro* при эффективном микроразмножении стало возможным получение большого числа клонов из индивидуальных тетраплоидных генотипов, отобранных по специфических признакам и по комбинационной способности, Синтетики, получаемые от переопыления ограниченного числа таких клонов могут быть использованы в качестве опылителей для получения триплоидных гибридов [8].

Гаплоидия.

Способы индукции гаплоидов. Гиногенез in vitro.

Гаплоиды у свеклы могут быть получены в условиях *in vivo* и *in vitro* . В период с 40х по 80е годы XX века в качестве успешных примеров получения гаплоидных растений *in vivo* с помощью различных приемов можно привести:

- колхициновую обработку [9];
- опыление стерильных растений многосемянных диплоидов свеклы пыльцой тетраплоидных опылителей с частотой появления гаплоидов в потомстве 0.26% [10]
- опыление стерильных растений сахарной свеклы пыльцой красной столовой свеклы с частотой появления гаплоидов в потомстве 0.013% [11];

Национальная академия наук Беларуси

- использование гамма-облучения пыльцы в дозах 60 и 100 Krad и опыление ею мужски стерильных растений свеклы и использование для опыления пыльцы генетически отдаленных видов рода *Beta – Beta trigyna* (6x), в этих случаях причем были получены единичные гаплоиды [12].

В начале 80х годов наступила пора интенсивного использования приемов культивирования *in vitro*. Общепринятым является факт безуспешной индукции гаплоидов сахарной свеклы в культуре пыльников или изолированных микроспор, несмотря на то, что опыток было предпринято много [13-16]. С низким выходом в 0,12% на этих культивируемых структурах проэмбриоидов или каллусов при полном отсутствии гаплоидных растений из них и при ответе в виде эмбриоструктур на культивируемых пыльниках только у лишь 15 % генотипов свеклы, исследования в направлении индуцированной гаплоидии в культуре мужских элементов генеративной сферы у этой культуры были прекращены.

В противоположность андрогенетическому пути, техника гиногенеза оказалась значительно более продуктивной для свеклы. Первые растения-регенеранты из цветочных почек и семяпочек были диплоидными и были получены в 1982 г [14]. Хоземан и Боссотро [17] были первыми, кто опубликовал данные об индукции гаплоидных растений сахарной свеклы в культуре неопыленных семяпочек с частотой в 0,23%, что было выше, чем раннее опубликованные данные по технике *in vivo*.

Для целей селекции только удвоенные гаплоиды из самофертильных растений представляют интерес. Тщательно проведенный эксперимент по индукции регенерантов в культуре неоплодотворенных семяпочек из мужски стерильных растений и мужски фертильных показал, что на лучших индукционных вариантах сред было получено в 5 раз больше гаплоидов с мужски стерильных доноров по сравнению с фертильными донорами [18].

Институте генетики и цитологии НАНБ первые гаплоиды сахарной свеклы были получены в 1992 году. На сегодняшний день технология экспериментального гиногенеза включает следующие этапы:

- введение неоплодотворенных семяпочек в культуру *in vitro* и культивирование на индукционной среде;
- получение регенерантов семяпочечного происхождения через эмбриогенез или органогенез;
- анализ уровня плоидности на ранних этапах культивирования *in vitro;*
- размножение вегетативных побегов регенерантов *in vitro;*
- их полиплоидизация *in vitro;*
- индукция корнеобразования у вегетативных побегов *in vito;*
- перевод регенерантов на ионообменные смолы *in vivo;*
- формирование растений первого года вегетации и их оценка;

Национальная академия наук Беларуси

- формирование растений второго года вегетации и их оценка;
- повторные циклы рекультивирования [19].

Считаем целесообразным подчеркнуть, что анализ уровня плоидности на ранних этапах культивирования вегетативных побегов свеклы *in vitro* является необходимыми при создании гомозиготных удвоенных линий, поскольку цитологическое исследование переведенных в грунт растений-регенерантов семяпочечного происхождения на поздних стадиях технологии гиногенеза дает иногда (с частотой 8%) неверное представление о природе формирующихся гиногенетических линий. Так, диплоидное растение–регенерант, полученное в культуре неоплодотворенных семяпочек от диплоидного растения донора может быть изначально гаплоидом (более 90% случаев), и впоследствии сформировать удвоенный гаплоид (УГ), т.е. представлять гомозиготную линию, либо быть исходно диплоидным, т.е. представлять гетерозиготную линию. Чтобы избежать ошибок, рекомендуем использовать цитофотометрическое исследование уровня плоидности в клетках листьев побегов на большой выборке делящихся и неделящихся клеток, а не цитологическое [20].

Многолетние опыты по созданию и отбору лучших по агрономическим показателям самофертильных гиногенетических линий сахарной свеклы в Институте генетики и цитологии НАН Беларуси позволили добиться положительных результатов полевых испытаний, проведенных на Опытной научной станции по сахарной свекле (г.Несвиж), и которые отражены в таблицах 1 и 2. Несмотря на то, что диплоидные линии Янаш КУГ и Белоцерковская 40 (35) РК и их гибриды в 2004 году уступали диплоидному стандарту Белорусской односемянной 69 (таблица 1), приведенные данные демонстрируют неплохие технологические показатели родительских форм и достоверный эффект гетерозиса у гибридов в сравнении с линиями. Из результатов полевых испытаний 2005 года (таблица 2) следует, что гомозиготные гиногенетические линии Янаш СУГ и Янащ КУГ 2 превысили по основным показателям урожайности и сбору сахара диплоидный стандарт Белорусскую односемянную 69 и гетерозиготные гиногенетические линии. Эти фертильные линии следует оценить в скрещиваниях с различными мужски стерильными линиями для последующего отбора лучших гибридных комбинаций, и как сами по себе, так и в качестве компонента гибридов они являются ценным исходным материалом для селекции сахарной свеклы.

Возможности и перспективы использования гаплоидов свеклы.

Поскольку сахарная свекла является одной из основных сельскохозяйственных культур в мире, попытки развития

Национальная академия наук Беларуси

биотехнологий у нее были достаточно интенсивными. Хотя она и считается относительно сложной для культивирования *in vitro* культурой, положительные результаты были опубликованы по регенерации растений из каллусов, в суспензионной культуре и из протопластов, по генетической трансформации сахарной свеклы с помощью *Agrobacterium tumefaciens*, но способность к регенерации у нее является в значительной степени генотип-зависимой. Таким образом, многие *in vitro* технологии применяются у этой культуры, но гаплоидизация сахарной свеклы через культуру пыльников или микроспор оказалась невыполнимой задачей и для получения гаплоидов (2n=x=9) или удвоенных гаплоидов сахарной свеклы в количествах, необходимых для целей селекции, используют значительно более трудоемкую технику культуры семяпочек. Относительно высокая стоимость УГ линии у сахарной свеклы, полученной таким путем экспериментального гиногенеза, является до сих пор одной из основных причин низкой востребованности техники удвоенных гаплоидов для селекции этой культуры. Использование удвоенных гаплоидов в селекции сахарной свеклы фактически может быть сведено до двух основных областей - создания гомозиготных однорostковых линий и фиксации (стабилизации) отдельных признаков, например, устойчивости к ризомании, желтушности вирусного происхождения.Помимо этого, гаплоиды и удвоенные гаплоиды представляют ценность для генетического картирования, как инструменты для исследования генетического разнообразия, в изучении репродуктивной биологии и разного рода биотехнологий.

Несмотря на очевидной преимущество получения 100% гомозиготной однорostковой линии О-типа в один шаг вместо использования трех-четырех поколений для получения достаточно инбредированных линий, использование удвоенных гаплоидных растений сахарной свеклы для целей селекции все еще ограничено. Причинами ограничений использования удвоенных гаплоидов в селекции сахарной свеклы может быть следующее:

1. производство гомозиготных семян ограничивается линиями О-типа, в то время как удвоенные гаплоиды от мужски стерильных растений должны поддерживаться и размножаться вегетативно;
2. УГ линии нуждаются в оценке, в то время как в традиционных селекционных программах оценка и отбор могут частично вестись паралелльно процессу инбридинга;
3. обычно небольшое число УГ линий, полученное в рамках селекционной программы, может отражать только часть потенциальной изменчивости, представленной в генетическом материале и для того, чтобы конкурировать с традиционныи

Национальная академия наук Беларуси

приемами селекции, эффективность техники удвоенных гаплоидов должна быть улучшена;

4. нетщательный отбор в процессе продукции удвоенных гаплоидов может навредить их применению [21].

При условии, что технология экспериментального гиногенеза *in vitro* станет более эффективной и надежной, можно легко спрогнозировать использование в будущем удвоенных гаплоидов в качестве естественного выбора для селекции свеклы или как полностью инбредного компонента в селекционных программах, а также как метод для фиксации желаемых генов.

Заключение

Сахарная свекла, как и другие представители культурной свеклы (кормовая, столовая, лиственная) характеризуется диплоидным набором хромосом (2n=18). Среди диких видов рода *Beta* встречаются диплоиды, тетраплоиды (2n=36) и гексаплоиды (2n=54). Полиплоидные формы сахарной свеклы можно получить экспериментальным путем. В зависимости от способов индукции известны мейотические полиплоиды и митотические полиплоиды.

При сравнении тетраплоидных (автополиплоидных) форм с исходными диплоидными было продемонстрировано, что по урожаю корней, сбору сахара, по количеству листьев и качеству пыльцы тетраплоиды уступают диплоидам, к тому же тетраплоиды требуют более длительного, чем диплоиды, вегетативного периода для реализации их потенциала продуктивности.

В селекции сахарной свеклы первоначально ставилась задача получить высокоурожайные тетраплоидные сорта, но положительные результаты были достигнуты путем создания триплоидных гибридов, получаемых от скрещивания тетраплоидных форм с диплоидами. Триплоидная свекла характеризуется снижением отрицательной корреляции между весом корнеплодов и их сахаристостью, обычно наблюдаемой у диплоидных сортов, у нее меньшая цветушность. Эти преимущества триплоидов сахарной свеклы рассматриваются как результат проявления гетерозиса. Важное значение имеет комбинационная ценность родительских популяций – тетраплоидной и диплоидной, от скрещивания которых получают триплоидные семена. Селеция триплоидных гибридов сахарной свеклы с этой точки зрения представляет собой разновидность гетерозисной селекции.

Ранняя (негибридная) селекция у сахарной свеклы включала создание синтетических сортопопуляций – диплоидных синтетиков и анизоплоидных синтетиков (популяций, состоящих из 2x, 3x, 4x растений). В конце 50х годов XX века наступил этап гибридной селекции этой культуры, основанием для которой явилось открытие ЦМС и признака

Национальная академия наук Беларуси

одноростковости семян свеклы. Методы гибридной селекции включают а) отбор и получение инбредных закрепителей стерильности (О-типов) и их стерильных аналогов и б) тестирование на комбинационную способность и включение отобранных материалов в гибридные сортопопуляции. Таким образом, у сахарной свеклы возможны два типа гибридов – триплоидные и диплоидные в зависимости от уровня плоидности популяций с высокой комбинационной способностью, служащих опылителями материнских диплоидных линий с признаком ЦМС. Идентификация и получение инбредных О-типов и их ЦМС аналогов – это наиболее трудоемкая и дорогостоящая часть программы гибридной селекции свеклы.

Благодаря развитию технологий культивирования *in vitro* стало возможным направленное получение гаплоидных растений сахарной свеклы как основы ускоренного по сравнению с традиционным инбридингом создания у нее гомозиготных линий. Гаплоидная техника экспериментального гиногенеза *in vitro* сахарной свеклы может быть использована в селекции этой культуры для получения гомозиготных закрепителей стерильности и/или диплоидных линий опылителей с полезными фиксированными генами устойчивости. Культура семяпочек в настоящее время рутинно используется в большинстве селекционных компаний и научных институтов Европы, занимающихся сахарной свеклой для получения у нее гаплоидов и удвоенных гаплоидов. Кроме того, гаплоиды и удвоенные гаплоиды представляют ценность для генетического картирования свеклы, как инструменты для исследования ее генетического разнообразия, в изучении репродуктивной биологии и разного рода биотехнологий.

Использование различных полиплоидных (3x, 4x) и гаплоидных/удвоенных гаплоидных (x/xx) форм сахарной свеклы является неотъемлемой частью ее современной селекционной практики.

Национальная академия наук Беларуси

Национальная академия наук Беларуси

Таблица 1.Результаты предварительного сортоиспытания гиногенетических гомозиготных линий, гибридов на их основе и стандартов сахарной свеклы в 2004 г.(Опытная станция по сахарной свекле, г. Несвиж)

Генотип	Урожай-ность, т/га	Сахаристость, %	Сбор сахара, т/га	Калий, мМ/кг	Натрий, мМ/кг	Аммоний ный азот, мМ/кг	Потери сахара в мелассе, %	Вероятный выход сахара на заводе, %	Сбор очищен-ного сахара, т/га
Бел одн. 69 (2х) ст.	48,1	17,8	8,6	54,8	3,8	25,3	2,4	15,4	7,4
Янаш КУГ – родитель Б	36,8	17,8	6,6	60,6	4,0	34,5	2,7	15,1	5,6
Бц 40 (35) РК-родитель А	34,4	17,8	6,1	56,3	4,0	29,3	2,5	15,3	5,3
Б х А гибрид 1	42,0	17,1	7,2	58,4	4,8	34,8	2,7	14,4	6,1
Б х А гибрид 2	41,5	17,6	7,3	57,6	3,4	34,3	2,6	14,9	6,2
Ошибка опыта	1,2	0,2	0,2	1,3	0,1	0,9	0,03	0,2	0,2
НСР 05	3,5	0,4	0,6	3,8	0,4	2,6	0,08	0,5	0,6

Национальная академия наук Беларуси

Таблица 2. Результаты предварительного испытания гиногенетических линий сахарной свеклы и контролей (Опытная научная станция по сахарной свекле НАН Беларуси, г. Несвиж, полевой эксперимент, 2005 год)

Генотип	Густота, тыс. шт/га	Урожайность, т/га	Сахаристость, %	Сбор сахара, т/га	Калий, ммоль/кг	Натрий, ммоль/кг	Вредный азот, ммоль/кг	Потери сахара в мелассе, %	Вероятный выход сахара на заводе, %	Сбор очищенного сахара, т/га	Процент цветушности
Янаш СУГ	95.4	44.8	21.1	9.5	53.3	1.7	17.1	2.1	18.9	8.5	4.7
Янаш КУГ 2	85.6	43.3	20.9	9.1	56.8	1.6	22.5	2.3	18.6	8.1	1.2
Верх 103 ДГ	100.0	38.3	20.6	7.9	52.4	2.2	25.9	2.4	18.3	7.0	6.3
Ган 55-9(2) ДГ	89.6	39.1	20.2	7.9	61.4	2.2	24.5	2.4	17.7	6.9	3.9
Бел.о. 69 (2х) ст.	100.6	40.2	21.0	8.4	52.3	2.0	16.7	2.1	18.9	7.6	-
Кристалл (3х) ст.	108.1	52.4	21.3	11.4	50.2	2.2	16.7	2.1	19.2	10.0	-
Ошибка опыта		1.0	0.2	0.2	1.2	0.1	0.7	0.02	0.2	0.2	
НСР 05		2.8	0.5	0.6	3.4	0.2	2.0	0.06	0.6	0.6	

Обозначения:
СУГ – спонтанно удвоившийся гаплоид, КУГ – удвоенный гаплоид, полученный колхицинированием, ДГ- дигаплоид, т.е. гетерозиготная линия, Верх 103 ДГ – гиногенетическая линия, полученная из семяпочки растения сорта Верхнячская 103, Ган 55 – гиногенетическая лини, полученная из семяпочки растения донора сорта Ганусовская односемянная 55, Бел.о.- сорт Белорусская односемянная 69, ст - стандарт.

Национальная академия наук Беларуси

ЛИТЕРАТУРА

1. Зосимович В.П. Виды дикой и происхождение культурной свеклы. / Биология и селекция сахарной свеклы. М. Издательство «Колос». 1968. стр.7-67.

2. Бормотов В.Е., Загрекова В.Н., Матросов Б.Ф., Щербакова А.М., Семерихина С.Е., Ахраменко А.Д., Купцов Н.С. Исследования по цитогенетике полиплоидных форм сахарной свеклы. Минск, «Наука и техника», 1976. С.111-114 (2а), С.88-97 (2б), С.97-111 (2в).

3. Неговский Н.А. Выведение гетерозисных сортов сахарной свеклы на основе использования полиплоидии. / Биология и селекция сахарной свеклы. М. Издательство «Колос». 1968. С.633-638.

4. Турбин Н.В. Аутополиплоидия: достижения, трудности и перспективы. / Полиплоидия и селекция. Минск. «Наука и техника», 1972. С.18-36.

5. Bosemark N.O. Genetics and Breeding. / The Sugar Beet Crop: Science into Practice. Chapman and Hall. 1993. Chapter 3. P. 89-90 (5а), P. 91-95 (5б), P. 95-101 (5в).

6. Owen F.V. Cytoplasmically inherited male-sterility in sugar beets.// Journal of Agricultural Research. 1945. Vo.71. P. 423-440.

7. Savitsky V.F. A genetic study of monogerm and multigerm characters in beets. // Proceedings of the American Society of Sugar Beet Technologists, 1952 . Vol. 7. P. 156-159.

8. Saunders J.W., Shin K. Germplasm and physiological effects on induction of high-frequency hormone autonomous callus and subsequent shoot regeneration in sugarbeet. // Crop Science, 1986. Vol. 26. P. 1240-1245.

9. Levan A. A haploid sugar beet after colchicines treatment. // Hereditas. 1945. Vol. 31. P. 193-204.

10. Bosemark N.O. Haploids and homozygous diploids, triploids and tetraploids in sugar beet. // Hereditas. 1971. Vol.69. 193-204.

11. Seman I. Possibilities of detection and induction of haploids in *Beta vulgaris* L. // Biologia (Bratislava).1983. Vol.38 (11). P. 1113-1122.

12.Yuce S. Haploidie bei der Zuckerrube. Thesis. Justus Liebig-Universitat, Giesen. 1973.

13. Atanassov A.I., Butenko R.G. Culture of sugar beet isolated anthers. // Fiziol.Biokhim. Kult. Rast. 1980. Vol. 12(1). P. 49-56.

14. Rogozinska J.H., Goska M. Attempts to induce haploids in anther cultures of sugar, fodder and wild species of beet. // Acta Soc. Bot. Poloniae. 1982. Vol. 51(1). P. 233-237.

15.Van Geyt J., D'Halluin K., Jacobs M. *In vitro* production of haploid plants from unpollinated ovules and ovaries of the sugar beet (*Beta vulgaris* L.). Theor. Appl. Genet. 1985. Vol.73. P. 920-925.

16. Herrmann L., Lux H. Antherenkultur bei Zuckerrruben, *Beta vulgaris* L. var. altissima DOLL. // Arch. Zuchtungsforsch. Berlin. 1988. Bd. 18(6) S. 375-383.

17. Hosemans D., Bossoutrot D. Induction of haploid plants from *in vitro* culture of unpollinated beet ovules (*Beta vulgaris* L.) //

Национальная академия наук Беларуси

Z.Pflanzenzuchtg. 1983. Vol. 91.P. 74-77.
18. Hosemans D., Bossoutrot D. In vitro culture of unpollinated beet (*Beta vulgaris* L.) ovules of male sterile and male fertile plants and induction of haploid plants. / The Experimental Manipulation of Ovule Tissues. Longman Inc., New York. pp. 79-88.
19.Svirshchevskaya A.M., Dolezel J. Production and Performance of Gynogenetic Sugarbeet lines. // J. of Sugar Beet Research (USA). October-December, 2000. - Vol.37, N 4. - P.117-133.
20. Svirshchevskaya A.M., Dolezel J. Karyological characterization of sugar beet gynogenetic lines cultured in vitro. // J. of Applied Genetics. - 2001. - Vol. 42, N 1. - P.21-32.
21. Pedersen H.S., Keimer B. Haploidy in sugar beet. / *In Vitro* Haploid Production in Higher Plants. Kluwer Academic Press. 1996. Vol.3. P.17-36.

УДК 633.413: 575.234.2 + 631.527.12

А.М.Свирщевская

Полиплоидия и гаплоидия в селекции сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.). табл.2, библиогр.21, стр.17.

Аннотация

В статье анализируется роль различных полиплоидных форм и гаплоидов гиногенетического происхождения в селекции сахарной свеклы. Сахарная свекла исходно характеризуется диплоидным набором хромосом (2n=2x=18). Полиплоидные формы сахарной свеклы – мейотические и митотические, можно получить экспериментальным путем. Рассмотрены генетические предпосылки, определяющие значение полиплоидов свеклы для целей селекции. В историческом ракурсе излагаются основы селекционного процесса сахарной свеклы и его методы на этапе ранней, негибридной и с конца 50х годов XX века, гибридной селекции. У свеклы возможны два типа гетерозисных гибридов – триплоидные и диплоидные, в зависимости от уровня плоидности (2x или 4x) популяций с высокой комбинационной способностью, служащих опылителями материнских диплоидных линий с признаком ЦМС. Гаплоидная техника экспериментального гиногенеза *in vitro* сахарной свеклы может быть использована в селекции этой культуры для получения гомозиготных закрепителей стерильности и/или диплоидных линий опылителей с

Национальная академия наук Беларуси

полезными фиксированными генами. Приведены данные по технологической оценке линий гиногенетического происхождения, созданных в Институте генетики и цитологии НАНБ.

Показано, что использование различных полиплоидных (3x, 4x) и гаплоидных/удвоенных гаплоидных (x/xx) форм сахарной свеклы является неотъемлемой частью ее современной селекционной практики.

A.M. Svirshchevskaya.

Polyploidy and haploidy in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) breeding

Summary

The role of different polyploid forms and haploids of gynogenetic origin for sugar beet breeding is analysed in the article. Originally sugar beet is characterized by a diploid chromosomes set (2n=2x=18). Sugar beet polyploids (meiotic and mitotic) could be produced in experimental way. Genetic preconditions determining the importance of sugar beet polyploids for breeding are examined in the article. Sugar beet breeding basics and its methods during early non-hybrid breeding and since 50s of the XXth century hybrid breeding are given in historical foreshortening. Two types of heterotic hybrids are possible in sugar beet – triploid and diploid, dependently to the ploidy level (tetraploid or diploid consequently) of populations with high combining ability which serve as pollinators for maternal diploid cytoplasmic male sterile lines. Haploid technique of experimental gynogenesis *in vitro* could be utilized for sugar beet breeding through achievement of homozygous fixing sterility lines and/or diploid pollinating lines with desirable stabilized genes. The data on technological traits assessment of sugar beet gynogenetic lines created at the Institute of Genetics and Cytology, Belarus National Academy of Sciences are given.

It's shown that utilization of 3x and 4x polyploids and haploids/ doubled haploids is an integral part of modern sugar beet breeding practice.

Национальная академия наук Беларуси

УДК 633.11:575.22.015.3:631.527.5

АНЕУПЛОИДИЯ В СЕЛЕКЦИИ ПШЕНИЦЫ (*Triticum aestivum L.*)

М.Н. Шаптуренко, А.П. Яцевич, Л.А. Дыленок, Н.В. Анисимова,
Л.И. Куделко, Л.В. Хотылева
ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»
Беларусь, 220072, Минск, ул. Академическая, 27
E-mail: genet@biobel.bas-net.by

Введение

Мягкая пшеница, как ценный источник пищевых ресурсов для населения, занимает особое место в генетических исследованиях злаков. Несмотря на значительные достижения селекционеров и наличие большого числа высокоурожайных сортов существуют проблемы, которые требуют дополнительных усилий ученых, в частности по улучшению качества зерна, повышению зимостойкости, устойчивости к полеганию, болезням и вредителям. Достигнутое за последние десятилетие повышение продуктивности пшеницы обеспечено в большей степени оптимизацией агротехнических мероприятий, которые позволяют более полно реализовываться генетическому потенциалу растений. Постепенно происходит истощение наследственного разнообразия пшеницы, которое недостаточно быстро восполняется за счет рекомбинаций и мутаций. При таком положении особое значение приобретает поиск стратегии, ориентированной на расширение генетического пула. Одним из направлений может служить изучение и использование механизмов, способных влиять на уровень рекомбиногенеза и тем самым способствовать расширению генетической изменчивости у пшеницы. Можно предположить, что перспективным в этом отношении будет использование анеуплоидии.

Впервые анеуплоиды пшеницы были получены экспериментальным путем в 1936 г., когда американский ученый Эрнст Сирс начал работу по получению ржано-пшеничных гибридов [1]. В эксперименте он использовал мягкую пшеницу Чайниз Спринг, которая характеризовалась хорошей скрещиваемостью с рожью, и получил два пшеничных гаплоида. В потомстве от опыления одного из них пшеницей возникли моносомики и трисомики, что послужило началом создания серий анеуплодных линий у данного сорта. Э. Сирс создал и подробно описал полные нули-, моно-, три- и тетрасомные серии у пшеницы сорта Чайниз Спринг, которые стали стандартом для цитогенетических исследований мягкой пшеницы.

Использование анеуплоидов для генетических исследований пшеницы проводится в основном по трем направлениям: создание новых серий моносомных линий у перспективных сортов;

Национальная академия наук Беларуси

моносомный анализ качественных и количественных признаков; замещение хромосом. Новые серии моносомных линий создаются для сортов, наиболее приспособленных к определенным климатическим условиям, а также для тех, по которым в дальнейшем предполагается создание замещенных линий.

Сотрудниками лаборатории гетерозиса и генетики количественных признаков Института генетики и цитологии НАН Беларуси в 1967г. от Э.Сирса была получена стандартная серия моносомиков Ч.Спринг, что послужило толчком для начала цитогенетических исследований анеуплоидов в Институте и работы по созданию собственной серии моносомных линий яровой короткостебельной пшеницы Опал [2, 3].

Моносомные линии сорта Опал получали путем возвратных скрещиваний с каждым из моносомиков Чайниз Спринг. Растения Ч.Спринг (♀), моносомные по каждой из 21 хромосом, скрещивали с сортом Опал (♂). В потомстве получили растения двух типов – моносомные (2n-1) и дисомные (2n) по данной хромосоме. Отобранные путем цитологического анализа моносомные растения всех линий скрещивали вновь с сортом Опал (♂), т.е. осуществляли первое возвратное скрещивание или первый беккросс. Затем моносомные растения в каждом поколении скрещивали возвратно с тем же сортом не менее 6 раз до воссоздания отцовского генотипа. Полученное в шестом беккроссе потомство (теоретически на 98%) идентично отцовскому сорту. Исключение составляет унивалентная хромосома, которая была лишена возможности конъюгировать в мейозе и, поэтому является носителем генетического материала материнского сорта.

Работа по созданию серии моносомных линий пшеницы Опал длилась около 10 лет и ознаменовалась успехом. Полученная серия моносомных линий экспонировалась на различных выставках как в бывшем Союзе, так и за рубежом и была зарегистрирована в Европейском обществе по анеуплоидии пшеницы (EWAC).

Изучение моносомных растений Опал и проведенный моносомный анализ F2 позволили локализовать гены ряда важных хозяйственных признаков, изучить влияние генотипа на частоту функционирующих 20-, 21- хромосомных гамет и явление смены унивалента, а также исследовать влияние моносомии и замещения цитоплазмы на формирование признаков яровой пшеницы в онтогенезе [4, 5, 6].

В процессе исследования среди дисомных растений, выщепляющихся в потомстве разных моносомых линий и используемых в качестве контроля при оценке эффекта моносомии, нами были обнаружены некоторые различия в характере проявления количественных и качественных признаков. После отбора и размножения этих растений были получены 2 формы яровой пшеницы, которые превосходили исходный сорт Опал по ряду признаков продуктивности, характеризовались ранним выколашиванием и почти выполненной соломиной [7]. Полагая, что такая

Национальная академия наук Беларуси

изменчивость дисомиков может быть вызвана влиянием цитоплазмы Ч.Спринг, нами был осуществлен перевод моносомной серии Опал с цитоплазмы Ч.Спринг на цитоплазму Опал, путем проведения скрещиваний Опал (♀) × монолиния (♂) и созданы уникальные серии дисомных линий на цитоплазмах Ч.Спринг и Опал.

Изучение влияния цитоплазмы на формирование количественных признаков у моносомных и дисомных линий позволило установить наличие и направленность цитоплазматического эффекта, однако различия среди 42-хромосомных растений сохранились [8].

В результате нами было выдвинуто предположение о том, что выявленная гетерогенность дисомиков обусловлена прохождением растений через анеуплоидное состояние. Несбалансированность генетического аппарата моносомиков в мейозе стимулирует рекомбиногенез. Эуплоидное потомство от самоопыления моносомиков наследует рекомбинантный генетический материал, что обеспечивает его повышенную изменчивость по сравнению с исходным сортом.

Учитывая вышеизложенное, можно ожидать, что анеуплоидное состояние стимулирует рекомбиногенез, вследствие несбалансированности мейоза и ослабления конъюгации. А возникшие в результате новые комбинации генов могут служить источником обогащения генетического разнообразия и быть полезными в гетерозисной селекции.

Создание уникальной серии дисомных линий (рис.1) в лаборатории гетерозиса и генетики количественных признаков ИГЦ НАНБ позволило детально изучить характер изменчивости дисомных линий и перспективы их использования в гетерозисной селекции.

Материалы и методы исследования. Объектом исследований служила полная серия дисомных линий мягкой яровой пшеницы Опал на цитоплазме Опал (21 линия: *1A, 2A, 3A, 4A, 5A, 6A, 7A, 1B, 2B, 3B, 4B, 5B, 6B, 7B, 1D, 2D, 3D, 4D, 5D, 6D, 7D*), полученная на основе серии моносомных линий Опал, созданной в ИГЦ НАНБ (рис.1).

Рисунок 1 - Схема получения дисомных линий Опал

Каждая линия представляет собой потомство 42-хромосомных растений от самоопыления соответствующего моносомика.

Национальная академия наук Беларуси

В процессе работы были проведены сравнительные биохимический, молекулярно-генетический и биометрический анализы экспериментального материала, а также испытания дисомных линий в топкроссе с сортами-тестерами Ленинградка, Родина, Харьковская 8.

Для биохимических исследований белок-ферментных систем использовали электрофорез в твердых носителях: полиакриламидном (ПААГ) и крахмальном (КГ) гелях.

Белковые фракции экстрагировали из средней части верхнего листа 20-дневных растений.

Компонентный состав основных белков анализировали методом электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) в щелочной системе с додецилсульфатом Na (SDS) по методу Laemmli U. [9]. Разделение изоформ пероксидаз выполняли согласно Caruso C. et al. [10] с модификацией, используя в качестве субстрата 4-chlor-1-naphtol. Определение изоформ протеаз проводили по методу Silva I. et al. [11] с модификациями. Градиент создавали, используя амфолиты 4 - 6.5.

Анализировали множественные формы ферментов: IDH (изоцитратдегидрогеназа), AAT (аспартатаминотрансфераза), MDH (малатдегидрогеназа), SDH (сорбитолдегидрогеназа), 6-PGD (6-фосфоглюконатдегидрогеназа), SOD (супероксиддисмутаза), PGM (фосфоглюкомутаза), SKDH (шикиматдегидрогеназа), GDH (глутаматдегидрогеназа), ACP (кислая фосфотаза) в крахмальном геле (КГ). Для выявления множественных форм ферментов гели окрашивали по общепринятым методикам [12].

Для анализа молекулярной гетерогенности ДНК использовали RAPD и RGH (Resistance Gene Homologue) PCR. ДНК выделяли из 7-дневных этиолированных проростков по модифицированному методу Edwards K. et al. [13]. Полимеразную цепную реакцию проводили в амплификаторе «Perkin Elmer». Продукты амплификации с произвольными праймерами разделяли в 2% агорозном геле; продукты RGH PCR – в 6% денатурирующем акриламидном геле на секвенаторе ALFexpress.

Общий математический анализ количественных признаков проводили по стандартным методам вариационной статистики, с использованием программ, разработанных в ИГЦ НАНБ.

Результаты и обсуждение.

В процессе исследований выполнен биохимический анализ гетерогенности дисомных линий.

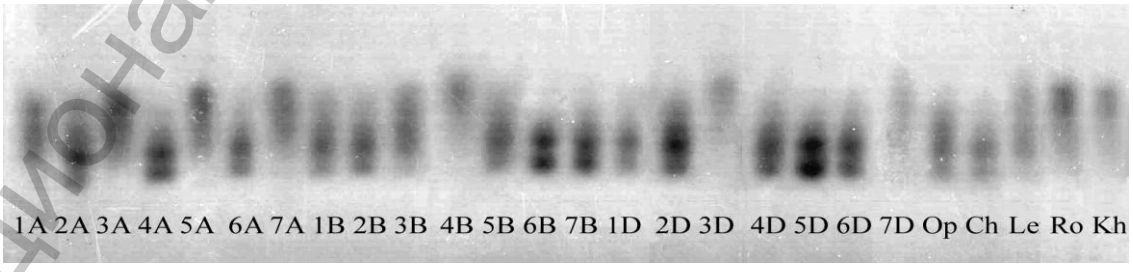


Рис. 2. Электрофореграмма шикиматдегидрогеназы из листьев дисомных линий Опал и сортов (*Op* – Опал, *Ch* – Чайниз Спринг, *Le* – Ленинградка, *Ro* – Родина, *Kh* – Харьковская 8).

Национальная академия наук Беларуси

Сравнительное изучение активности 10 ферментных систем показало, что линии различаются по спектрам 2 систем: SKDH, GDH. Причем, в первом случае полиморфными оказались линии *1A, 3B, 7D* (SKDH–FS), *3A, 5A, 7A, 4B, 3D* (SKDH – S) относительно контроля (Опал, SKDH-F), а во втором только одна – *3A* (GDH-S) (рис. 2). Анализ изоформ протеаз в ПААГ позволил выделить линию *3D*, как носителя полиморфного локуса. Изофокусирование пероксидаз выявило значительное число изоформ, что обусловлено существованием большого числа аллелей, контролирующих эту группу ферментов. Полиморфными оказались спектры линий *2A, 3A, 7A, 5B, 7B, 7D*.

В результате биохимических исследований полной серии дисомных линий полиморфные локусы обнаружены: у пяти *A*-линий (*1A, 2A, 3A, 5A, 7A*), в том числе уникальные (*3A*-GDH, *2A*-пероксидазы), четырех *B*-линий (*3B, 4B, 5B, 7B*) и двух *D*-линий (*3D, 7D*). Причем все дисомики третьей и седьмой гомеологичных групп оказались полиморфными. Наибольшее число полиморфных локусов определено для линии *3A*.

У анализируемых линий на основе RAPD PCR рассмотрено 98 ампликонов, 13 из них полиморфны. Полиморфные локусы определены для четырех *A*-линий (*1A, 4A, 6A, 7A*), четырех *B*-линий (*1B, 2B, 3B, 6B*) и двух *D*-линий (*1D, 3D*) (рис.4), причем два дисомика *1A* (OPW-01) и *2B* (OPX-01) обладают уникальными фрагментами.

Исследование полиморфизма консервативных мотивов гомологов генов устойчивости (RGH PCR) позволило выявить полиморфные локусы у трех *A*- (*4A, 6A, 7A*), одной *B*- (*4B*) и двух *D*-линий (*1D, 5D*).

Таким образом, в результате анализа молекулярной гетерогенности ДНК дискриминированы генотипы 12 линий. Полиморфные локусы определены для четырех *A*- (*1A, 4A, 6A, 7A*), пяти *B*- (*1B, 2B, 3B, 4B, 6B*) и трех *D*-линий (*1D, 3D, 5D*). Дисомики *4A, 6A, 7A* и *1D* полиморфны как по RAPD-, так и по выявленным RGH- локусам.

Анализ молекулярной гетерогенности серии дисомных линий Опал методами биохимического и ДНК-анализов показал, что линии различаются между собой и отличаются от исходного сорта Опал как по белок-ферментным системам, так и по ДНК-маркерам. Причем различия проявляются в зависимости от принадлежности исходного моносомика к конкретному геному. Наиболее полиморфными оказались *A*- и *B*-дисомики (дискриминированы все линии), наименее – *D*-дисомики (дискриминировано четыре линии). Полученные данные согласуются с выполненными ранее исследованиями по эволюции пшеницы, в которых обнаружена неодинаковая частота рекомбинаций в геномах.

По мнению Ларсена Дж. [Larsen J., 1973] геном D в этом отношении, затронут меньше всего, наибольшей частоты рекомбинации достигают в A- и B- геномах. Возможно, у анеуплоидов скорость ре-

Национальная академия наук Беларуси

комбиногенеза неодинакова и может быть связана с их принадлежностью к тому или иному геному и гомеологичной группе. На наш взгляд наиболее интересны перестройки, затрагивающие D-геном, поскольку именно здесь локализованы основные гены, контролирующие продуктивность и сопряженные с ней признаки.

Биометрический анализ включал исследование изменчивости количественных признаков дисомных линий и оценку их комбинационной способности, с целью создания оптимальной модели, позволяющей прогнозировать ценность исходного селекционного материала.

В ходе сравнительного анализа полной серии дисомных линий определены существенные различия по характеру варьирования количественных признаков (табл.1.). У D- линий границы вариационного ряда значительно шире, чем у A- и B- дисомиков. В зависимости от анализируемого признака диапазон изменчивости D- линий превосходит A-линии на 2.7 - 9.5 %, B-линии на 1.3 – 9.6 %. В большинстве случаев A- дисомики характеризуются наименьшей изменчивостью, тогда как B- дисомики имеют средние показатели коэффициента варьирования и, как правило, не превосходят D- линии.

Анализ комбинационной ценности полной серии дисомных линий яровой пшеницы Опал показал, что дисомики различаются между собой и отличаются от контроля, как по эффектам общей, так и вариансам специфической комбинационной способности (рис.3). Выявлены общие закономерности, в зависимости от принадлежности линий к тому или иному геному. Так, *D*-дисомики характеризуются высокими положительными оценками эффектов ОКС ($\hat{g}_i$) по основным элементам продуктивности (МЗР, МТЗР, ЧЗР, МТЗК, МЗК, ЧЗК), тогда как *A*-дисомики – отрицательными. *B*-линии занимают промежуточное положение, с преобладанием положительных оценок $\hat{g}_i$. Причем тенденции сохраняются в пределах всех гомеологичных групп, за исключением пятой.

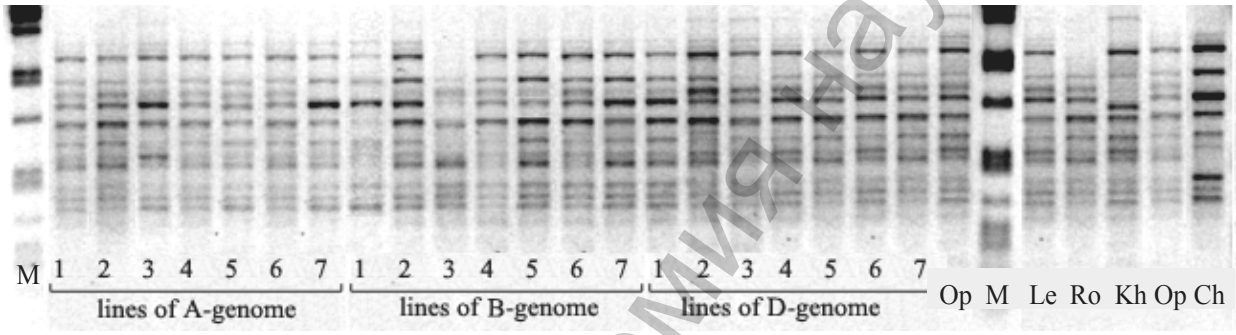


Рисунок 3 - Амплификация с праймером OPW-02 (Op – Опал, M – маркер молекулярного веса, Le – Ленинградка, Ro – Родина, Kh – Харьковская 8, Ch – Чайниз Спринг)

Национальная академия наук Беларуси

Наиболее контрастными по комбинационной ценности оказались дисомики третьей гомеологичной группы. Так эффекты ОКС ными оценками $\hat{g}_i$. В пределах этой группы подобная тенденция наблюдается и по вариансам СКС (σ^2_{si}). Однако, в данном случае вы-

Таблица 1. Характер варьирования (CV, %) количественных признаков среди дисомиков по геномам.

Линии	МЗК	ЧЗК	ДК	ПлК	ЧЗ/К	МТЗР	ЧЗР	ПК	ВР
***A*-линии**	13.92	9.19	3.47	3.50	7.97	9.54	11.96	9.31	5.19
B-линии	19.23	12.55	4.52	5.24	10.31	10.08	14.39	17.53	3.30
D-линии	22.97	11.86	10.68	10.77	12.12	12.54	19.72	18.85	8.45
Общее	18.17	10.73	7.63	7.30	9.89	10.36	15.08	16.05	6.03

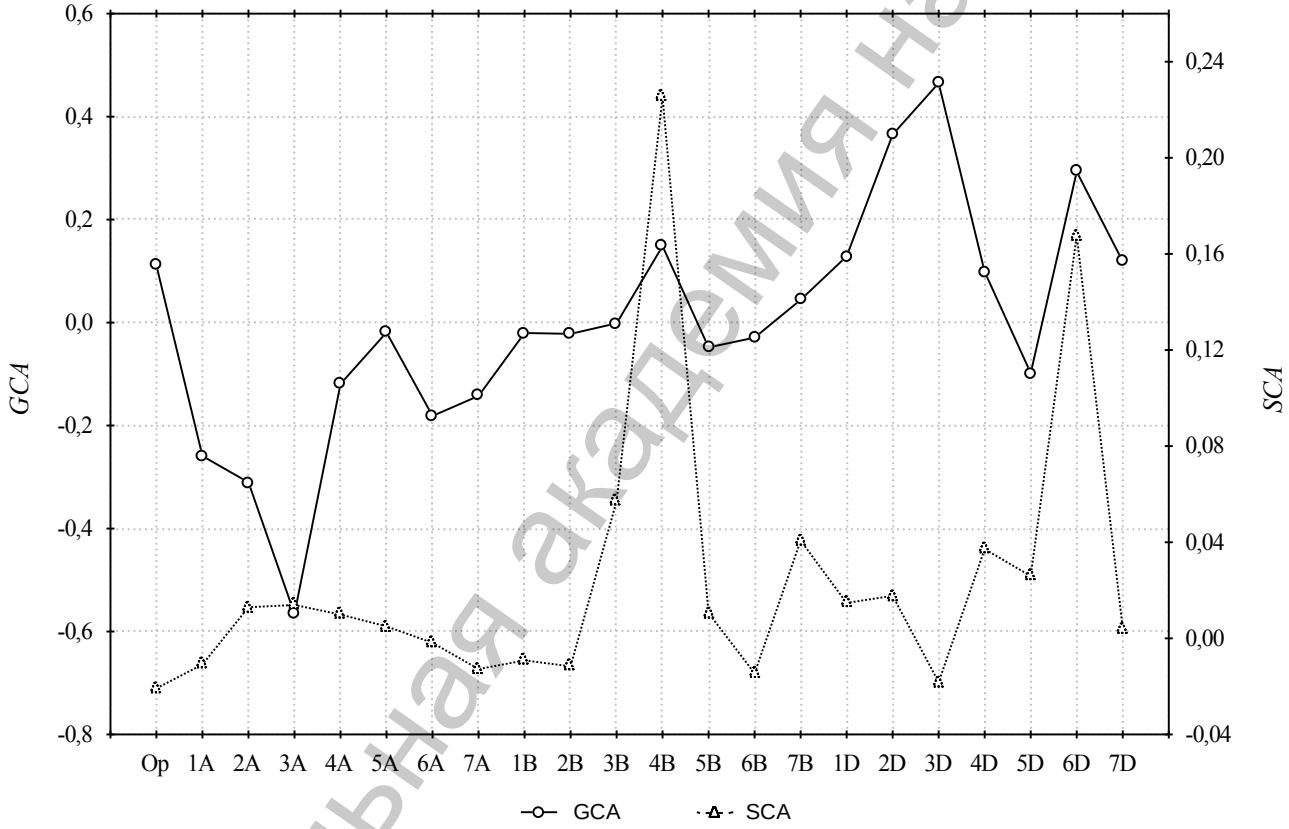


Рис.4. Эффекты общей (*GCA*) и вариансы специфической (*SCA*) комбинационной способности дисомных линий по признаку масса зерна растения.

линии *3D* по ряду признаков принимают высокие положительные значения, тогда как линия *3A* характеризуется низкими негативсокие положительные значения σ^2_{si} соответствуют *A*-дисомику, отрицательные – *D*-дисомику.

Национальная академия наук Беларуси

Дисомные линии пятой гомеологичной группы не вписываются в общую закономерность, оценки эффектов ОКС линий *5A* и *5D* по ряду признаков (исключая ЧЗР) не имеют существенных отличий. Отмечено также схожее поведение их вариансСКС.

Наиболее перспективными в селекционном отношении являются *D*-линии *(1D, 2D, 3D, 4D, 6D, 7D*), которые в большинстве характеризуются высокой комбинационной ценностью и устойчиво передают потомству высокую продуктивность. Хорошим генетическим потенциалом обладают также некоторые *B*-дисомики (*3B, 4B, 7B*).

Испытания полной серии дисомных линий в топкроссе позволили выявить комбинации с высокой степенью гетерозиса по элементам продуктивности (табл. 2). Наибольшие эффекты наблюдались при гибридизации с тестерами Ленинградка (Л) и Харьковская 8 (Х.8). По признаку масса зерна растения ряд гибридов достоверно превосходил родителей на 10 - 55%. В шести комбинациях скрещивания с участием *D*- и *B*- линий гибриды превзошли лучшего родителя по МЗР более чем на 30%: *4B× X.8* и *6D × Л* оказались продуктивнее родителей на 55.3% и 44.6% соответственно, *1D× X.8 , 4D× X.8, 7B× X.8, 3D× Л* на 30-34% . В гибридных комбинациях, с участием *D*- и *B*- линий величина гетерозиса по МЗР достигла 20-30%. На этом уровне представлено потомство F_1, полученное от скрещиваний: *2D× Л* и *3D× X.8, 5B× X.8.* Четыре гибрида, полученные с участием *D- (2D×P, 7D× Л), B- (6B×X.8)* и *A*- линий (*5A×X.8*) превзошли лучшего родителя по этому признаку на 10-20% . В остальных комбинациях статистически значимых эффектов не обнаружено.

Таким образом, достоверно высокие значения гетерозиса по МЗР определены для гибридов, полученных в топкроссе с участием: шести *D*- линий (*1D, 2D, 3D, 4D, 6D, 7D),* четырех *B*- линий (*4B, 5B, 6B, 7B)* и одной *A*-линии 5 гомеологичной группы. Наиболее эффективным оказалось использование в гибридизации дисомиков *2D* и *3D*: статистически достоверный гетерозис получен в комбинациях *2D × Л* (21.81%) и *3D × Л* (30.1%); *2D × P* (14.6*%), 3D × X.8* (25.8%).

Следует отметить гибрид *3A × X.8*, который, показав существенные (11.1 %) гетерозисные эффекты по массе 1000 зерен, оказался по массе зерна растения на 21.1% хуже худшего из родителей в основном за счет слабой озерненности колоса. Наибольшие гетерозисные эффекты по МЗР (55.3 %) определены для *4B × X.8*, где продуктивность обеспечена не только хорошей выполненностью зерна, но и высокой способностью к вторичному стеблеобразованию, главным образом дополнительных продуктивных побегов и их хорошей озерненностью.

Национальная академия наук Беларуси

Таблица 2. Эффекты гетерозиса (%) гибридов F_1 дисомных линий по признакам продуктивности

♀ \ ♂	Харьковская 8			Ленинградка			Родина		
	МЗР	ЧЗР	МТЗР	МЗР	ЧЗР	МТЗР	МЗР	ЧЗР	МТЗР
1A	-	- 0.6	+2.12	-	-	+3.2*	-	-7.5	-
2A	-	- 4.2	+5.83	-1.3	-11.7	+2.1	-	-8.5	-
3A	-21.1*	-28.3**	+10.6**+	-2.3	-16.4*	-	-	-12.3	-
4A	-	-	6.2	+3.7	-	-	-	-	-
5A	+18.1	1.0	+13.8**	+7.8	+7.0	-	-	-12.1	-
6A	+1.0	-	+14.1**+	-	-1.3	+0.8	-	-	-
7A	+7.1	-	9.9*	+0.1	-	-	-	-11.1	-
1B	+9.6	-	+1.3	+8.9	-	+13.5**	-	-8.7	-
2B	-0.3	- 3.9	+11.1*	+1.5	-9.9	+13.5**	-	-7.6	+0.2
3B	-	- 3.5	+4.9	+1.1	-	+6.2	+2.4	+5.1	-
4B	+55.3**	+25.8**	+13.2**+	-	-3.3	+6.9	-	-	-
5B	+22.4*	-	18.1**+	+0.1	-	+10.0*	-	-10.3	-
6B	+16.9**	-	9.8*	+2.2	-1.4	+20.3**	-	-4.2	-
7B	+30.7*	+ 5.4	+12.5**	+7.3	-	+9.4*		-	-
1D	+34.1*	+12.3	+2.3	+7.8	-	+12.6**	-	-	-
2D	+ 9.6	+ 4.8	+3.9	+21.8*	+6.5	+14.0**	+14.7*	+6.2	+1.6
3D	+25.9*	+18.3*	+5.9*	+30.1*	+14.2	+12.4**	+7.6	+6.3	-
4D	+32.2*	+ 9.7	+9.1*	-	-7.6	+12.6**	-	-4.8	+2.7
5D	- 1.5	- 2.7	-	-	-	+6.2	-	-	-
6D	+ 5.4	+ 2.2	-	+44.6**	+26.8*	+15.3*	-	-	-
7D	-	- 9.1	+6.6*	+19.2*	+1.8	+11.4**	-4.1	-7.3	-

* P < 0.05, **P < 0.01

(-) – промежуточное наследование

МЗР – масса зерна растения, ЧЗР – число зерен растения, МТЗР – масса тысячи зерен растения

Анализ данных позволяет рекомендовать *D*- и *B*- линии для использования в селекционном процессе, как исходный материал с превосходным запасом генетического потенциала.

При оценке эффекта гетерозиса у топкроссных гибридов F_1 наблюдались некоторые общие закономерности, связанные с принадлежностью исходного моносомика к конкретному геному, что наводит на мысль о направленности рекомбинационных процессов, которые могли иметь место у соответствующих анеуплоидных линий.

В гибридных комбинациях некоторых дисомных линий, проявление гетерозиса совпадало с хромосомной локализацией факторов, контролирующих анализируемый признак. Так, гибрид *4B × X8* проявлял достоверно высокий гетерозис по продуктивной кустистости (20.3 %), при этом некоторыми исследователями [Morris R. et al., 1971] отмечено положительное влияние хромосомы 4B на число продуктивных колосьев. В нашем эксперименте наибольшее число гетерозисных комбинаций было получено с участием *D*-линий, тогда как известно, что именно D-геном вносит основную генетическую компоненту в формирование продуктивности. Гибриды, полу-

Национальная академия наук Беларуси

ченные от дисомика *5А* оказались лучшими среди остальных комбинаций *А*-линий. На этой хромосоме также локализованы факторы, влияющие на продуктивность [Гончаров Н.П., 2002].

Заключение. Результаты исследований свидетельствуют о том, что в генетическом аппарате дисомиков произошли изменения, которые, по нашему мнению, обусловлены прохождением растений через анеуплоидное состояние. Часть изменений может быть обеспечена конъюгацией гомеологичных хромосом в мейозе, вероятность которой в норме невелика.

Очевидно, большинство рекомбинаций возникли на ранних этапах создания серии, что позволило им закрепиться в процессе размножения линий. Анеуплоидный фактор, дестабилизируя геном, способствовал перекомбинации генетического материала, сыгравшей решающую роль в формировании изменчивости дисомных растений и определении их генетического потенциала.

Полученные данные позволяют рассматривать дисомное потомство анеуплоидов, как ценный источник новых генных комбинаций и перспективный селекционный материал.

ЛИТЕРАТУРА

1. Sears E.A. The aneuploids of common wheat/ // Research bulletin University of Missouri college of Agriculture 572. –1954. – 58p.
2. Хотылева Л.В, Дыленок Л.А., Каминская Л.Н., Яцевич А.П. Создание и изучение новых серий моносомных линий яровой пшеницы // Весці АН БССР. Сер.біял. навук. –1977. –С.29
3. Яцевич А.П. Создание серии моносомных линий яровой пшеницы Опал, ее изучение и использование в генетико-селекционных исследованиях // автореферат дис. … канд. биол. наук: 03.00.15. –Минск, 1987. – 15 с.
4. Khotyleva L.V., Dylenok L.A., Jacevich A.P. Studies of flag leaf size and stomatal size and frequency using monosomic lines of spring wheat // EWAC Newsletter. –Cambridge, 1986. –P. 35-38.
5. Дыленок Л.А., Яцевич А.П. Моносомный анализ в генетических исследованиях пшеницы. Мн. 1984. -110с.
6. Хомич Е.А., Анисимова Н.В. Генетические исследования пшеницы с использованием анеуплоидов // Вести АН Беларуси. Сер. биол. наук. –1996. – №1. –С. 68-72.
7. Хотылева Л.В., Дыленок Л.А., Яцевич А.П. Новый метод создания перспективных форм яровой пшеницы // Минск: БелНИИТИ. –1987.
8. Dylenok L.A., Jacevich A.P., Khotyleva L.V., Khomich E.A. Effect of different cytoplasms on nuclear genome expression of Opal monosomic lines // EWAC Newsletter. 1992. P.28-30.
9. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4 //

Национальная академия наук Беларуси

Nature. –1970. –V.227. –P.680-685.
10. Caruso C., Chilosi G., Caporale C., Leonardi L., Bertini L., Magro P. Buonocore. Induction of pathogenesis-related proteins in germinating wheat seeds infected with *Fusarium culmorum* // Plant Science. 1999. V. 140. P. 87–97.
11. Silva I.D, Poirier G.G., Heath M.C. Activation of Cysteine Proteases in Cowpea Plants during the Hypersensitive Response – A Form of Programmed Cell Death // Experimental Cell Research. 1998. V. 245. P. 389–399.
12. Корочкин Л.И., Серов О.Л., Пудовкин А.И., Ароштам А.А., Боркин Л.Я., Малецкий С.И., Полякова Е.В., Манченко Г.П. Генетика изоферментов. М.: Наука, 1977. 275 с.
13. Edwards K., Johnstone C., Thompson C. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA ror PCR analysis // Nucleic Acids Res. – 1991. – Vol.19. – P.1349

Аннотация

Проведен молекулярно-генетический анализ гетерогенности оригинальной серии дисомных линий пшеницы Опал методами биохимической, молекулярной и классической генетики. Получены прямые доказательства существования различий между дисомными линиями на уровне ДНК и белок-ферментных систем.

Показана возможность эффективного использования сбалансированного потомства анеуплоидов в селекции на гетерозис. Дисомные линии обладают неодинаковым генетическим потенциалом, который детерминирован генотипом исходного моносомика и его принадлежностью к конкретному геному.

Полученные данные позволяют рассматривать дисомное потомство анеуплоидов, как ценный источник новых генных комбинаций и перспективный селекционный материал.

Summary

Molecular-genetic analysis of heterogeneity of the original series of Opal wheat disomic lines was carried out by methods of biochemical, molecular and classical genetics. There was obtained a direct evidence of difference existence among disomic lines at the level of DNA and protein-enzyme system.

Was shown the possibility of effective application of balanced aneuploid progeny in breeding for heterosis. Disomic lines exhibit unequal genetic potential which is determined by a genotype of the initial monosomic and its belonging to a particular genome.

The data obtained allow consideration of aneuploid disomic progeny as a valuable source of new gene combinations and a promising breeding materials.

Национальная академия наук Беларуси

В сборнике «Молекулярная и прикладная генетика. Сборник трудов» публикуются оригинальные результаты экспериментальных и теоретических исследований в области общей и молекулярной генетики, биотехнологии, биоинформатики, а также аналитические обзоры по указанным направлениям.

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

1. Статья сопровождается направлением института, в котором выполнено исследование.

2. Объем статьи (текст, литература, аннотации на русском и английском языках на одной странице с Ф. И. О. авторов и названием статьи на английском языке, подписи к рисункам, таблицы) не должен превышать 10 стр. (количество рисунков — не больше 3), аналитического обзора — 20 стр.

3. Все материалы представляются распечатанными на белой бумаге в 2 экз. через 1 интервал, шрифт Times New Roman, кегль 14 (рисунки тоже, фотографии — на белой глянцевой бумаге) и на дискете стандартного формата. Электронный вариант сообщения должен быть набран в Word под Windows, для формул — формульный редактор Word или Mathtape. Формульным редактором в Word пользоваться только для набора сложных формул (например C_4^2). Вставку символов выполнять через меню «Вставка\Символ». Выключку вверх и вниз (C^2, C_4) выполнять через меню «Формат\Шрифт\Верхний индекс», «Формат\Шрифт\Нижний индекс». Греческие символы должны быть прямыми, латинские буквы набираются курсивом. Греческие буквы и другие математические знаки брать из гарнитуры «Symbol», а не «Times New Roman». Математические формулы (lim, sum, In, sin, Re, Im и т. д.) и цифры набираются прямым начертанием. Химические символы (N, C1) и 0 (нуль) на бумаге отмечаются простым карандашом квадратной скобкой снизу. Индексы на бумаге отмечаются знаками ˇ, ˆ . Рукописные буквы и буквы других нестандартных гарнитур желательно помечать на бумаге, какой гарнитурой они набраны.

Рисунки даются в виде отдельных файлов в формате TIF (для IBM) или в форматах, созданных в пакетах Photoshop, Coreldraw, Adobe Illustrator (IBM, Macintosh). Текст па рисунках должен быть набран гарнитурой Arial, светлый курсив. Размер кегля соизмерим с размером рисунка (желательно 8-й кегль). Площадь рисунка должна быть в диапазоне 100—150 $см^2$. Сформированный в Word рисунок объединить в группу или сделать его через опцию создания рисунка. Подписи к рисункам должны быть распечатаны на отдельной странице. На обороте рисунков указываются фамилии авторов, название статьи и номер рисунка.

4. Статьи принимаются редакцией и издаются на русском, белорусском или английском языках в зависимости

Национальная академия наук Беларуси

от того, на каком языке сданы авторами. Экспериментальная статья должна иметь индекс по Универсальной десятичной классификации (УДК), рубрики «Введение», «Материалы (объекты) и методы исследования», «Результаты и их обсуждение», «Заключение». Для теоретических статей и аналитических обзоров обязательными являются только рубрики «Введение» и «Заключение». Заключение должно содержать четко сформулированные выводы. В названии статьи необходимо давать на латыни типовое название вида растения или животного. Латынь в тексте статьи набирается курсивом. В конце текста (во втором экз.) указываются фамилия, имя, отчество автора и адрес, номер телефона и полное название института. Приводятся также слова «дата поступления статьи в редакцию». Статья должна быть подписана всеми авторами.

5. Цитированная литература приводится общим списком на отдельной странице, ссылки в тексте даются порядковым номером в квадратных скобках (например, [5]). Список литературы оформляется так:

для книг — фамилия и инициалы автора, полное название книги, место (издательство) и год издания, страницы ссылки (от — до);

для журнальных статей — фамилия и инициалы автора, название журнала, год издания, том, номер, страницы ссылки. Например: Иванов И.И., Петров П.П. Молекулярные механизмы рекомбиногенеза. // Весці НАН Беларусь. Сер. біял. навук. 2001. № 3. С. 72—79.

Ссылки на неопубликованные работы не допускаются.

6. По решению редколлегии статья направляется на рецензию, затем визируется членом редколлегии. Возвращение статьи автору на доработку не означает, что она принята к печати. Переработанный вариант статьи снова рассматривается редколлегией. Датой поступления считается день получения редакцией окончательного варианта статьи.

7. Редакция может принять решение о публикации статьи без рецензирования, если качество представленного исследования дает достаточно оснований для такой оценки, а также высказать свое мнение об издании статьи в полном объеме или предложить ее депонировать. Основным критерием целесообразности публикации является новизна и информативность статьи.

8. Привлечение внештатных специалистов к рецензированию статей не освобождает редакцию от необходимости дать личную оценку этим статьям. Статьи не по профилю сборника возвращаются авторам после заключения редколлегии.

Национальная академия наук Беларуси

Научное издание

Молекулярная и прикладная генетика

Сборник научных трудов
Том 5, 2007

Дизайн и верстка Е.А. Кильчевская

Подписано в печать 22.11.2007. Формат 60x84 1/8.
Бумага офсетная. Гарнитура Таймс.
Цифровая печать.
Усл. печ. л. 12,32. Уч.-изд. л. 4,95.
Тираж 100 экз. Заказ 44.

Институт генетики и цитологии НАН Беларуси,
г. Минск, ул. Академическая, 27.

Отпечатано на ризографе
УП Камет, г. Минск, ул. Кульман, 27-6а.

Национальная академия наук Беларуси