

УДК 633.112.9:631.527

**ВЛИЯНИЕ АЛЛЕЛЕЙ SSR ЛОКУСОВ НА ОТЗЫВЧИВОСТЬ В КУЛЬТУРЕ  
ПЫЛЬНИКОВ *IN VITRO* У ГЕНОТИПОВ ТРИТИКАЛЕ**

**Е.В. Лагуновская**

*Институт генетики и цитологии НАН Беларуси*

Для успешного осуществления современных селекционных программ важное значение имеет поиск и создание нового исходного материала. При этом получение селекционного материала с необходимыми свойствами применительно к отдельным семействам, таким как злаки, является трудновыполнимой задачей [1].

Тритикале является одной из основных зернофуражных культур Республики Беларусь. Зерно тритикале в основном используется на фураж, а также представляет ценность в качестве технического сырья для крахмального и спиртового производства. В последние годы в связи с высоким качеством новых сортов, созданных белорусскими селекционерами, тритикале с успехом применяется в хлебопекарной промышленности при изготовлении хлеба и печенья [2].

Метод культуры пыльников *in vitro* используется в различных селекционных программах для создания гомозиготных линий на основе гибридов ранних поколений. Однако выход гаплоидных растений-регенерантов в культуре пыльников у злаков, в частности, у тритикале, крайне низкий и часто исчисляется долями процентов, причем значительная их часть представлена хлорофилл-дефектными формами, способными существовать непродолжительное время и исключительно в культуральных условиях [3]. Выявление сортов и линий, обладающих способностью к андрогенезу *in vitro*, до введения их в культуру клеток способствует повышению эффективности метода культуры пыльников. Основным фактором, определяющим такую способность, является генотип [4]. Установлено, что на способность к индукции каллусогенеза и регенерации растений у тритикале оказывают влияние преимущественно хромосомы А- и В-геномов. Также известно, что различные параметры пыльцевого эмбриогенеза (частота возникновения эмбрионных структур, регенерация альбиносных и зеленых растений, и т.д.) наследуются независимо друг от друга [5, 6]. Однако, поскольку в контроль процессов андрогенеза *in vitro* вовлечено значительное число генов, большая часть которых неизвестна, провести скрининг отзывчивых в культуре пыльников форм по генотипу достаточно затруднительно. Микросателлитные локусы могут быть сцеплены с интересующими исследователя признаками и использоваться в качестве маркеров при отборе генотипов с заданными свойствами. Для выявления такой связи применяют метод расщепляющихся популяций  $F_2$ , полученных от скрещивания родителей, контрастных по проявлению признака, с дальнейшим анализом расщепления в  $F_2$  как по анализируемому признаку, так и по аллельному состоянию микросателлитных локусов, расположенных на тех же хромосомах, что и локусы, связанные со способностью к эмбриогенезу *in vitro*, и оценивают степень корреляции между изучаемыми параметрами.

Объектом нашего исследования служили сорта, линии удвоенных гаплоидов и гибридные генотипы тритикале. Для культивирования пыльников срезанные колосья выдерживали в течение 7 дней при + 4°C, пыльники изолировали на стадии поздних одноядерных микроспор и культивировали по методике [7]. Разделение на группы индивидуальных растений в пределах каждой гибридной популяции осуществлялось следующим образом: для параметра «выход эмбрионидов» низкими считали значения – 0-10,0 %, средними – 11,0-50,0 %, высокими 51,0-90,0 %. Для параметра «выход растений-регенерантов» низкими считали значения 0-2,0 %, средними – 3,0-9,0 %, высокими – 10,0-14,0 %. По параметру «частота регенерации зеленых растений» низкими считали значения от 0 до 2,0 %, средними – от 3,0 до 7,0 %, высокими – от 8,0 до 12,0 %. По параметру «частота регенерации альбиносных растений» низкими считали значения от 0 до 10 %, средними – от 11,0 до 25,0 %, высокими – от 26,0 до 50,0 %

Для получения гибридов  $F_1$  и  $F_2$  растения тритикале выращивали в полевых условиях. Посев осуществляли в пяти повторностях. Для скрещивания брали по 15 растений. Скрещивание проводилось путем ограниченно свободного опыления, были проведены прямые и обратные скрещивания между генотипами тритикале, контрастными по различным параметрам андрогенеза *in vitro*

Выделение геномной ДНК проводили из зерновок стандартным фенольно-хлороформным методом [8]. Анализ качества и количества выделенной ДНК проверяли в 1 %-ном агарозном геле и на спектрофотометре «Ultrospec 3300pro» (Amersham Biosciences).

Для анализа межлинейного полиморфизма были выбраны 32 микросателлитных локуса, находящихся на хромосомах 2А (*Xbarc5*, *Xgwm339*, *Xgwm312*, *Xgwm294*, *Xbarc309*, *Xgwm445*, *Xgwm359*, *Xgwm95*); 2В (*Xgwm388*, *Xbarc13*, *Xbarc167*, *Xbarc200*, *Xbarc318*, *Xbarc349*); 5А (*Xgwm304*, *Xgwm415*, *Xgwm154*, *Xgwm205*, *Xgwm293*, *Xgwm156*, *Xgwm595*, *Xgwm186*, *Xgwm126*, *Xgwm291*) и 5В (*Xgwm234*, *Xgwm443*, *Xgwm540*, *Xgwm 499*, *Xgwm 335*, *Xgwm67*, *Xgwm554*, *Xgwm406*). Последовательности праймеров подбирали с использованием базы данных GrainGenes [9]. ПЦР проводили в объеме 25 мкл, содержащем из расчета на одну реакцию:  $MgCl_2$  – 2 мМ, прямого и обратного праймеров (один из праймеров нес флуоресцентную метку) к одному из маркеров – по 0,1 пМ, дНТФ – 80 мкМ, 1 единицу *Taq* полимеразы в инкубационном буфере, деонизированную стерильную воду – 13,7 мкл. Концентрация геномной ДНК составляла 100 нг на 25 мкл. Программа амплификации: 94° С – 3 мин; (94° С – 1 мин.,  $T_{отжига}^{\circ}C$  – 2 мин., 72° С – 2 мин.) – 40 циклов; 72° С – 10 мин. Температуру отжига выбирали в зависимости от последовательности праймера [9].

Размеры полученных продуктов амплификации определяли методом капиллярного электрофореза на генетическом анализаторе 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Анализ полученных данных осуществляли с помощью программы GeneMapper v.5.0. Для расчета коэффициента Пирсона использовали MS Excel.

С целью поиска контрастных по отзывчивости форм в культуру пыльников *in vitro* были введены 24 генотипа тритикале: 5 озимых сортов, 1 сортообразец, 4 яровых линии удвоенных гаплоидов и 15 яровых гибридов. Все исследованные генотипы проявили способность к индукции новообразований и регенерации растений. Варибельность по способности к новообразованию составила от 7,0 эмбриоидов на 100 пыльников у гибрида №295 Э-2579 × СНД 492/02 Э-2266 до 57,8 эмбриоидов на 100 пыльников у гибрида Легінь харьковский × Рубин соответственно. Среднее значение по данному параметру составило 23,3%.

Важным признаком, определяющим эффективность практического использования метода культуры пыльников *in vitro*, является выход растений-регенерантов. Способность к регенерации растений варьировала от 0,5% у гибрида (Ясь × Ванад) × Узор, до 22,1% у удвоенного гаплоида DH-27-1-08-1. Среднее значение параметра «выход растений-регенерантов» было 4,8 растений на 100 инокулированных пыльников. Средние значения по частоте формирования отдельно зеленых и альбиносных растений составили 9,1 и 14,5% растений-регенерантов, соответственно, при этом доля зеленых растений составила от 1,7% у линии DH-3-1-09 до 89,1% у линии DH-27-1-08-1. Среднее значение по данному параметру – 37,4%.

В результате скрининга коллекции из 24 форм тритикале, имевших различный эмбриогенный потенциал, для создания гибридов F<sub>1</sub> и F<sub>2</sub> нами были отобраны четыре линии удвоенных гаплоидов, созданные ранее методом культуры пыльников в лаборатории генетической и клеточной инженерии Института генетики и цитологии НАН Беларуси: DH-3-1-09, DH-11-2-09, DH-12-1-09, DH-27-1-08-1, являвшиеся наиболее контрастными по параметрам андрогенеза, связанным с регенерацией *in vitro*: «выход растений-регенерантов»,

«частота регенерации зеленых растений», «частота регенерации альбиносных растений». (таблица 1).

Таблица 1. – Параметры андрогенеза *in vitro* у линий удвоенных гаплоидов тритикале, контрастных по отзывчивости в культуре пыльников

Генотип	Выход эмбриоидов, %	Выход раст.-регенерантов, %	Частота регенерации зеленых растений	Частота регенерации альбиносных	Доля зеленых растений
Dh-3-1-09	26,3	6,0	1,0	18,9	1,7
Dh-11-2-09	41,1	15,3	4,1	31,3	11,7
Dh-12-1-09	28,7	9,1	26,2	3,8	87,5
Dh-27-1-08-1	49,4	22,1	38,0	4,7	89,1

Удвоенный гаплоид DH-3-1-09 характеризовался низким выходом растений-регенерантов, высокой частотой формирования альбиносных и низкой – зеленых растений-регенерантов; удвоенный гаплоид DH-11-2-09 отличался высоким выходом растений-регенерантов, с преобладанием альбиносных форм. Удвоенный гаплоид DH-12-1-09 характеризовался низким выходом растений-регенерантов, с преобладанием зеленых форм; удвоенный гаплоид DH-27-1-08-1 характеризовался высоким выходом растений-регенерантов, а также высокой частотой формирования зеленых растений-регенерантов.

На основании данных генотипов было создано 4 популяции гибридных растений F<sub>2</sub>. В каждой популяции было отобрано и оценено по каждому параметру (выход эмбриоидов, общий выход растений-регенерантов, частота регенерации зеленых и альбиносных растений) по 48 индивидуальных растений, после чего они были отнесены к одной из трех групп, характеризующихся высоким, средним или низким значением определенного параметра.

Анализ полученных данных показал значительный разброс значений по параметрам андрогенеза *in vitro* для индивидуальных растений в пределах каждой изученной популяции F<sub>2</sub>. В частности, значение параметра «выход эмбриоидов» варьировало от 0 до 98,8 %, параметр «выход растений-регенерантов» от 0 до 12,5 %, параметры «частота регенерации зеленых растений» и «частота регенерации альбиносных растений» – от 0 до 50,0 %. При этом по трем из четырех исследованных параметров андрогенеза *in vitro* («выход растений-регенерантов», «частота регенерации зеленых растений», «частота регенерации альбиносных растений») абсолютное большинство растений во всех четырех популяциях попало в группу низких значений.

На последующем этапе определяли наличие полиморфизма по микросателлитным локусам, расположенным на тех хромосомах, для которых показана связь со способностью к андрогенезу и регенерации растений у родительских генотипов тритикале. Были изучены 32 микросателлитных локуса: 8 локусов для хромосомы 2А, 6 локусов для хромосомы 2В, 10 локусов для хромосомы 5А и 8 локусов для хромосомы 5В. Нами обнаружен межлинейный полиморфизм по 5 из 32 исследованных микросателлитных локусов у родительских линий удвоенных гаплоидов тритикале: локус *Xgwm312* (хромосома 2А); *Xbarc 318* (хромосома 2В); *Xgwm291*, *Xgwm156* (хромосома 5А); *Xgwm540* (хромосома 5В). Для 5 SSR локусов было выявлено в общей сложности 11 различных фрагментов (таблица 2).

Таблица 2. – Размер фрагментов полиморфных микросателлитных локусов у контрастных по способности к андрогенезу *in vitro* генотипов тритикале

Генотип	Полиморфизм микросателлитных локусов, п.н.				
	<i>Xgwm312</i>	<i>Xbarc318</i>	<i>Xgwm291</i>	<i>Xgwm156</i>	<i>Xgwm540</i>
DH-3-1-09	195	290	146	290	121
DH-11-2-09	195	290	170	287	132
DH-12-1-09	195	260	170	287	121
DH-27-1-08-1	195, 219	290	146	310	121

При анализе расщепления по аллельному состоянию микросателлитных локусов у индивидуальных растений из популяций F<sub>2</sub> тритикале, проанализированных нами по параметрам андрогенеза *in vitro*, была оценена частота встречаемости фрагмента определенной длины для каждого локуса в каждой популяции. Различия в размерах амплифицируемых фрагментов учитывались как различные аллельные состояния соответствующего локуса.

По локусу *Xgwm291* ни в одной из гибридных популяций F<sub>2</sub> расщепления обнаружено не было, так как родительские генотипы в каждой комбинации скрещиваний несли одинаковые аллели: генотипы DH-3-1-09 и DH-27-1-08-1 – фрагмент размером 146 п.н., генотипы DH-11-2-09 и DH-12-1-09 – фрагмент размером 170 п.н. (таблица 3). По той же причине не выявлялся полиморфизм по локусам *Xgwm156* и *Xgwm312* в популяциях DH-11-2-09 × DH-12-1-09 и DH-12-1-09 × DH-11-2-09, а также по локусам *Xgwm540* и *Xbarc318* в популяциях DH-3-1-09 × DH-27-1-08-1 и DH-27-1-08-1 × DH-3-1-09.

Для выявления степени корреляции между аллельным состоянием микросателлитных локусов и параметрами андрогенеза *in vitro* были рассчитаны коэффициенты корреляции Пирсона (r-Пирсона) для тех популяций, в которых наблюдалось расщепление по аллельному состоянию исследуемых SSR локусов (таблица 3).

Таблица 3. – Коэффициенты корреляции Пирсона между аллельным состоянием микросателлитных локусов и параметрами андрогенеза *in vitro* у гексаплоидного тритикале

Гибридная популяция	Выход эмбриоидов, %	Выход регенерантов, %	Частота егегенерации зеленых растений	Частота регенерации альбиносных растений
<i>Xgwm312</i>				
DH-3-1-09 × DH-27-1-08-1	0,92**	0,74	0,70	0,69
DH-27-1-08-1 × DH-3-1-09	0,92**	0,74	0,70	0,69
<i>Xbarc318</i>				
DH-11-2-09 × DH-12-1-09	0,93**	0,88*	0,85*	0,81*
DH-12-1-09 × DH-11-2-09	0,93**	0,99***	0,99***	0,98***
<i>Xgwm156</i>				
DH-3-1-09 × DH-27-1-08-1	0,97***	0,80	0,76	0,75
DH-27-1-08-1 × DH-3-1-09	0,94**	0,79	0,77	0,78
<i>Xgwm540</i>				
DH-11-2-09 × DH-12-1-09	0,80	0,98***	0,96**	0,94**
DH-12-1-09 × DH-11-2-09	0,97***	0,97***	0,96**	0,96**

Примечание –\* – достоверно при P≤0,05; \*\* – достоверно при P≤0,01; \*\*\* – достоверно при P≤0,001.

Полученные в ходе исследования данные показали наличие корреляции между аллелями 4 полиморфных SSR локусов и отзывчивостью в культуре пыльников *in vitro*. Так, для локуса *Xgwm312* выявлена корреляция между высокими значениями параметров «выход эмбриоидов», «частота регенерации зеленых растений», «частота регенерации альбиносных растений» и «выход растений-регенерантов» и наличием аллеля 219 п.н. при отсутствии аллеля 195 п.н. Наличие только аллеля 195 п.н. коррелировало со средними значениями исследуемых параметров, а наличие обоих аллелей – с их низкими значениями. Для локуса *Xbarc318* одновременное наличие аллелей 260 п.н. и 290 п.н. коррелировало с низкими значениями исследуемых параметров андрогенеза *in vitro*, наличие только аллеля 290 п.н. в большей степени коррелировало со средними значениями, только аллеля 260 п.н. – с высокими значениями всех исследуемых параметров андрогенеза *in vitro*. Для локуса *Xgwm156* наблюдалась корреляция между наличием аллелей 290 п.н. и 310 п.н. в гетерозиготном состоянии и низкими значениями всех исследуемых параметров андрогенеза *in vitro*. Наличие аллеля 290 п.н. коррелировало со средними значениями, а наличие аллеля 310 п.н. – с высокими значениями указанных параметров. Для локуса *Xgwm540* наблюдалась тесная связь между низкими значениями исследуемых параметров андрогенеза *in vitro* и одновременным наличием аллелей 121 п.н. и 132 п.н. В гомозиготном состоянии наличие аллеля 132 п.н. коррелировало со средними, а аллеля 121 п.н. – с высокими значениями параметров андрогенеза.

Таким образом, проведенное нами комплексное исследование на расщепляющихся популяциях  $F_2$ , полученных от скрещивания линий удвоенных гаплоидов тритикале, контрастных по параметрам андрогенеза *in vitro*, позволило установить корреляцию между аллельным состоянием ряда микросателлитных локусов, расположенных на хромосомах 2A, 2B, 5A, 5B и эффективностью андрогенеза в культуре пыльников *in vitro* у гексаплоидного тритикале. Наиболее тесная связь наблюдалась для локусов *Xgwm540* и *Xbarc318*. Для локусов *Xgwm156* и *Xgwm312* обнаружена высокая корреляция между наличием фрагмента размером 310 п.н. (*Xgwm156*) и 219 п.н. (*Xgwm312*) и высокими значениями параметра «выход эмбриоидов». Мы полагаем, что указанные аллели могут быть использованы в качестве маркеров для обнаружения отзывчивых генотипов и получения высокоотзывчивых сортов и линий тритикале в культуре пыльников *in vitro*, что позволит существенно повысить эффективность данной методики.

#### Список использованных источников

1. Иванов, Г.И. Биотехнологические аспекты создания исходного материала для селекции зерновых колосовых культур: автореф. дис. ... докт. биол. наук: 03.00.23 / Г.И. Иванов – Кр., 2006. – 276 с.
2. Гриб С.И. Генофонд, методы и результаты селекции тритикале в Беларуси // Известия Национальной академии наук Беларуси. Серия аграрных наук. – 2014. – №3. – С.40-45.
3. Makowska, K. Albinism in barley androgenesis / K. Makowska, S. Oleszczuk // Plant Cell Rep. – 2014. – Vol. 33, №3. P. 385-392.
4. Genetic analysis of anther culture response in wheat using aneuploid, chromosome substitution and translocation lines / S. Agache [et al.] // Theor. Appl. Genet. – Vol. 77. – P. 7-11.
5. Chromosomal regions associated with the *in vitro* culture response of wheat (*Triticum aestivum* L.) microspores // N.H. Nielsen [et al.] / Plant Breeding. – 2015. – Vol. 134, №3. – P. 255-263.
6. Tuveesson, K.D. Nuclear genes affecting albinism in wheat (*Triticum aestivum* L.) anther culture / K. D. Tuveesson, S. Pedersen, S.B. Andersen // Theor. Appl. Genet. – 1989. – Vol. 78. – P.879-883.
7. Лагуновская, Е.В. Эффективность использования различных типов индукционных питательных сред при культивировании пыльников гексаплоидного тритикале. // Е.В. Лагуновская, О.И. Зайцева, В.А. Лемеш // Факторы экспериментальной эволюции организмов: Сб. науч. трудов / Национальная академия наук Украины, Институт молекулярной биологии и генетики, Укр. о-во генетиков и селекционеров им. Н.И. Вавилова; редкол.: В.А. Кунах (гл. ред.) [и др.]. – К.: Укр. о-во генетиков и селекционеров им. Н.И. Вавилова, 2019. – Т. 25. – С. 260-265.
8. Дорохов, Д.Б. Быстрая и экономичная технология RAPD анализа растительных геномов / Д.Б. Дорохов, Э. Клоке // Генетика. – 1997. – Т. 33, № 4. – С. 443–450.
9. GrainGenes [Electronic resource]. – Mode of access: <https://wheat.pw.usda.gov/cgi-bin/GG3/browse.cgi>. – Date of access: 03.09.2021