

На правах рукописи

ШЕРЕР

Наталья Владимировна

ОСОБЕННОСТИ ГАЙМОПРОДУКЦИИ
РАЗНЫХ ГЕНОТИПОВ ПШЕНИЦЫ В КУЛЬТУРЕ ПЫЛЬНИКОВ

03.00.15. - генетика

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Одесса-1993



00814737 (U)

Работа выполнена в 1987
Селекционно-генетического института

Научный руководитель - кандидат биологических наук,
старший научный сотрудник

ЛУКЬЯНИК С.Ф.

Официальные оппоненты: - доктор биологических наук,
профессор В.Н.Толский

- кандидат биологических наук,
старший научный сотрудник
В.К.Симоненко

Ведущее учреждение: - Институт физиологии растений и
генетики АН Украины

Защита диссертации состоится "7" мая 1993 г. в
"14⁰⁰" часов на заседании специализированного совета Д 020.08.01
в Селекционно-генетическом институте (270036, г.Одесса,
Овидиопольская дорога,3).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке института.

Автореферат разослан "5" апреля 1993 г.

Ученый секретарь
специализированного совета

А.А. Станкевич Станкевич А.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. В селекции сельскохозяйственных культур в последние годы широко используются новые методы для создания сортов интенсивного типа. Одним из таких методов является культура пыльников *in vitro*, позволяющая получать из гибридных популяций гомозиготный материал и использовать его с целью ускорения селекционного процесса и повышения эффективности рекомбинационного сочетания с уменьшением объема изучаемого материала. С помощью данного метода уже создан ряд сортов риса (Анопутоис, 1976; Н.Ну, 1984) и пшеницы (Н.Ну et al., 1983; J.de Vuuzer et al., 1987), которые по продуктивности, устойчивости к заболеваниям, зимостойкости и другим показателям превосходят лучшие, полученные традиционными способами, сорта.

Несмотря на значительный интерес к гаплоидам и рост фактического материала по гаплоидии, многие весьма важные вопросы этой проблемы продолжают оставаться нерешенными. Пока еще не создана простая воспроизводимая методика индукции гаплоидов из микроспор при культивировании пыльников любых сортов и гибридов пшеницы.

Из имеющихся литературных данных ясно, что определяющим фактором культивирования пыльников является генотип. Элементы генетической детерминации гаплопродукции пока не установлены, хотя ведется их активный поиск. Изучение генетики процесса пыльниковой гаплопродукции представляет особый интерес, так как управление этим процессом возможно, только зная его генетическую детерминацию.

Хотя гаплопродукционный процесс несомненно находится под контролем определенных наследственных факторов, он в то же время зависит и от совокупности внешних условий, влияющих на реализацию гаплопродукционной способности. Изучение влияющих на пыльниковую гаплопродукцию факторов важно для дальнейшего развития и применения метода культивирования пыльников *in vitro*.

Цель и задачи исследования. Исходя из вышеизложенного, целью наших исследований было изучение генетической детерминации процесса гаплопродукции в пыльниковой культуре пшеницы и разработка комплекса условий культивирования пыльников, новообразований и регенерантов для оптимизации гаплопродукционного процесса.

Согласно поставленной цели были определены задачи:

1. Изучить пути морфогенеза пыльцы пшеницы.

2. Изучить влияние факторов выращивания донорных растений, предобработок срезанных колосьев и условий культивирования *in vitro* на пыльниковую гаплопродукцию.

... Определить роль генетических факторов в пыльниковой культуре пшеницы на основании изучения:

- способность пыльников к эмбриогенезу и к регенерации растений;
- влияние системы локусов *Vtn* на гаплопродукционный процесс;
- влияния цитоплазмы на реализацию спорофитного пути развития микроспор.

4. Выявить ценные доноры для культуры пыльников из предложенных селекционных образцов.

Научная новизна и практическая ценность. Установлено, что эмбриогенная и регенерационная способности изучаемых сортов и гибридов пшеницы контролируются разными генетическими системами и обусловлены главным образом неаддитивными эффектами генов.

На основе сравнительного изучения гаплопродукции у пшениц, различающихся по системе генов *Vtn*, установлено, что результативность гаплопродукционного процесса увеличивается при наличии в генотипе доминантного локуса *Vtn 1* и уменьшается в присутствии *Vtn 2*.

Показано влияние цитоплазмы серии аллоплазматических линий Chinese Spring на различные этапы гаплопродукционного процесса. Выявлены цитоплазмы, увеличивающие эмбриогенную способность пыльников, и повышающие частоту образования зеленых регенерантов.

Проведено цитологическое изучение морфогенеза пыльцы пшеницы, позволившее предположить, что спорофитный путь развития микроспор детерминирован *in vivo*, а для своей реализации требует создания определенных условий.

Разработан и предложен к практическому использованию комплекс оптимальных условий выращивания донорных растений, предобработок срезанных колосьев, культивирования пыльников, новообразований и регенерантов, а также состав питательных сред, увеличивающие эффективность пыльниковой культуры пшеницы.

Получено 357 гомозиготных линий, которые переданы для дальнейшего изучения в отдел селекции и семеноводства пшениц ВУГи.

Апробация работы. Материалы диссертации доложены на Всесоюзной конференции по биотехнологии злаковых культур (Алма-ата, 1983); на Международной конференции "Биология культивируемых

клеток и биотехнология" (Новосибирск, 1988); на Всесоюзной конференции молодых ученых "Методы интенсификации селекционного процесса" (Одесса, 1990); На Всесоюзной конференции молодых ученых и специалистов сельского хозяйства "Современные проблемы генетики и селекции сельскохозяйственных растений" (Одесса, 1991).

Публикации. Основные результаты диссертации отражены в 7 печатных работах, список которых приводится в конце автореферата.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, 6 глав, выводов, практических рекомендаций и списка литературы, включающего 224 библиографические ссылки, 187 из которых иностранные. Работа изложена на 143 страницах машинописи, содержит 19 рисунков, 33 таблицы и 2 приложения.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.

В работе использованы яровые и озимые сорта, формы и гибриды мягкой пшеницы, предоставленные отделом селекции и семеноводства пшеницы ВСГИ, наборы линий, изогенных по системе локусов Vrn, сортов Triple Dirk и Скороспелка 36, предоставленные лабораторией частной генетики пшеницы ВСГИ, и серия аллоплазматических линий, созданных на основе Chinese Spring, предоставленная отделом генетики и цитологии растений ВСГИ.

Донорные растения выращивали в полевых условиях в 1986-1989 годах на опытных полях института и в условиях искусственного климата. Яровизацию проростков озимых пшениц проводили при $+2^{\circ}\text{C}$ и круглосуточном освещении в течение 45-60 суток в камере КИТ-1. Затем полученные растения выращивали в климатической камере при 16-час. фотопериоде, освещенности 18-20 тыс.лк и температурном режиме: $22-25^{\circ}\text{C}$ днем и $18-20^{\circ}\text{C}$ ночью.

Колосья донорных растений срезали на одноядерной стадии развития микроспор, выдерживали их при $+2^{\circ}\text{C}$ в темноте в течение 4 суток. Стерилизовали насыщенным раствором гипохлорита кальция (30 мин) и помещали на питательные среды: N-6 (C.C.Chu, 1978), Potato-2 (C.C.Chuang et al., 1978) и различные их модификации по 50-60 пыльникам в пробирку. Инкубировали в темноте при $+30^{\circ}\text{C}$. Подсчет частоты эмбриогенеза проводили относительно числа высаженных пыльников. Частоту регенерации оценивали относительно числа эмбриогенных пыльников.

Цитологические наблюдения проводили на временных цветочкарминовых препаратах с помощью МБИ-15.

Полученные новообразования пересаживали на безгормональную твердую питательную среду N-6 для регенерации и выдерживали в течение недели в тех же условиях, где инкубировались пыльники, а затем при той же температуре помещали на слабый рассеянный свет (16-час.день) на 7-10 дней. После этого новообразования с первыми появившимися регенерантами переносили в условия более интенсивного освещения (2-3 тыс.лк.) и умеренной (25-26°C) температуры при том же фотопериоде. Затем только появившиеся зеленые регенеранты помещали в жидкую безгормональную питательную среду N-6 в условия короткого (10-час.) дня и пониженной температуры (9°C ночью и 12°C днем) до высадки в почву.

Диплоидизацию полученных регенерантов проводили введением раствора колхицина (0,1% в 4% ДМСО) методом вакуум-инфильтрации (С.А.Игнатова, С.Ф.Лукьяник, 1980), погружением корней, или методом Белла (G.D.Bell, 1950). Выращивали регенеранты в условиях фитотрона.

Семенное потомство полученных регенерантов высевали в поле для анализа элементов структуры урожая растений R₂. По 1 зерну с каждого колоса регенеранта анализировали электрофоретически для определения глединового спектра.

Математическую обработку полученных данных проводили с использованием стандартных программ на IBM-PC/XT и ЭВМ СМ-4.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Изучение путей пыльцевого морфогенеза пшеницы *in vivo* и *in vitro*. В результате цитологических наблюдений нами показано, что в пыльниках, эксклантируемых на стадии одноядерных микроспор, всегда наблюдалась некоторая асинхронность развития. В одном пыльнике обнаруживались микроспоры от ранней одноядерной стадии до двуядерного пыльцевого зерна. Кроме этого наблюдали различные морфологически аномальные пыльцевые зерна. К ним относили многоядерные или многоклеточные пыльцевые зерна. Были и мелкие невакуолизированные пыльцевые зерна с ярко окрашивающейся ацетокармином цитоплазмой, и пыльцевые зерна нормального размера, но отличающиеся большим количеством запасных веществ - крахмала или липидов. Число аномалий микроспор описанных типов было очень незначительным и, кроме того, такие явные морфологические аномалии через несколько дней культивирования дегенерировали.

Трудно предположить, что такие аномалии являются инициалами многоклеточных макроструктур, поскольку количество последних значительно больше. Не исключено, что основной вклад в формирование жизнеспособных многоклеточных структур вносят микроспоры, метаболически отличающиеся от нормальных микроспор гаметофитного пути развития. К числу таких аномалий, возможно, относятся и двуклеточные микроспоры с ядрами равного размера. Число таких пыльцевых зерен увеличивается в первые дни культивирования (до 10 дней), после чего наблюдается появление многоклеточных структур (табл.1). Следует отметить, что добавление в питательную среду 2,4-Д не оказывало влияния на возникновение равноядерных пыльцевых зерен. 2,4-Д не сдвигала гаметофитное развитие микроспор на спорофитный путь и не увеличивала таким образом число многоклеточных структур.

Таблица 1

Характеристика популяции микроспор пшеницы сорта Чайка при разных сроках культивирования

Питательная среда Pota-to-2	Срок культивирования, дней	Проанализировано микроспор, шт.	Жизнеспособных микроспор, %	Среди жизнеспособных микроспор				
				с равными ядрами шт.	с неравными ядрами, шт.	зрелая пыльца, шт.	четырёхядерные, шт.	многоядерные, шт.
без 2,4-Д	0	1000	98.67	53	42	8	0	0
	1	1000	96.41	69	71	49	0	0
	3	1000	48.53	127	104	208	3	0
	5	1000	17.90	31	68	73	4	0
	7	1000	6.80	11	21	34	0	2
	10	1000	2.90	5	0	12	4	8
с 2,4-Д	15	1000	0.70	0	0	0	0	7
	0	1000	98.34	78	62	0	0	0
	1	1000	89.98	61	70	29	0	0
	3	1000	38.87	104	75	168	0	0
	5	1000	31.04	58	93	135	0	4
	7	1000	8.30	0	17	63	1	2
	10	1000	1.00	0	0	2	0	8
15	1000	1.20	0	0	0	0	12	

Различали два типа образования микроструктур. В одном случае в результате повышенной митотической активности ядер образовывались многоклеточные пыльцевые зёрна, скруженные общей оболочкой. Увеличение объема этих микроструктур незначительно. Они состоят из мелких тонкостенных клеток с крупными ядрами. После растрескивания оболочки продолжают интенсивные клеточные деле-

ния, приводящие к образованию шаровидных проэмбрио, обнаруживающих упорядоченное строение. Наблюдала и другой тип развития микроструктур. Пыльцевая оболочка трескается уже после нескольких митотических делений клетки. Освобождающиеся при этом клетки несколько больших размеров с более толстыми клеточными оболочками. Они неплотно ассоциированы между собой и быстро увеличиваются в размерах. Результатом такого типа развития является образование недифференцированного каллуса или эмбрионального клеточного комплекса.

2. Влияние внешних воздействий на эффективность пыльниковой гаплопродукции.

2.1. Условия выращивания донорных растений.

При выращивании донорных растений пшеницы Triple Dirk в поле частота образования эмбриогенных пыльников ($7,9 \pm 1,2\%$) значительно выше, чем в условиях искусственного климата ($1,5 \pm 0,2\%$). А частота регенерации составила $29,9 \pm 6,5\%$ у полевых доноров и $4,4 \pm 1,5\%$ у доноров, выращенных в фитотроне. Аналогичный результат получен у Скороспелки 36 ($6,6 \pm 1,0$ и $0,8 \pm 0,4\%$ эмбриогенных пыльников соответственно). При выращивании донорных растений этого сорта в фитотроне регенерантов получить не удалось.

При посеве в поле семян озимо-яровых гибридов F_2 в разные сроки (ранний - август, и оптимальный - октябрь) растения подвергались воздействию природных условий на разных стадиях развития. Обнаружили, что срок посева не влиял на выход эмбриогенных пыльников и их регенерационную способность. Эти показатели определялись генотипом донорных растений.

Изучение пыльниковой культуры колосьев разных ярусов у 8 популяций F_2 озимо-яровых гибридов показало, что главные колосья донорных растений образовывали $3,17\%$ эмбриогенных пыльников, колосья первого яруса - $4,37\%$, а колосья второго яруса - $1,61\%$. Отличия гаплопродукционной способности колосьев разных ярусов могут быть связаны как с разницей в сроках закладки колосьев и связанных с этим воздействием стрессовых факторов на разные стадии формирования колоса, так и с возможной разницей уровня эндогенных гормонов в колосьях разных ярусов.

Установлено также, что наличие эмбриогенно способных микроспор свойственно пыльникам любой части колоса в равной мере.

2.2. Предобработки донорного материала и оптимизация питательной среды.

Известно (С.Ф. Лукьяник, 1983; G. Shumann, 1986), что холодовая предобработка повышает эффективность пыльниковой культуры. Нами показано, что длительное воздействие пониженной температуры (более 4 дней) нецелесообразно, так как приводит к снижению эффективности гаплопродукции.

При изучении зависимости гаплопродукции от состава питательной среды установлено, что из двух использованных стандартных питательных сред Potato-2 оказалась благоприятней, чем N-6, для всех генотипов пшениц. Добавление в первичную питательную среду растворимого крахмала (1г/л) и яблочной кислоты (25мг/л) на фоне высокой концентрации сахарозы (10%) позволило заметно увеличить выход новообразований и зеленых регенерантов. Модифицированная таким образом среда N-6 по своей эффективности не уступает широко используемой в настоящее время среде Potato-2.

Особогащение среды Potato-2 пролином (200мг/л), глутамином (200 мг/л) и яблочной кислотой (25 мг/л) у 4 из 6 изучаемых генотипов способствовало увеличению частоты образования эмбриогенных пыльников (табл.2). Особенно заметно влияние добавок сказалось на регенерации зеленых растений.

Наличие ауксина в питательной среде не всегда является обязательным.

При сравнительном изучении веществ ауксиновой природы (2,4-Д, ИУК и 4-хлорфеноксисукусная кислота), для чего в модифицированную нами среду N-6 добавляли эти компоненты в количестве 1мг/л, было показано, что ауксины скорее всего не являются индукторами спорофитного развития микроспор. Так, у двух изучаемых сортов (Чайка и Triple Dirk) на среде без 2,4-Д получены пыльцевые новообразования. Воздействию компонентами питательной среды подвергаются образующиеся многоклеточные структуры.

3. Получение и морфобиологический анализ пыльниковых регенерантов пшеницы.

3.1. Оптимизация питательных сред и температурно-световых условий регенерации из новообразований.

Проведенные наблюдения показали, что процесс регенерации, как правило, индуцируется уже на первичной питательной среде. В некоторых случаях наблюдали возникновение регенерантов до пересадки на регенерационную среду. Однако основная масса новообразований нуждается для этого в изменении условий, одним из которых является состав регенерационной среды.

Влияние органических добавок к картофельной среде на гаплопродукцию пшеницы

Генотип	Пита- тель- ная среда	Выса- жено пыль- ников, шт.	Получено				
			эмбрио- генных пыльни- ков, %	зеленых регене- рантов		хлорофилл- деф. реге- нерантов	
				шт.	%	шт.	%
F ₂ Од16 х	P-2	480	2.1	16	3.3	0	0.0
х ² Сiано 79	P-2M	480	7.9**	384**	80.0	24**	5.0
Чайка	P-2	360	2.2	0	0.0	0	0.0
-"	P-2M	360	16.7**	256**	71.1	136**	37.8
F ₂ Чайка х	P-2	480	2.5	0	0.0	12	2.5
х ² QT 4083	P-2M	600	5.0*	24**	4.0	20	3.5
F ₂ Од51 х	P-2	360	3.3	0	0.0	20	5.6
х ² Сiано 79	P-2M	480	2.9	32**	6.7	0**	0.0
F ₂ Лннат х	P-2	480	5.8	16	3.3	0	0.0
х ² QT 4083	P-2M	480	12.5**	192**	40.0	160**	33.3
F ₂ Чайка х	P-2	480	4.3	4	0.8	8	1.7
х ² Сiано 79	P-2M	480	3.2**	1	0.2	2	0.4

*--достоверно при P=0.05; **--достоверно при P=0.01

P-2- среда Potato-2;

P-2M - среда Potato-2 с добавлением пролина (200мг/л),
глутамин (200мг/л) и яблочной кислоты (25мг/л).

Среда P-8, которая была предложена для регенерации растений из пылевых новообразований тритикале и эмбриокультуры ячменя (С.Ф. Лукьяник, 1983), оказалась неподходящей для пыльниковой культуры пшеницы (табл.3). Процесс регенерации также ингибиро-

Таблица 3

Влияние состава регенерационной среды на получение пыльниковых регенерантов

Состав регенера- ционной среды	Высажено новообра- зований, шт.	Получено реге- нерантов, шт.		Частота реге- нерации, %	
		зеле- ных	хлоро- филл-де- фектных	зеле- ных	хлоро- филл-де- фектных
N-6 без гормонов	30	16	19	53.33	63.33
N-6+крахмал, яб- лочная к-та, ГК	30	25	14	83.33	46.66
N-6+АБК	27	0	0	0.0	0.0
P-8	32	1	14	3.13	43.75

вался добавлением в среду АБК. Количество зеленых регенерантов заметно возрастало при обогащении среды N-6 крахмалом (1г/л), яблочной (25мг/л) и гибберелловой (0,5мг/л) кислотами.

При пересадке начавших регенерацию новообразований в жидкую питательную среду и в условия 10-час. дня и пониженной температуры, обеспечивающих свободный доступ к питанию и способствующих развитию корневой системы, все регенеранты развиваются нормально. Кроме того, в таких условиях хлорофилл-дефектные регенеранты практически приостанавливают свой рост, что положительно отражается на выходе зеленых растений.

3.2. Диплоидизация растений-регенерантов и характеристика дигаплоидов.

Для удвоения числа хромосом у полученных растений использовали колхицинирование через корни и вакуум-инфильтрацией. Оказалось (табл.4), что при этом гибнет много растений.

Таблица 4

Эффективность разных способов диплоидизации пыльниковых растений-регенерантов пшеницы Triple Dirk

Способ диплоидизации	Всего растений, шт.	Получено дигаплоидов, шт.	Получено гаплоидов, шт.	Частота диплоидизации, %	Частота гибели растений, %
Спонтанная	153	24	81	15.8	31.8
Погружением корней	203	35	117	17.2	25.1
Вакуум-инфильтрацией	203	19	52	9.3	65.0
χ^2		4.68*	26.63***		43.96***

*--достоверно при P=0.1; ***--при P=0.01

Ни у одного растения не удалось получить фертильных колоосьев при обработке методом Белла.

Вместе с тем для некоторых культур известно (J.Ouyang, 1987; M.S.Cho, F.J.Zapata, 1988), что в пыльниковой культуре имеет место спонтанное удвоение. Проведенные нами исследования показали, что спонтанная диплоидизация для сорта Triple Dirk составила 37.8%, а для Скороспелки 36 - 30.6%. При колхицинировании через корни частота диплоидизации для этих сортов составила 23,9 и 21.5% соответственно. При этом обработка колхицином значительно повышала гибель растений - примерно в 6 раз у Triple Dirk и

втрое у Скороспелки 36. Решающее влияние на выход фертильных регенерантов в пыльниковой культуре пшеничных гибридов оказывает генотип донорных растений.

Таким образом в методике получения удвоенных гаплоидов пшеницы колхицинирование можно исключить.

Изучение морфоструктуры растений-регенерантов (R_1) из изогенных линий Triple Dirk выявило различия по озерненности, высоте растений, длине и числу колосьев. Семенное потомство (R_2) этих изменений не сохраняло. Следовательно наблюдаемые нами изменения носили модификационный характер. Биохимический анализ растений R_1 и R_2 линий Triple Dirk также не выявил индукции генетических изменений. Отсутствие расщепления по изученным признакам в R_2 позволяет говорить о гомозиготности полученных линий.

4. Эффективность гаплопродукции в культуре пыльников разных генотипов мягкой пшеницы.

4.1. Изучение яровых и озимых сортов, а также изогенных по системе Vrn линий пшеницы.

При изучении семи сортов пшеницы (3 яровых и 4 озимых) отмечены различные показатели гаплопродукции (табл.5). По средним

Таблица 5

Результат культивирования пыльников различных сортов пшеницы

Сорт	Всего пыльников, шт.	К-во эмбриогенных пыльников, %	К-во новообразований, %	Частота ре-генерации, %		Получено фертильных растений, %
				зеле-ных	альби-но	
яровые сорта						
Clano 79	660	3.5	4.1	6.0	0.8	0.0
Veery	600	4.1	5.2	10.4	12.2	15.8
QT 4083	660	6.5	12.4	8.0	6.7	16.6
\bar{x}		4.7	7.2	8.1	6.6	10.8
$S_{\bar{x}}$		0.8	2.1	1.0	2.7	4.5
озимые сорта						
Одесская 51	1260	0.7	0.9	0.8	0.0	40.0
Юнат	1140	1.3	1.6	0.4	0.3	0.0
Одесская 16	660	2.4	3.6	7.2	0.0	14.3
Чайка	1140	4.4	10.4	16.4	3.2	28.0
\bar{x}		2.2	4.1	6.2	0.9	20.6
$S_{\bar{x}}$		0.7	1.9	3.2	0.5	7.5

значениям этих показателей яровые сорта превосходили озимые.

Предположили, что данный факт может быть связан с различиями в системе генов отзывчивости к яровизации. В связи с этим проведено изучение андрогенетической отзывчивости у почти изогенных по системе локусов *Vtn* линий сортов Triple Dirk и Скороспелка 36, выращенных в полевых условиях.

Обнаружили, что средний процент эмбриогенных пыльников был близок по своему значению у линий Triple Dirk (табл.6) и Скороспелка 36 (табл.7), составив 7,91 и 6,59% соответственно. Вместе с тем показатели регенерации у Скороспелки 36 были намного ниже, чем у Triple Dirk (3,4% и 29,9% - зеленых регенерантов и 1,5% и 12,0% хлорофилл-дефектных, соответственно), в чем сказалось влияние генофона Скороспелки 36.

Среди изогенных по системе локусов *Vtn* линий обоих сортов линии с доминантным локусом *Vtn1* выделены как наиболее отзывчивые на культивирование пыльников, а линии с доминантными локусами *Vtn2* *Vtn3* характеризовались самыми низкими показателями частоты эмбриогенных пыльников и числом новообразований на них. Однако способность новообразований линии Скороспелки 36 доминантной по локусам *Vtn2* *Vtn3* к регенерации зеленых растений оказалась вдвое превышающей среднюю по опыту, а регенерация хлорофилл-дефектных растений этой линией была незначительной. Аналогичная линия сорта Triple Dirk по регенерации зеленых растений была одной из худших (немногом лучше линии с доминантным локусом *Vtn2*). Показатели начальных этапов гаплопродукции у обоих сортов снижал доминантный локус *Vtn2*. Данный локус не оказывал положительного влияния и на регенерационную способность пыльниковых новообразований.

4.2. Изучение влияния цитоплазм на пыльниковую гаплопродукцию.

Сравнительное исследование аллоплазматических линий пшеницы Chinese Spring обнаружило различную отзывчивость к культивированию пыльников (табл.8). Получение эмбриогенных пыльников не зависело от цитоплазмы *Tr.dicoccoides*, но регенерация зеленых растений на этой цитоплазме увеличивалась. Цитоплазма *Tr.dicoccum* значительно увеличила процент эмбриогенных пыльников и среди регенерантов не было хлорофилл-дефектных растений. Такой же эффект оказывала цитоплазма *Ae.ventricosa*.

Линии с цитоплазмами *Ae.caucheri*, *Ae.bicornis*, *Ae.unicaustata* и *Ae.cylindrica* обладали пониженной вдвое эмбрио-

Таблица 22

ВЛИЯНИЕ ГЕНОВ Vrn НА ГАЛЛОПРОДУЦИЮ И ШЕЛЮДЬ СОРТА Triple Dirk

К-во дней до колосения	Доминантные докусы в генотипе Triple Dirk	К-во : пыльни-ксы, шт	К-во эмбрио-генных пыльников, %	К-во новообразований, %	Частота регенерации, %	
					зеленых	альбиносных
114	-	600	7,5±1,1	20,5±1,6	26,6±1,8	13,0±1,4
52	Vrn 1	300	12,0±1,9	51,7±2,9	37,3±2,8	27,3±2,6
58	Vrn 2	420	2,1±0,7	5,5±1,1	4,8±1,0	0,5±0,3
51	Vrn 3	540	9,1±1,7	19,3±1,7	50,4±2,1	14,4±1,5
51	Vrn 1 Vrn 2	180	11,7±2,4	30,0±0,1	46,7±3,7	10,0±2,2
50	Vrn 1 Vrn 3	300	8,0±1,6	22,7±2,4	38,7±2,8	7,3±1,5
52	Vrn 2 Vrn 3	240	5,0±1,1	14,6±2,3	5,0±1,4	15,0±2,3
Среднее по опыту			7,91	23,45	29,92	12,51
НСД для сравнения со средней опыта			2,49	3,72	4,04	3,03
НСД для попарного сравнения			3,81	5,69	7,17	4,62

Таблица 23

ВЛИЯНИЕ ГЕНОВ Vrn НА ГАЛЛОПРОДУЦИЮ У ПШЕНИЦЫ СОРТА СКОРОСПЕЛКА 36

К-во дней до колосения	Доминантные локусы в генофоне Скороспелка 36	К-во пыльников, шт.	К-во эмбрионных пыльников, %	К-во новообразований, %	Частота регенерации, %	
					зеленых	альбиносных
109	-	240	7,9±1,3	20,0±2,6	1,7±0,8	0,0
48	Vrn 1	420	12,1±2,1	20,0±1,9	10,5±1,5	0,9±0,5
56	Vrn 2	480	5,0±0,9	11,3±1,4	2,5±0,7	2,1±0,6
49	Vrn 3	420	5,7±1,1	14,0±1,7	0,0	4,3±0,9
47	Vrn 1 Vrn 2	300	7,3±1,5	18,3±2,2	0,0	1,3±0,7
46	Vrn 1 Vrn 3	480	5,2±1,0	14,2±1,6	2,5±1,7	1,2±0,5
48	Vrn 2 Vrn 3	240	2,9±1,1	3,3±1,1	6,7±1,6	0,8±0,6
Среднее по опыту			6,59	14,45	3,40	1,53
НСР для сравнения с средней опыта			2,30	3,31	1,68	1,22
НСР для попарного сравнения			3,51	5,06	2,57	1,86

13

Влияние цитоплазм на пыльниковую гаплопродукцию

Источник цитоплазмы	Высажено пыльников шт.	Получено эмбриоген. пыльников, %	Получено регенерантов, шт.		Частота регенерации, %	
			зеленых	альбино	зеленых	альбино
Chinese Spring	360	1.94	0	6	0.0	85.70
<i>Tr. dicoccoides</i>	660	1.96	4	0	30.77	7.69
<i>Tr. dicoccoides nudiglumis</i>	120	0.66	0	0	0.0	0.0
<i>Tr. dicoccum</i>	660	3.03	10	0	50.00	0.0
<i>Tr. timopheevi</i>	240	0.42	0	0	0.0	0.0
<i>Tr. zhukovskiy</i>	300	0.0	0	0	0.0	0.0
<i>Ae. heldreichii</i>	360	0.0	0	0	0.0	0.0
<i>Ae. mutica</i>	300	0.0	0	0	0.0	0.0
<i>Ae. searsii</i>	120	0.0	0	0	0.0	0.0
<i>Ae. biuncialis</i>						
(C ₂₇₋₁)	240	0.0	0	0	0.0	0.0
<i>Ae. l. cristata</i>	420	0.24	0	0	0.0	0.0
<i>Ae. aucheri</i>	240	0.42	0	1	0.0	100.00
<i>Ae. bicornis</i>	540	0.55	0	1	0.0	33.33
<i>Ae. cylindrica</i>	720	0.69	0	2	0.0	40.00
<i>Ae. speltoides</i>						
(C ₁₋₁)	480	1.04	0	1	0.0	20.00
<i>Ae. speltoides</i> (M)	180	0.66	0	0	0.0	0.0
<i>Ae. sharonensis</i>	360	5.55	0	2	0.0	10.00
<i>Ae. biuncialis</i>						
(C ₂₉₋₁)	240	6.25	0	4	0.0	26.66
<i>Ae. columnaris</i>	360	0.61	0	4	0.0	30.77
<i>Ae. kotschyi</i>	360	4.19	0	4	0.0	26.66
<i>Ae. crassa</i> 4x	480	2.08	0	2	0.0	20.00
<i>Ae. crassa</i> 6x	600	5.50	0	9	0.0	27.27
<i>Ae. umbellata</i>	300	0.66	1	1	50.00	50.00
<i>Ae. speltoides</i>						
(C ₁₇₋₁)	420	2.62	1	3	9.09	27.27
<i>Ae. var. tabilis</i>	480	4.79	1	3	4.35	13.04
<i>Ae. juvenalis</i>	70	2.86	5	4	41.66	33.33
<i>Ae. ventricosa</i>	540	4.26	5	0	21.74	0.0

генной способностью микроспор. Все регенеранты этих линий были альбиносными.

На все показатели процесса гаплопродукции отрицательно влияли цитоплазматические факторы *Tr. zhukovskiy*, *Ae. heldreichii*, *Ae. mutica*, *Ae. searsii* и *Ae. biuncialis*.

Линии с цитоплазмами *Ae. sharonensis*, *Ae. biuncialis*, *Ae. columnaris*, *Ae. kotschyi*, *Ae. crassa* 4x и *Ae. crassa* 6x, обладая повышенной эмбриогенной способностью микроспор, оказались способными к регенерации только хлорофилл-дефектных растений.

В контрольной линии Chinese Spring в нашем опыте не было получено зеленых регенерантов. Они сформировались в присутствии цитоплазм *Tr.dicoccoides*, *Tr.dicoccum*, *Ae.umbellulata*, *Ae.speltoides*, *Ae.variabilis*, *Ae.ventricosa* и *Ae.juvenalis*. Можно предположить, что эти цитоплазмы в сочетании с ядром какой-либо другой линии пшеницы, обладающей повышенной способностью к регенерации зеленых растений, могли бы значительно увеличить получение как эмбриогенных пыльников, так и зеленых регенерантов.

4.3. Изучение генетической детерминации процесса пыльниковой гаплопродукции.

В системе тестерных скрещиваний озимых сортов с яровыми установлено, что все изучаемые признаки процесса гаплопродукции определялись генотипами как материнских, так и отцовских форм. Для расчета ОКС и СКС была использована четвертая модель Хеймана. В нашем опыте высокую ОКС по количеству эмбриогенных пыльников и новообразований имеют сорта Чайка, Юннат, Veery, Журавка и д114, среднюю — MN73157. По способности к регенерации зеленых растений выделились сорта Чайка, Veery, QT 4083 и д114. По выходу спонтанных дигаплоидов высоко ценными оказались сорта Одесская 16, Чайка, Veery и QT 4083.

По степени выраженности эффектов ОКС выявлены ценные доноры для увеличения эффективности пыльниковой гаплопродукции, которыми могут быть озимый сорт Чайка и яровые Veery и д114. Для повышения показателей начальных этапов гаплопродукции успешно могут быть использованы озимый сорт Юннат и яровые MN 73157 и Журавка. А для увеличения регенерационной способности может быть рекомендован яровой сорт QT 4083, для которого характерен и высокий уровень спонтанной диплоидизации регенерантов.

Сравнивая варианты ОКС и СКС по изучаемым признакам у каждого сорта, обнаружили, что показатель $\sigma_{СКС}^2$ во всех случаях выше $\sigma_{ОКС}^2$, что может свидетельствовать о преобладающей роли при наследовании гаплопродукционных признаков неаддитивных эффектов генов.

Для генетического анализа пыльниковой гаплопродукции провели скрещивания двух озимых сортов (Юннат и Альбатрос) и двух линий (1л и 2л), полученных из семян спонтанных дигаплоидов растений-регенерантов пыльниковой культуры. При наследовании эмбриогенной способности пыльников у 1л и 2л преобладающую роль

играют гены с доминантными и, возможно, эпистатическими эффектами: ($\sigma_{СКС}^2 > \sigma_{ОКС}^2$). У сортов Юннат и Альбатрос не менее важное значение имеют и гены с аддитивными эффектами. Кроме того, относительно большое значение $\sigma_{СКС}^2$ показывает, что 1л и 2л могут образовывать гибридные комбинации, характеризующиеся более высоким показателем эмбриогенной продуктивности, чем ожидается на основе средней ценности сортов, что было подтверждено полученными данными.

В детерминации эмбриогенной способности пыльников существенное значение имеет неаллельное взаимодействие. Коэффициент регрессии (0,033) указывает на наличие комплементарного эпистаза. Высокий положительный коэффициент корреляции (0,619) между средними значениями признака у родителей и ($V_{\text{г}} + W_{\text{г}}$) отражает направленное доминирование и указывает на то, что большее значение признака контролируется рецессивными генами. В этом случае наибольшим числом факторов, положительно определяющих признак, обладают 1л и 2л, имеющие наибольшую оценку эффекта ОКС. Это, очевидно, связано с тем, что 1л и 2л являются результатом отбора по данному признаку, а пыльники сортов Юннат и Альбатрос отбору в культуре *in vitro* еще не подвергались.

При детерминации регенерационной способности в пыльниковой культуре основная роль принадлежит генам с аддитивными эффектами у сорта Юннат, а у остальных изучавшихся форм преобладающую роль при наследовании данного признака играют гены с доминантными и эпистатическими эффектами ($\sigma_{СКС}^2 > \sigma_{ОКС}^2$).

Коэффициент корреляционной зависимости между получением регенерантов и наличием у генотипов соответствующих генов (0,012) указывает на разнаправленность действия генов.

Показатель ($(\sqrt{4ДН_1} + F) / \sqrt{4ДН_1} - F$) = 1,095 свидетельствует о разном соотношении доминантных и рецессивных генов у родительских генотипов. Асимметрия между доминантными и рецессивными генами в генотипах скрещиваемых сортов при ненаправленном доминировании приводит к искажению параметров, отражающих тип наследования.

ВЫВОДЫ

1. Сорта и гибриды мягкой пшеницы различаются по частоте пыльцевого эмбриогенеза, способности к регенерации и спонтанной диплоидизации, что свидетельствует о генотипической специфичности андрогенеза в культуре пыльников.

2. Этапы процесса пыльниковой гаплопродукции контролируются разными генетическими системами. Определено, что в использованных условиях частота пыльцевого эмбриогенеза и регенерационная способность пыльцевых новообразований определяются преимущественно неаддитивными эффектами генов. Лучшими донорами эмбриогенной способности пыльников являются линии, полученные в пыльниковой культуре и обладающие рецессивными генами, увеличивающими признак.

3. Наличие доминантного локуса *Vrn1* в генофонах Скороспелки 36 и *ripe Dirk* способствовало увеличению частоты формирования эмбриогенных пыльников, новообразований и регенерации из них растений. Названные показатели снижались у обоих сортов доминантным локусом *Vrn2*.

4. Линии Chinese Spring с цитоплазмами *Ae. sharonensis*, *Ae. biunciales*, *Ae. columnaris*, *Ae. koitschii*, *Ae. crassa* 4x и *Ae. crassa* 6x обладают повышенной эмбриогенной способностью пыльников, а цитоплазмы *Tr. dicoccoides*, *Tr. dicoccum*, *Ae. umbellulata*, *Ae. speltoides*, *Ae. variabilis*, *Ae. ventricosa* и *Ae. juvenalis* повышают частоту образования зеленых регенерантов.

5. Пыльцевые зерна при культивировании пыльников мягкой пшеницы могут, наряду с нормальным микроспорогенезом, переходить к спорофитному развитию или дегенерировать. Реализация программы спорофитного развития микроспор требует создания специфических условий *in vitro*. Обнаружено, что наличие в питательной среде для культивирования пыльников экзогенных ауксинов не является обязательным для реализации спорофитного пути.

6. Оптимизация температурно-световых условий и состава питательных сред позволяет повысить эффективность пыльниковой культуры мягкой пшеницы в 2-8 раз.

7. Удвоенные гаплоиды в пыльниковой культуре пшеницы возникают спонтанно со средней частотой 35%. Применение колхицина не повышает выход фертильных регенерантов.

8. Результаты биохимических и морфологических анализов свидетельствуют о гомозиготности дигаплоидов. Условия культивирования пыльников, новообразований и растений-регенерантов не индуцируют генетических изменений.

ЛНБ ім. В. Стефаніка
АН України

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Для повышения эффективности пыльниковой культуры рекомендуется использовать озимый сорт Чайка и яровые Veegu и d114. Для повышения показателей начальных этапов процесса гаплопродукции могут быть использованы озимый сорт Юнат и яровые MN 73157 и Журавка, а для увеличения регенерационной способности и уровня спонтанной диплоидизации – яровой сорт QT 4063.

2. Для получения гаплоидов предлагается выращивать донорные растения в полевых условиях и использовать лишь колосья верхнего яруса.

3. В практике массового получения гаплоидов предлагается использовать модифицированные среды для культивирования пыльников: Potato-2, обогащенную пролином (200мг/л), глутамином (200мг/л) при 10% концентрации сахарозы, и N-6 с такими же добавками и крахмалом (5г/л). Новообразования с первыми появившимися регенерантами рекомендуется культивировать в жидкой безгормональной среде в условиях короткого (10-час.) дня и пониженной (9°C ночью и 12°C днем) температуры. Переход из одних условий культивирования в другие должен осуществляться через адаптационный период (5-7 дней).

4. Для получения фертильных регенерантов в пыльниковой культуре пшеницы не рекомендуется применение колхицина.

5. Из сортовых образцов и гибридных форм, предоставленных селекционерами, получены гомозиготные линии, которые предложено использовать в селекционном процессе.

Список работ, опубликованных по теме диссертации:

1. Лукьянок С.Ф., Махновская М.Л., Игнатова С.А., Шерер Н.В. Значение условий выращивания в получении гаплоидов пшеницы и тритикале//Использование искусственного климата в селекционно-генетических исследованиях. Сб.науч.тр. – Одесса:ВСГИ, 1988. – С. 93-96.

2. Махновская М.Л., Лукьянок С.Ф., Шерер Н.В., Игнатова С.А. Влияние питательной среды на гаплопродукцию гибридов мягкой пшеницы//Тез.докл.Всес.конф. по биотехнологии злаковых культур. – Алма-Ата, 1988. – С. 12.

3. Лукьянок С.Ф., Шерер Н.В., Махновская М.Л., Игнатова С.А. Разработка технологии получения гаплоидов пшеницы посредством культуры пыльников//Тез.докл.Международ.конф.:Биология культу-

вируемых клеток и биотехнология. - Новосибирск, 1988. - С. 209-210.

4. Шерер Н.В., Козлов В.В. Получение растений-регенерантов мягкой пшеницы в культуре пыльников//Методы интенсификации селекционного процесса. Сб.науч.тр. - Одесса:ВСГИ, 1990. - С. 100-101.

5. Махновская М., Лукьяник С., Шерер Н., Игнатова С., Литвиченко Н., Максимов Н. Изучение условий культивирования пыльников пшеницы и тритикале с целью повышения эффективности гаплопродук. и//Вопросы селекции и генетики зерновых культур. Сб.КОЦ стран-членов СЭВ. - Берлин, 1990. - вып.4. - С.67-76.

6. Шерер Н.В. Оценка комбинационной способности яровых и озимых сортов мягкой пшеницы по показателям гаплопродукции в пыльниковой культуре//Современные проблемы генетики и селекции сельскохозяйственных растений. Сб.науч.тр. - Одесса, 1991. С. 151-152.

7. Шерер Н.В. Влияние условий выращивания донорных растений пшеницы на эффективность пыльниковой гаплопродукции//Матер.науч.конф.по сельхоз.биотехн. - Целиноград, 1991. - С. 57-58.

Библиотека Целиноградского государственного университета
Учен. зап. кн. зап. Целиноград. ун-та. 1991. 100 экз.
Библиотечный отдел Целиноградского государственного университета
Целиноград

Полп.к печати 29.03.93г. Формат 60x84 I/16.
Об"ем 0,8уч.изд.л. I,25п.л. Заказ № 581. Тираж 100экз.
Гортипография Одесского управления по печати,цех№3.
Ленина 49.

465-403

Ab 27.086

AB 27.086

Handwritten text at the bottom of the page, likely bleed-through from the reverse side. The text is faint and mostly illegible, but appears to contain several lines of information, possibly a date and a name.