

ISSN: 2658-6266 (Print)

ISSN: 2658-6258 (Online)

БИОТЕХНОЛОГИЯ И СЕЛЕКЦИЯ РАСТЕНИЙ

2(2), 2019



МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР ВСЕРОССИЙСКИЙ
ИНСТИТУТ ГЕНЕТИЧЕСКИХ РЕСУРСОВ РАСТЕНИЙ
ИМЕНИ Н.И. ВАВИЛОВА (ВИР)



THE MINISTRY OF SCIENCE AND HIGHER
EDUCATION OF THE RUSSIAN FEDERATION
FEDERAL RESEARCH CENTER
THE N.I. VAVILOV ALL-RUSSIAN INSTITUTE OF
PLANT GENETIC RESOURCES (VIR)

НАУЧНЫЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

БИОТЕХНОЛОГИЯ И СЕЛЕКЦИЯ РАСТЕНИЙ

2019, 2 (2)

ОСНОВАН В 2018 ГОДУ
ПЕРИОДИЧНОСТЬ 4 РАЗА В ГОД

*Для биотехнологов, селекционеров,
генетиков, преподавателей вузов
биологического и сельскохозяйствен-
ного профиля.*

<https://biosel.elpub.ru/jour>
e-mail: pbi@vir.nw.ru

190000 Россия, г. Санкт-Петербург,
ул. Б. Морская, 42, 44

© Федеральный исследовательский центр
Всероссийский институт генетических ресурсов
растений имени Н.И. Вавилова (ВИР)

DOI: 10.30901/2658-6266-2019-2
УДК: 573.6:631.527

ПИ № ФС 77–74475
ISSN: 2658-6266 (Print)
ISSN: 2658-6258 (Online)

Используемая на обложке фотография представлена:
© Б. Р. Кулуевым, Н. Д. Минченковым, Г. Р. Гумеровой
(Россия, Уфа).

SCIENTIFIC PEER REVIEWED JOURNAL

PLANT BIOTECHNOLOGY AND BREEDING

2019, 2 (2)

FOUNDED IN 2018
PUBLISHED 4 TIMES ANNUALLY

*Addressed to biotechnologists, geneticists,
plant breeders and lecturers of biological
and agricultural universities and colleges.*

<https://biosel.elpub.ru/jour>
e-mail: pbi@vir.nw.ru

42, 44 Bolshaya Morskaya Street,
St. Petersburg 190000, Russia

© Federal Research Center the N.I. Vavilov
All-Russian Institute of Plant Genetic Resources
(VIR)

Главный редактор:

Е. К. Хлесткина – д.б.н., профессор РАН.

Заместитель главного редактора:

Т. А. Гавриленко – д.б.н.

Ответственные секретари:

И. Н. Анисимова – д.б.н.

Л. Ю. Новикова – д.с.-х.н.

Редакционный совет:

А. И. Абугалиева – д.б.н. (Казахстан)
О. С. Афанасенко – д.б.н., академик РАН (Россия)
Г. А. Баталова – д.с.-х.н., академик РАН (Россия)
Р. К. Берсимбаев – д.б.н., академик НАН РК (Казахстан)
Л. А. Беспалова – д.с.-х.н., академик РАН (Россия)
А. И. Грабовец – д.с.-х.н., чл.-корр. РАН (Россия)
С. И. Гриб – д.с.-х.н., академик НАНБ (Беларусь)
Е. А. Егоров – д.э.н., академик РАН (Россия)
В. Г. Еремин – д.с.-х.н., профессор РАН (Россия)
Г. В. Еремин – д.с.-х.н., академик РАН (Россия)
Г. И. Карлов – д.б.н., чл.-корр. РАН (Россия)
А. В. Кильчевский – д.б.н., академик НАНБ (Беларусь)
З. А. Козловская – д.с.-х.н. (Беларусь)
Н. А. Колчанов – д.б.н., академик РАН (Россия)
В. Н. Корзун – д-р (Германия)
А. В. Кочетов – д.б.н., чл.-корр. РАН (Россия)
Н. В. Кухарчик – д.с.-х.н. (Беларусь)
В. М. Лукомец – д.с.-х.н., академик РАН (Россия)
Л. А. Лутова – д.б.н. (Россия)
С. Мишева – д-р (Болгария)
А. И. Моргунов – д-р (Турция)
В. Ройчев – д.с.-х.н. (Болгария)
А. А. Романенко – д.с.-х.н., академик РАН (Россия)
А. В. Рындин – д.с.-х.н., академик РАН (Россия)
Е. Н. Седов – д.с.-х.н., академик РАН (Россия)
К. Г. Скрябин – д.б.н., академик РАН (Россия)
И. А. Тихонович – д.б.н., академик РАН (Россия)
П. Н. Харченко – д.б.н., академик РАН (Россия)
Л. В. Хотылева – д.б.н., академик НАНБ (Беларусь)
В. К. Шумный – д.б.н., академик РАН (Россия)

Редакционная коллегия:

Е. Е. Андронов – к.б.н. (Россия)
Д. А. Афонников – к.б.н. (Россия)
А. Х. Баймиев – д.б.н. (Россия)
И. А. Белан – к.с.-х.н. (Россия)
А. Г. Беседин – к.с.-х.н. (Россия)
М. А. Вишнякова – д.б.н. (Россия)
В. А. Гаврилова – д.б.н. (Россия)
С. В. Гаркуша – д.с.-х.н. (Россия)
Т. А. Гасанова – к.с.-х.н. (Россия)
С. В. Герасимова – к.б.н. (Россия)
М. С. Гинс – д.б.н., чл.-корр. РАН (Россия)
С. В. Гончаров – д.б.н. (Россия)
Р. О. Давоян – д.б.н. (Россия)
Я. Н. Демуринов – д.б.н. (Россия)
М. Г. Дивашук – к.б.н. (Россия)
С. Н. Еланский – д.б.н. (Россия)
О. В. Еремина – д.с.-х.н. (Россия)
А. П. Ермишин – д.б.н. (Беларусь)
М. В. Ефимова – к.б.н. (Россия)
Р. Ш. Заремук – д.с.-х.н. (Россия)
С. В. Зеленцов – д.с.-х.н. (Россия)
Е. Т. Ильницкая – к.б.н. (Россия)
Р. Н. Календарь – к.б.н. (Казахстан)
Н. Н. Карпун – к.б.н. (Россия)
В. С. Ковалев – д.с.-х.н. (Россия)
Н. Н. Коваленко – д.б.н. (Россия)
Е. З. Кочиева – д.б.н. (Россия)
Б. Р. Кулуев – д.б.н. (Россия)
К. У. Куркиев – д.б.н. (Россия)
С. В. Кушнаренко – к.б.н. (Казахстан)
И. Н. Леонова – д.б.н. (Россия)
И. Е. Лихенко – д.с.-х.н. (Россия)
В. В. Лиховской – д.с.-х.н. (Россия)
П. Н. Мальчиков – д.с.-х.н. (Россия)
Т. В. Матвеева – д.б.н. (Россия)
Н. В. Мироненко – д.б.н. (Россия)
И. В. Митрофанова – д.б.н. (Россия)
С. В. Осипова – д.б.н. (Россия)
В. Н. Подорожный – к.с.-х.н. (Россия)
Т. Г. Причко – д.с.-х.н. (Россия)
Т. А. Рожмина – д.б.н. (Россия)
А. В. Смыков – д.с.-х.н. (Россия)
А. А. Соловьев – д.б.н., профессор РАН (Россия)
И. И. Супрун – к.б.н. (Россия)
Е. К. Турусбеков – к.б.н. (Казахстан)
Е. В. Ульяновская – д.с.-х.н. (Россия)
О. Ю. Урбанович – д.б.н. (Беларусь)
Ю. В. Фотев – к.с.-х.н. (Россия)
Э. Б. Хатефов – д.б.н. (Россия)
Я. А. Цепилов – к.б.н. (Россия)
М. Н. Шаптуренко – д.б.н. (Беларусь)
О. Ю. Шоева – к.б.н. (Россия)
Л. А. Эльконин – д.б.н. (Россия)
Г. В. Якуба – к.б.н. (Россия)

Editor-in-Chief:

E. K. Khlestkina – Dr. Sci. in Biol., Professor.

Deputy Editor-in-Chief:

T. A. Gavrilenko – Dr. Sci. in Biol.

Executive Secretaries:

I. N. Anisimova – Dr. Sci. in Biol.

L. Yu. Novikova – Dr. Sci. in Agricul.

Editorial council:

A. I. Abugalieva – Dr. Sci. in Biol. (Kazakhstan)
O. S. Afanasenko – Dr. Sci. in Biol., Full Member of the RAS (Russia)
G. A. Batalova – Dr. Sci. in Agricul., Full Member of the RAS (Russia)
R. K. Bersimbaev – Dr. Sci. in Biol., Full Member of the NAS RK (Kazakhstan)
L. A. Bespalova – Dr. Sci. in Agricul., Full Member of the RAS (Russia)
E. A. Egorov – Dr. Sci. in Econ., Full Member of the RAS (Russia)
G. V. Eremin – Dr. Sci. in Agricul., Full Member of the RAS (Russia)
V. G. Eremin – Dr. Sci. in Agricul., Professor (Russia)
A. I. Grabovets – Dr. Sci. in Agricul., Corr. Member of the RAS (Russia)
S. I. Grib – Dr. Sci. in Agricul., Full Member of the NAS of Belarus (Belarus)
G. I. Karlov – Dr. Sci. in Biol., Corr. Member of the RAS (Russia)
P. N. Kharchenko – Dr. Sci. in Biol., Full Member of the RAS (Russia)
L. V. Khotyleva – Dr. Sci. in Biol., Full Member of the NAS of Belarus (Belarus)
A. V. Kilchevsky – Dr. Sci. in Biol., Corr. Member of the NAS of Belarus (Belarus)
A. V. Kochetov – Dr. Sci. in Biol., Corr. Member of the RAS (Russia)
N. A. Kolchanov – Dr. Sci. in Biol., Full Member of the RAS (Russia)
V. N. Korzun – Dr. (Germany)
Z. A. Kozlovskaya – Dr. Sci. in Agricul. (Belarus)
N. V. Kukharchik – Dr. Sci. in Agricul. (Belarus)
V. M. Lukomets – Dr. Sci. in Agricul., Full Member of the RAS (Russia)
L. A. Lutova – Dr. Sci. in Biol. (Russia)
S. Misheva – Dr. (Bulgaria)
A. I. Morgunov – Dr. (Turkey)
A. A. Romanenko – Dr. Sci. in Agricul., Full Member of the RAS (Russia)
V. Roychev – Dr. Sci. in Agricul. (Bulgaria)
A. V. Ryndin – Dr. Sci. in Agricul., Full Member of the RAS (Russia)
E. N. Sedov – Dr. Sci. in Agricul., Full Member of the RAS (Russia)
V. K. Shumny – Dr. Sci. in Biol., Full Member of the RAS (Russia)
K. G. Skryabin – Dr. Sci. in Biol., Full Member of the RAS (Russia)
I. A. Tikhonovich – Dr. Sci. in Biol., Full Member of the RAS (Russia)

Editorial board:

D. A. Afonnikov – Cand. Sci. in Biol. (Russia)
E. E. Andronov – Cand. Sci. in Biol. (Russia)
A. H. Bajmiev – Dr. Sci. in Biol. (Russia)
I. A. Belan – Cand. Sci. in Agricul. (Russia)
A. G. Besedin – Cand. Sci. in Agricul. (Russia)
R. O. Davoyan – Dr. Sci. in Biol. (Russia)
Ya. N. Demurin – Dr. Sci. in Biol. (Russia)
M. G. Divashuk – Cand. Sci. in Biol. (Russia)
M. V. Efimova – Cand. Sci. in Biol. (Russia)
S. N. Elansky – Dr. Sci. in Biol. (Russia)
L. A. Elkonin – Dr. Sci. in Biol. (Russia)
O. V. Eremina – Dr. Sci. in Agricul. (Russia)
A. P. Ermishin – Dr. Sci. in Biol. (Belarus)
Yu. V. Fotev – Cand. Sci. in Agricul. (Russia)
S. V. Garkusha – Dr. Sci. in Agricul. (Russia)
T. A. Gasanova – Cand. Sci. in Agricul. (Russia)
V. A. Gavrilova – Dr. Sci. in Biol. (Russia)
S. V. Gerasimova – Cand. Sci. in Biol. (Russia)
M. S. Gins – Dr. Sci. in Biol., Corr. Member of the RAS (Russia)
S. V. Goncharov – Dr. Sci. in Biol. (Russia)
E. T. Il'nitskaya – Cand. Sci. in Biol. (Russia)
R. N. Kalendar – Cand. Sci. in Biol. (Kazakhstan)
N. N. Karpun – Cand. Sci. in Biol. (Russia)
E. B. Khatefov – Dr. Sci. in Biol. (Russia)
E. Z. Kochieva – Dr. Sci. in Biol. (Russia)
N. N. Kovalenko – Dr. Sci. in Biol. (Russia)
V. S. Kovalev – Dr. Sci. in Agricul. (Russia)
B. R. Kuluev – Dr. Sci. in Biol. (Russia)
K. U. Kurkiev – Dr. Sci. in Biol. (Russia)
S. V. Kushnarenko – Cand. Sci. in Biol. (Kazakhstan)
I. N. Leonova – Dr. Sci. in Biol. (Russia)
I. E. Lihenkov – Dr. Sci. in Agricul. (Russia)
V. V. Likhovskoi – Dr. Sci. in Agricul. (Russia)
P. N. Malchikov – Dr. Sci. in Agricul. (Russia)
T. V. Matveeva – Dr. Sci. in Biol. (Russia)
N. V. Mironenko – Dr. Sci. in Biol. (Russia)
I. V. Mitrofanova – Dr. Sci. in Biol. (Russia)
S. V. Osipova – Dr. Sci. in Biol. (Russia)
V. N. Podorozhniy – Cand. Sci. in Agricul. (Russia)
T. G. Prichko – Dr. Sci. in Agricul. (Russia)
T. A. Rozhmina – Dr. Sci. in Biol. (Russia)
M. N. Shapturenko – Dr. Sci. Biology (Belarus)
O. Yu. Shoeva – Cand. Sci. in Biol. (Russia)
A. V. Smykov – Dr. Sci. in Agricul. (Russia)
A. A. Soloviev – Dr. Sci. in Biol., Professor (Russia)
I. I. Suprun – Cand. Sci. in Biol. (Russia)
Ya. A. Tsepilov – Cand. Sci. in Biol. (Russia)
E. K. Turuspekov – Cand. Sci. in Biol.
E. V. Ulyanovskaya – Dr. Sci. in Agricul. (Russia)
O. Yu. Urbanovich – Dr. Sci. in Biol. (Belarus)
M. A. Vishnyakova – Dr. Sci. in Biol. (Russia)
G. V. Yakuba – Cand. Sci. in Biol. (Russia)
R. Sh. Zaremuk – Dr. Sci. in Agricul. (Russia)
S. V. Zelentsov – Dr. Sci. in Agricul. (Russia)

Содержание

ОТ ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА 5

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ 6

*Пенева Т. И., Мартыненко Н. М.,
Кудрявцева Е. Ю.*

АНАЛИЗ ПО СПЕКТРАМ
ГЛИАДИНА ГЕНЕТИЧЕСКОЙ
СТРУКТУРЫ УСТОЙЧИВЫХ
К БУРОЙ РЖАВЧИНЕ ОБРАЗЦОВ
ТРИТИКАЛЕ ИЗ КОЛЛЕКЦИИ ВИР

ОБЗОР (МЕТОДИЧЕСКАЯ СТАТЬЯ) 33

*Кулуев Б. Р., Минченков Н. Д.,
Гумерова Г. Р.*

КОК-САГЫЗ (*TARAXACUM
KOK-SAGHYZ* RODIN): МЕТОДЫ
ВЫДЕЛЕНИЯ КАУЧУКА И ПЕР-
СПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ БИО-
ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПОДХОДОВ

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ 14

*Рсалиев А. С., Гульятеева Е. И., Шайдаюк Е. Л.,
Коваленко Н. М., Молдажанова Р. А.,
Пахратдинова Ж. У.*

ХАРАКТЕРИСТИКА УСТОЙЧИВО-
СТИ ПЕРСПЕКТИВНЫХ ОБРАЗЦОВ
ЯРОВОЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ
К ЛИСТОСТЕБЕЛЬНЫМ БОЛЕЗНЯМ

ОБЗОР (ОБЗОР ПРОБЛЕМЫ) 44

*Дьячук Т. И., Акинина В. Н.,
Хомякова О. В., Калашникова Э. В.*

ОТДАЛЕННАЯ ГИБРИДИЗАЦИЯ
КАК МЕТОД ПОЛУЧЕНИЯ
ГАПЛОИДНЫХ РАСТЕНИЙ
У ЗЛАКОВ

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ 24

Михайлов М. Э.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ МЕТОДА
ВОЗВРАТНЫХ СКРЕЩИВАНИЙ
В ДИГАПЛОИДНОЙ СЕЛЕКЦИИ
КУКУРУЗЫ

Contents

FROM THE EDITOR IN CHIEF 5

ORIGINAL ARTICLE 6

*Peneva T. I., Martynenko N. M.,
Kudryavtseva E. Yu.*

GENETIC STRUCTURE ANALYSIS
OF LEAF RUST RESISTANT TRITICA-
LE ACCESSIONS FROM THE VIR COL-
LECTION USING GLIADIN PATTERNS

ORIGINAL ARTICLE 14

*Rsaliyev A. S., Gulyaeva E. I., Shaydayuk E. L.,
Kovalenko N. M., Moldazhanova R. A.,
Pahratdinova Z. U.*

CHRACTERISTIC OF PERSPECTIVE
COMMON SPRING WHEAT
ACCESSIONS FOR RESISTANCE
TO FOLIAR DISEASES

ORIGINAL ARTICLE 24

Mikhailov M. E.

EFFICIENCY OF THE BACKCROSSING
METHOD IN DIHAPLOID MAIZE
BREEDING

REVIEW 33

*Kuluev B. R., Minchenkov N. D.,
Gumerova G. R.*

RUSSIAN DANDELION (*TARAXACUM
KOK-SAGHYZ* RODIN): RUBBER
EXTRACTION METHODS AND
PROSPECTS FOR
BIOTECHNOLOGICAL METHODS
APPLICATION

REVIEW 44

*Djatchouk T. I., Akinina V. N.,
Khomyakova O. V., Kalashnikova E. V.*

DISTANT HYBRIDIZATION AS A
METHOD OF HAPLOID
PRODUCTION IN CEREALS



Уважаемые читатели!

Представляем вашему вниманию очередной выпуск нового рецензируемого научного журнала «Биотехнология и селекция растений».

Открывают выпуск работы авторов из России и Казахстана, посвященные характеристике сортов и перспективных линий тритикале и пшеницы при помощи белковых и ДНК-маркеров в контексте изучения устойчивости к листовостебельным болезням.

Полученные результаты могут найти применение далее в селекционном процессе. В частности, в работе А. С. Рсалиева с соавторами при помощи маркер-контролируемого отбора получены линии пшеницы, которые рекомендованы авторами в качестве доноров для селекции.

В следующей статье представлены результаты исследований в направлении дигаплоидной селекции кукурузы, которые ведутся в Институте генетики, физиологии и защиты растений (Республика Молдова). Отмечается, что в дигаплоидной селекции кукурузы перспективно использование возвратных скрещиваний отобранных ДН-линий из разных циклов с исходным материалом или с гибридами первого поколения.

Теме дигаплоидов в селекции посвящена и обзорная статья, подготовленная авторами из НИИ сельского хозяйства Юго-Востока. Рассмотрены вопросы получения гаплоидных растений у колосовых злаков – ячменя, мягкой и твердой пшеницы, тритикале – с использованием метода отдаленной гибридизации с последующей селективной элиминацией хромосом вида-опылителя и методов культуры *in vitro* пыльников и микроспор.

Применение биотехнологических методов в селекции крайне актуально сегодня для улучшения не только продовольственных, но и технических культур. Изучение технических культур всегда лежит в плоскости междисциплинарных исследований, селекционная работа ведется рука обо руку с совершенствованием химических и физических методов переработки растительного сырья. Такой обзор в междисциплинарной плоскости на стыке биотехнологии и химии представлен в настоящем выпуске и посвящен растению-каучуконосу – кок-сагызу.

Обращаем внимание наших читателей и авторов на новый сайт журнала (<https://biosel.elpub.ru/jour>), предназначенный не только для знакомства с опубликованными работами, но и для подачи рукописей в режиме онлайн. Редакция приветствует сопровождение текстов статей цветным иллюстративным материалом, дополнительными электронными приложениями, которые могут включать объемные таблицы, фото- и видеоматериалы. Мы работаем над сокращением срока от принятия статьи к публикации до ее выхода в печать, для того чтобы научные достижения наших авторов были как можно скорее донесены до читательской аудитории, и предлагаем возможность публиковать статьи с присвоенным индексом doi в режиме онлайн (online first) до издания печатного номера.

В 2019 г. организация-учредитель нашего журнала – ВИР имени Н. И. Вавилова – отмечает свое 125-летие. К юбилею со дня основания ВИР приурочена Международная конференция «125 лет прикладной ботаники в России», которая состоится 25–28 ноября 2019 года в Санкт-Петербурге (<https://www.vir.nw.ru/blog/2019/02/15/125aplbobotanyvir/>). От лица учредителя приглашаем наших читателей принять участие в юбилейном мероприятии!

Главный редактор,
профессор РАН,
Е. К. Хлесткина

АНАЛИЗ ПО СПЕКТРАМ ГЛИАДИНА ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ УСТОЙЧИВЫХ К БУРОЙ РЖАВЧИНЕ ОБРАЗЦОВ ТРИТИКАЛЕ ИЗ КОЛЛЕКЦИИ ВИР

Пенева Т. И., Мартыненко Н. М., Кудрявцева Е. Ю.

Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н. И. Вавилова (ВИР), 190000, Россия, Санкт-Петербург, ул. Б. Морская, д. 42, 44;
✉ vir.peneva@gmail.com

Регистрация спектров глиаина ценных коллекционных образцов из коллекции Всероссийского института генетических ресурсов растений им. Н. И. Вавилова (ВИР) в виде «белковых формул» дает надежную информацию для составления «белкового паспорта» каждого образца, удобна для хранения и компьютерной обработки и позволяет контролировать сохранность оригинальности образцов в процессе репродукции и использования в селекции. В изучение были вовлечены 17 образцов тритикале, выделенные по устойчивости к бурой ржавчине. Анализ проводили на единичных зерновках оригинальных образцов (выборка 13–26 зерновок) по стандартной методике, принятой в ВИР и утвержденной Международной ассоциацией по семенному контролю (ISTA). Зарегистрированы спектры глиаина тритикале в виде «белковых формул», дана оценка полиморфизма каждого образца и генетического разнообразия в пределах данной коллекции; по маркерным компонентам установлена генетическая структура образцов. Обнаружено большое разнообразие генотипов, что открывает возможность отбора образцов, сочетающих устойчивость с другими полезными признаками. Выявлены стабильные и полиморфные образцы, включающие от двух до семи биотипов. Наличие межбиотипных гибридов и рекомбинантных генотипов в составе некоторых полиморфных образцов свидетельствует о нестабильности их генетической структуры и продолжающемся формообразовательном процессе. Это связано с неоднородностью исходных родительских форм, склонностью к перекрестному опылению и недостаточной селекционной проработкой. Данные о структуре генотипов тритикале могут быть использованы в интрогрессивной селекции для контроля переноса генетического материала ржи в сорта пшеницы с целью повышения их иммунитета и устойчивости к неблагоприятным факторам.

Ключевые слова: тритикале, устойчивость к бурой ржавчине, спектр глиаина, регистрация, генетическое разнообразие, маркирование.

Прозрачность финансовой деятельности / The transparency of the financial activities Автор не имеет финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах.

Авторы благодарят рецензентов за их вклад в экспертную оценку этой работы / The authors thank the reviewers for their contribution to the peer review of this work

Дополнительная информация / Additional information Полные данные этой статьи доступны / Extended data is available for this paper at <https://doi.org/10.30901/2658-6266-2019-2-6-13>

Мнение журнала нейтрально к изложенным материалам, авторам и их месту работы / The journal's opinion is neutral to the presented materials, the author, and his or her employer

Все авторы одобрили рукопись / All authors approved the manuscript

Конфликт интересов отсутствует / No conflict of interest

GENETIC STRUCTURE ANALYSIS OF LEAF RUST RESISTANT TRITICALE ACCESSIONS FROM THE VIR COLLECTION USING GLIADIN PATTERNS

Peneva T. I., Martynenko N. M., Kudryavtseva E. Yu.

N. I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), 42–44 Bolshaya Morskaya St., St. Petersburg 190000, Russia;
✉ vir.peneva@gmail.com

The gliadin banding patterns of important accessions from the collection of the N. I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR) registered in the form of “protein formulas” provide reliable information for the preparation of a “protein passport” for each accession and is convenient for storage and computer processing. It helps to control originality and integrity of accessions during regeneration and their use in breeding. The study involved 17 triticale accessions resistant to leaf rust. The analysis was carried out on single grains of the original accession (a sample of 13–26 kernels) according to the standard protocol adopted by VIR and approved by the International Seed Testing Association (ISTA). The gliadin electrophoretic banding patterns of triticale accessions were registered in the form of “protein formulas”; polymorphism of each accession and genetic diversity within the collection were estimated, and genetic structure of accessions was identified based on the marker protein components. A large variety of the revealed genotypes opens a possibility to identify accessions that combine resistance with other useful traits. Stable and polymorphic accessions including from 2 to 7 biotypes were found. The discovery of interbiotype hybrids and recombinant genotypes in the composition of some polymorphic accessions indicates the instability of their genetic structure and the ongoing formation process. This is due to the heterogeneity of the original parental forms, the tendency to cross-pollination and insufficiently thorough selection. The data on the triticale genotypic structure can be used in introgressive breeding to control the transfer of rye genetic material to wheat varieties in order to increase their immunity and resistance to adverse factors.

Key words: triticale, leaf rust resistance, gliadin banding pattern, registration, genetic diversity, marking.

Для цитирования: Пенева Т. И., Мартыненко Н. М., Кудрявцева Е. Ю. Анализ по спектрам глиаина генетической структуры устойчивых к бурой ржавчине образцов тритикале из коллекции ВИР. Биотехнология и селекция растений. 2019;2(2):6–13. DOI: 10.30901/2658-6266-2019-2-6-13

For citation: Peneva T. I., Martynenko N. M., Kudryavtseva E. Yu. Genetic structure analysis of leaf rust resistant triticale accessions from the VIR collection using gliadin patterns. Plant Biotechnology and Breeding. 2019;2(2):6–13. (In Russ.) DOI: 10.30901/2658-6266-2019-2-6-13

УДК 633.19:547.96:543.545.2

Поступила в редакцию: 16.04.2019

Принята к публикации: 11.06.2019

Введение

В связи с появлением в производственных посевах тритикале эпифитотий бурой листовой ржавчины возникла необходимость поиска в мировой коллекции ВИР новых источников устойчивости к бурой ржавчине. Совместно с Всероссийским институтом защиты растений был проведен скрининг 416 образцов тритикале на ювенильную устойчивость к бурой ржавчине, в результате которого 17 были выделены как источники устойчивости. (Mikhailova et al., 2009). Данные образцы получены с использованием сложных схем скрещивания, в результате чего возможно замещение отдельных хромосом геномов пшеницы хромосомами ржи, сопровождающееся перестройкой хромосомного аппарата. При этом замены хромосом и транслокации возникают в основном между геномами D и R, иногда встречаются образцы тритикале, включающие сегментарные образования и по линии геномов A и B. Хромосомы генома ржи в составе тритикале играют определяющую роль в обеспечении устойчивости к болезням. Число хромосом ржи у вторичных гексаплоидных тритикале может быть разным, но, как правило, присутствует хромосома 1R или ее короткое плечо 1RS, на котором картированы гены *LR26*, *Sr31*, *Yr9*, определяющие комплексную устойчивость к бурой, стеблевой и желтой ржавчинам, а также ряд генов адаптивности (Singh et al., 1990). Анализ наследования устойчивости к бурой ржавчине показал, что образцы данной коллекции могут иметь неидентичные гены устойчивости, что предполагает наличие у них значительного генетического разнообразия (Mikhailova et al., 2010). Для сохранения и успешного использования в селекции выявленных источников устойчивости необходимо изучить и зарегистрировать генетическую структуру каждого образца, определить особенности геномного и хромосомного состава. Это позволит выделить наиболее ценные образцы, сочетающие устойчивость к бурой ржавчине с другими полезными признаками и контролировать их сохранность в процессе репродукции и на разных этапах семеноводства.

В анализе генетических систем растений наряду с полевой апробацией и цитогенетическими методами успешно используется маркирование их с помощью ДНК и белков. Одной из главных предпосылок такого маркирования по белкам (принцип «отпечатков пальцев») является структурная и функциональная сопряженность всех генетических и морфогенетических процессов в организме (Konarev, 1983; 1998). В качестве белковых маркеров злаков хорошо зарекомендовали себя электрофоретические спектры проламина – множественного генетически полиморфного запасного белка эндосперма зерновки. Для пшеницы и тритикале это белок – глиадин, для ржи – секалин. Высокий полиморфизм, детальная изученность генетического контроля спектра проламина, простота и доступность стандартного мето-

да электрофореза, не требующего дорогостоящего оборудования, позволяет регистрировать в виде «белковых формул» отдельные генотипы, анализировать внутривидовую структуру различных злаков (в том числе пшеницы, ржи и тритикале), контролировать сохранение целостности и оригинальности образцов в процессе репродукции и в семеноводстве (Konarev et al., 1993; Konarev et al., 2000; Konarev A.V., 2006; Gubareva et al., 2015). К настоящему времени выполнен детальный анализ генетического разнообразия по спектрам глиадина у пшеницы и секалина у ржи. Изучению тритикале, устойчивых к бурой ржавчине, предшествовала значительная работа по идентификации, регистрации и оценке генетической структуры образцов различного происхождения и уровня плоидности с помощью белковых маркеров (Konarev, 2001; Peneva et al., 1993, 2009, 2016). Показано, что спектр глиадина тритикале контролируется первой и шестой группами гомеологичных хромосом геномов пшеницы и хромосомой 1R ржи. Выявлены компоненты и блоки компонентов, маркирующие отдельные хромосомы пшеницы и хромосому 1R ржи. Так, компонент $\alpha 6$ маркирует длинное плечо хромосомы 6D; дублет $\omega 89$ – хромосому 1D (точнее 1DS); $\omega 6\gamma 4$ – хромосому 1BS. Для всех типов спектра секалина ржи характерно наличие компонентов $\omega 234$ или $\omega 234\gamma 5$, иногда обозначаемых как блоки GLD1BS или 1B3, кодируемые сложным полигенным локусом *Sec1*, а в случае $\omega 234\gamma 5$ – дополнительно локусом *Sec4*. Последний был идентифицирован на хромосоме 1RS вблизи локуса *Sec1* и между ними выявлены межлокусные рекомбинации (Khmil, 1995). Блоки компонентов $\omega 234$ и $\omega 234\gamma 5$ представлены различными вариантами в зависимости от аллельного состояния кодирующих их генов, а также межгенных и межлокусных рекомбинаций (Peneva et al., 1994), что может влиять на активность генов устойчивости *Lr26*, *Sr31*, *Yr9*, находящихся в локусе *Sec1*. В связи с этим анализ и регистрация данных блоков в спектрах тритикале, устойчивых к бурой ржавчине, имеет особое значение.

В задачи настоящей работы входило: по электрофоретическим спектрам глиадина зарегистрировать в виде «белковых формул» 17 образцов тритикале, устойчивых к бурой ржавчине; дать оценку генетического разнообразия и выявить особенности генетической структуры каждого образца для последующего контроля сохранения их оригинальности в процессе репродукции и селекции.

Материал и методика исследования

В исследование были включены 17 наиболее ценных сортов и линий тритикале, устойчивых к двум агрессивным (дербентской и рождественской) популяциям бурой ржавчины. Это вторичные гексаплоидные тритикале (14 озимых и 3 яровых) различного эколого-географи-

ческого происхождения. Изученные образцы тритикале с указанием оригинаторов и места репродукции представлены в таблице, где ОС – материал, полученный от оригинатора, ДОС – из Дагестанской опытной станции ВИР – филиала ВИР. Выборка составляла 13–26 зерновок оригинального материала, а при его отсутствии использовали зерно наиболее ранних репродукций из коллекции ВИР.

Глиадин выделяли из индивидуальных зерновок и анализировали методом электрофореза в вертикальных пластинах 7,5% полиакриламидного геля (ПААГ) в ацетатном буфере pH 3,1 по стандартной методике, описанной в книге «Идентификация сортов и регистрация гено-

фонда культурных растений по белкам зерна» (Konarev et al., 2000). Идентификацию компонентов и запись спектров в виде «белковых формул» проводили по эталонному спектру в соответствии с принятой номенклатурой. В качестве эталона использовали сорт мягкой пшеницы Кавказ, так как в спектре глиадина данного сорта благодаря наличию транслокации 1BL.1RS, четко представлен блок компонентов $\omega 23_1 4\gamma 5$, маркирующий короткое плечо 1RS (Peneva et al., 2002). Спектры с одинаковым составом компонентов во всех зонах рассматривали как относящиеся к одному биотипу. Интенсивные компоненты подчеркивали снизу, слабые сверху. Субкомпоненты отмечали подстрочными индексами 1 и 2.

Таблица. Характеристика материала

Table. Characteristics of the material

№ по каталогу ВИР VIR Cat. No.	Сорт/образец Variety/Accession	Тип развития Development type	Оригинатор Origin	Место, год репродукции Regeneration place, year
к-454	ПРАГ 72	озимый	РФ, Дагестан	ДОС, 1978
к-1568	ПРАГ 126	яровой	РФ, Дагестан	ДОС, 1981
к-244	ПРАГ 60/1	озимый	РФ, Дагестан	ДОС, 1991
к-1350	ТГИ-8/1	озимый	РФ, Дагестан	ДОС, 1988
к-1364	ТГИ-17/1	озимый	РФ, Дагестан	ДОС, 1988
к-1569	ПРАГ 140/1	озимый	РФ, Дагестан	ДОС, 1984
к-3624	КН-88-109 Т 40-43	озимый	РФ, Краснодарский край	ДОС, 2002
к-1508	Тальва 100	озимый	РФ, Воронежская обл.	ОС, 1988
к-1507	Матырское	озимый	РФ, Воронежская обл.	ОС, 1988
к-3419	АД 52	озимый	Украина	ОС, 1977
к-1672	БГ-13	озимый	Белоруссия	ОС, 1988
к-3612	Kolor	озимый	Чехия	ДОС, 2002
к-1894	TF-123 Tj-1	озимый	Румыния	ДОС, 2005
к-1505	Картли 6	озимый	Грузия	ДОС, 1988
к-3634	AC Frank	яровой	Канада	ДОС, 1991
к-2203	Liebre "S"	яровой	США	ДОС, 1986
к-2336	Tapir "S"	яровой	Мексика	ДОС, 1991

Результаты и обсуждение

На рисунках 1–3 представлены электрофоретические спектры глиадина и «белковые формулы» 17 образцов тритикале, устойчивых к бурой ржавчине. Такая форма представления первичной информации, необходимой для составления «белкового паспорта» каждого образца, удобна для хранения и последующей компьютерной обработки. Практически все изученные сорта различают-

ся по компонентному составу спектров глиадина, что свидетельствует о генотипических различиях между ними и генетическом разнообразии данной коллекции. Анализ индивидуальных зерновок позволил определить уровень внутрипопуляционного полиморфизма каждого образца. В зависимости от числа биотипов в выборке выделены моно-, ди- и полиморфные сорта. Монотипные сорта (рис. 1) различаются между собой как по составу отдельных фракций, так и по спектру в целом, что четко отражено в белковых формулах.

СОРТ	Электрофоретический спектр глиадина				Белковая формула			
	ω	γ	β	α	α	β	γ	ω
Кавказ					5 67 ₁ 7 ₂	2 3 ₂ 45	23 5	2 3 ₁ 46 ₁ 8 ₂ 9 ₁
Liebre «S»					5 ₁ 7 ₁	23 ₁ 4 ₂ 5 ₁	1234 ₁	2346 ₁
Тарпін «S»					5 ₁ 7 ₁	23 ₁ 34 ₂ 5 ₁	1 3	234 6 ₁ 6 ₂ 7 ₁ 8 ₁
ТГИ 8/1					5 67 ₁ 7 ₂	2345	345	2 ₂ 346 ₁ 8 ₁
Матырское					67 ₁ 7 ₂	23 ₂ 45	1 34	2 ₂ 346 ₁ 7 ₁ 8 ₁ 8 ₂
TF-123 TJ 1					567 ₁ 7 ₂	23 45 ₁ 5 ₂	123 4 ₁ 5	2 346 ₁ 7 ₂
БГ-13					2 47 ₁ 7 ₂	23 ₂ 45 ₁	234 5	23 46 ₁ 6 ₂ 7 ₁
Kolor					67 ₁ 7 ₂	2345 ₁ 5 ₂	34 ₁ 5	23 46 ₁ 7 ₂ 8 ₁

Рис. 1. Электрофоретические спектры глиадина монотипных образцов тритикале и их «белковые формулы»

Fig. 1. Gliadin electrophoretic banding patterns of monotypic triticale accessions and their “protein formulas”

СОРТ	Биотип	Электрофоретический спектр глиадина				Белковая формула				% в выборке
		ω	γ	β	α	α	β	γ	ω	
Тальва 100	I					67 ₁ 7 ₂	2 3 ₂ 4 5	1 3	2 ₂ 3 4 6 ₁ 6 ₂ 7 ₁ 8 ₁	51
	II					67 ₁ 7 ₂	2 3 ₂ 4 5	134	2 ₂ 3 4 6 ₁ 6 ₂ 7 ₁ 8 ₁	49
КН – 88 -109Т 40 -43	I					347 ₁ 7 ₂	23 4 ₁ 5	2 3 5 ₁	2 ₂ 3 4 6 ₁ 6 ₂ 7 ₁ 8 ₁	85
	II					347 ₁ 7 ₂	234 ₁ 5	2 3 4 ₁ 5 ₁	2 ₂ 3 4 6 ₁ 6 ₂ 7 ₁	15
АС Frank	I					5 ₁ 7 ₁	2 3 4 5	3 4 ₁ 5 ₂	2 3 4 6 ₁ 7 ₁ 8 ₁	77
	II					5 ₁ 7 ₁	2 3 4 5 ₁	1 3 4 ₁	2 3 4 6 ₁ 7 ₁ 8 ₁	23
ПРАГ 126	I					6 7 ₁ 7 ₂	2 3 4 ₂ 5 ₁	1 24 ₂ 5	2 3 4 6 ₁ 6 ₂	54
	II					56 7 ₁ 7 ₂	2 3 4 ₂ 5 ₁	1 2 4 ₂ 5	2 3 4 6 ₁ 6 ₂	46
ТГИ 17/1	I					24	2345	14	2 3 4 6 ₁ 6 ₂ 8 ₁	15
	II					247 ₁	2 3 4 5	2 5	2 3 4 ₁ 6 ₁ 7 ₂ 8 ₁	85
АД 52	I					567 ₁ 7 ₂	2 3 4 5 ₁	1 234 ₁ 5	2 34 67 ₂ 8 ₁ 9 ₁	7
	II					567 ₁ 7 ₂	2 3 4	134	2 ₂ 3 ₁ 4 67 ₂ 8 ₁ 9 ₁	93
Кавказ	st					5 6 7 ₁ 7 ₂	2 3 4 5	2 3 5	2 3 ₁ 4 6 ₁ 8 ₁ 9 ₂	

Рис. 2. Электрофоретические спектры диморфных образцов тритикале, их «белковые формулы» и доли биотипов (в %) в исследуемых выборках

Fig. 2. Gliadin electrophoretic banding patterns of dimorphic triticale accessions, their “protein formulas” and percentage of biotypes within the studied samples

Исключение составляют Liebre "S" (США) и Tapir "S" (Мексика), имеющие идентичную α -зону, в которой четко представлены компоненты $\alpha 5_1 7_1$. Отсутствие внутривариационного полиморфизма у монотипных сортов свидетельствует об их стабильности. Однако такое заключение является в некоторой степени условным, так как на данном этапе были исследованы лишь небольшие выборки и при увеличении их размера могут быть выявлены дополнительные биотипы. Так, ПРАГ 60/1 сначала был включен в группу монотипных сортов, но при анализе большей выборки (26 зерновок) выделено еще несколько биотипов, один из которых имеет гибридное происхождение.

На рисунке 2 представлены образцы, в составе которых выявлено по два биотипа. Наряду со спектрами и их «белковыми формулами» указана доля каждого биотипа в выборке.

Биотипы в пределах образцов различаются по нали-

чию-отсутствию, а иногда только по интенсивности одного-двух компонентов в разных зонах спектра и, как правило, один из биотипов доминирует. Так, у АД 52 доминирующий биотип II отличается от биотипа I отсутствием слабых компонентов $\beta 5$, $\gamma 2$ и $\gamma 5$, также особой структурой маркерного блока $\omega 2_2 3_1 4$. Аналогичные различия отмечены и у других образцов. Особенностью КН-88-109 Т 40-43 является редко встречающееся в спектрах глинада сочетание очень слабых компонентов $\alpha 3 4 7_1 7_2$. У образца ТГИ-17/1 α -зона практически отсутствует. В составе ПРАГ 126 оба биотипа присутствуют примерно в равном соотношении и отличаются только по наличию/отсутствию слабого компонента $\alpha 5$, то есть данный сорт близок к монотипным образцам. У сорта Тальва 100 биотипы различаются по наличию слабого компонента $\gamma 4$, один из биотипов идентичен сорту Матырское.

СОРТ	Биотип	Электрофоретический спектр глинада				Белковая формула				% в выборке
		ω	γ	β	α	α	β	γ	ω	
Кавказ						$\overline{5} 6 7_1 7_2$	$2 3_2 4 5_1$	$2_2 3 5$	$2 \overline{3} 4_1 6_1 8_2 9_2$	
Картли 6	I					$\overline{6} 7_1 7_2$	$\overline{2} 3 4 5$	$\overline{1} 3 4_1$	$\overline{2}_2 \overline{3} 4_1 6_1 8_2 9_2$	78
	II					$\overline{6} 7_1 7_2$	$2 3 4 5_1$	$3 4_1 5_2$	$2 3 4_1 6_1 8_2 9_2$	14
	III					$\overline{6} 7_1$	$\overline{2} 3 4 5$	$1_1 3 4 5_2$	$2 3 4_1 6_1 8_2 9_2$	8
ПРАГ 60/1	I					$\overline{2} 4 7_1 7_2$	$\overline{2} 3 4_2 5_1$	$\overline{2} 4 5$	$\overline{2}_2 \overline{3} 4_1 6_1 7_1$	61
	II					$\overline{2} 4 6 7_1$	$\overline{2} 3_1 3 4_2 5_1$	$1 4 5$	$\overline{2}_2 \overline{3} 4_1 6_1 7_1$	4
	III					$\overline{2} 4 6 7_1 7_2$	$\overline{2} 3 4 5$	$\overline{1} 2 4 5$	$\overline{2}_2 \overline{3} 4_1 6_1 7_1$	9
	IV					$\overline{2} 4 7_1 7_2$	$\overline{2} 3 4 5_1$	$\overline{2} 4$	$\overline{2}_2 \overline{3} 4_1 6_1 7_1$	26
ПРАГ 72	I					$\overline{2} 4 6 7_1$	$\overline{1} 2 3_2 4 5_1$	$\overline{1} 2 3 4_1$	$\overline{2}_2 \overline{3}_1 4_1 6_1 7_1 8_1$	23
	II					$\overline{2} 4$	$\overline{2} 3_2 4 5_1$	$\overline{2} 4$	$\overline{2}_2 \overline{3} 4_1 6_1 7_1$	69
	III					$\overline{2} 4 6 7_1$	$\overline{1} 2 3_2 4 5$	$\overline{2} 3 4 5$	$\overline{2}_2 \overline{3} 4_1 6_1 7_1 8_1$	8
ПРАГ 140	I					$\overline{5} 6 7_1 7_2$	$\overline{2} 3 4_1 5$	$\overline{1} 2 4 5$	$\overline{1} 2 3 4_1 6_1 7_1$	31
	II					$\overline{5} 6 7_1 7_2$	$\overline{2} 3 4 5_1$	$\overline{2} 4 5$	$\overline{1} 2 3 4_1 6_1 7_1$	23
	III					$\overline{5} 6 7_1 7_2$	$\overline{2} 3 4 5_1$	$\overline{3}$	$\overline{1}_1 \overline{2} 3 4_1 6_1 7_1$	15
	IV					$\overline{5} 6 7_1 7_2$	$\overline{2} 3 4 5$	$3_1 5_2$	$\overline{1}_1 \overline{2} 3 4_1 6_1 7_1$	15

Рис. 3. Электрофоретические спектры политипных образцов тритикале, их «белковые формулы» и доли биотипов (в %) в исследуемой выборке

Fig. 3. Gliadin electrophoretic banding patterns of polytypic triticale accessions, their "protein formulas" and percentage of biotypes within the studied sample

Наиболее полиморфными (число биотипов в выборке 3–7) оказались сорта Картли 6, ПРАГ 60/1, ПРАГ 72, ПРАГ 140/1. Три из них получены на Дагестанской опытной станции ВИР путем сложных схем скрещивания различных образцов тритикале, пшеницы и ржи. При создании грузинского сорта Картли 6 использовали аборигенные пшеницы Грузии и более 200 разнообразных по происхождению образцов тритикале из мировой коллекции ВИР (Mikhailova et al., 2009). На рисунке 3 представлены электрофоретические спектры основных биотипов полиморфных сортов и их «белковые формулы».

Доля доминирующего биотипа сорта Картли 6 составляет 78%. Два других биотипа отличаются между собой и от основного биотипа. В составе ПРАГ 60/1 выявлено четыре биотипа. Из них лидирует по частоте (61%) биотип I. В спектрах всех биотипов компоненты α -зоны проявляются в виде следа. Биотип III, по всей вероятности, является гибридом между биотипами II и IV (см. рис. 3). ПРАГ 72 по спектрам близок к ПРАГ 60/1. У них практически одинакова α -зона, сходство имеется также по β - и ω -зонам. Доминирующий второй биотип, скорее всего, является межбиотипным гибридом. В выборке у ПРАГ 140/1 обнаружено семь биотипов, что свидетельствует о высоком внутривидовом полиморфизме данного образца. На рисунке 3 представлены спектры только четырех основных биотипов, остальные три имеют низкую частоту встречаемости и являются межбиотипными гибридами. Отдельные биотипы ПРАГ 140/1 по структуре α -зоны близки к сортам пшеницы Безостая 1 и Кавказ и по данному признаку отличаются от других рассматриваемых полиморфных сортов тритикале. В спектрах всех биотипов ПРАГ 140/1 наиболее вариабельна γ -зона. Наличие межбиотипных гибридов и рекомбинантных генотипов указывают на нестабильность генетической структуры полиморфных сортов данной коллекции тритикале и продолжающийся формообразовательный процесс. Причиной этого может быть разнородность исходного материала, склонность к перекрестному опылению и недостаточная селекционная проработка. Как видно на рисунке 3, спектры отдельных биотипов полиморфных сортов имеют несколько смазанный рисунок. Вероятно, это связано с незрелостью зерна, либо с проращиванием его в колосе.

Таким образом, регистрация спектров глиадина индивидуальных зерновок образцов тритикале, устойчивых к бурой ржавчине, выявила большое разнообразие генотипов. Выделены образцы, в спектрах которых присутствуют компоненты, указывающие на их возможное генетическое родство. Так, у Liebre "S" (США), Tapir "S" (Мексика) и AC Frank (Канада) в α -зоне спектра четко и интенсивно представлены компоненты $\alpha_5\gamma_1$ (см. рис. 1, 2), встречающиеся в спектрах мексиканских тетраплоидных пшениц. По-видимому, использование этих пшениц позволило создать стабильные сорта тритикале с такой структурой α -зоны. В спектрах образцов БГ-13,

ТГИ-17/1, ПРАГ 60/1, ПРАГ 72 присутствуют слабые по интенсивности компоненты α_{24} . Наличие таких компонентов в спектрах глиадина сортов пшеницы украинской селекции Мироновская 808, Одесская и других, отличающихся повышенной морозостойкостью (Gubareva et al., 2002), показывает на возможное участие этих пшениц в формировании данных сортов тритикале. Сходство сортов Тальва 100 и Матырское, вероятно, связано с особенностями исходного материала и методами селекции, используемыми в Воронежском селекцентре.

Анализ спектров глиадина тритикале по ранее выявленным маркерам хромосом пшеницы и ржи показал, что компоненты α -зоны, кодируемые локусами *Gld6A* и *Gld6D* на хромосомах 6A и 6D пшеницы, у образцов тритикале представлены по-разному. Отсутствие компонента α_6 в спектрах БГ-13, КН-88-109 Т 40-43, ТГИ-17/1, ПРАГ 60/1 (биотипы I и IV), ПРАГ 72 (биотип II) указывает на элиминацию хромосомы 6D или ее локуса *Gld6D*. В спектрах Liebre "S", Tapir "S" и AC Frank также отсутствует α_6 , что вполне объяснимо возможным участием в их создании тетраплоидных мексиканских пшениц. Проявление в виде следов компонентов α -зоны в спектрах многих образцов тритикале (см. рис. 1–3) может быть обусловлено подавлением активности глиадин-кодирующих локусов на хромосомах 6A и 6D.

Компоненты β -зоны контролируются хромосомами геномов пшеницы и хромосомой 1R ржи и по подвижности в спектре глиадина часто совпадают друг с другом. Поэтому данным методом электрофореза невозможно определить, из-за каких хромосомных перестроек происходят изменения интенсивности и сдвиг подвижности отдельных компонентов.

Состав компонентов γ -зоны значительно варьирует. У большинства образцов наряду блоком $\omega_6\gamma_4$, маркирующим хромосому 1B, а точнее ее короткое плечо 1BS, в спектре присутствуют маркеры хромосомы 1RS – компоненты ω_{234} или $\omega_{234}\gamma_5$. Это возможно при условии, если сорт является гетерозиготным по нормальной пшеничной хромосоме 1B и хромосоме, содержащей пшенично-ржаную транслокацию 1BL.1RS, или включает целую хромосому 1R (Peneva et al., 2002).

Во фракции ω -глиадина маркерами короткого плеча хромосомы 1D (1DS) являются компоненты ω_{89} и близкие им по подвижности аллельные варианты $\omega_{8_2}9_1$, $\omega_{8_1}9_2$ и другие. В спектрах обоих биотипов образца АД 52 присутствуют компоненты $\omega_{8_1}9_1$ у сорта Картли 6 (биотипы I и III) – $\omega_{8_1}9_2$ очень слабой интенсивности. Возможно, у этих образцов в незначительном количестве имеется материал хромосомы 1D пшеницы. Это важно, так как с хромосомой 1D связаны хлебопекарные качества пшеницы.

Особое значение в анализе тритикале по спектрам глиадина имеет идентификация генетического материала короткого плеча хромосомы 1R (1RS) ржи с помощью маркерного блока GLD1BS или 1B3 (компоненты ω_{234}

и $\omega 234\gamma 5$). Как видно на рисунках 1–3, данный маркерный блок присутствует в спектрах глинаина всех исследованных образцов тритикале в нескольких вариантах. Всего выявлено более 10 вариантов, различающихся по интенсивности отдельных компонентов, сдвигу по подвижности или наличию/отсутствию $\gamma 5$. Основные из них имеют следующие формулы: $\omega 234$, $\omega 23_1 4$, $\omega 2_2 34$, $\omega 2_2 3_1 4$, $\omega 234\gamma 5$, $\omega 23_1 4\gamma 5$, $\omega 2_2 34\gamma 5$. Наличие различных вариантов в первую очередь зависит от особенностей биотипов ржи, принимавших участие в формировании данных образцов тритикале. Играть роль также аллельное состояние генов, возможные межгенные рекомбинации в сложном локусе *Sec1*, а также межлокусные рекомбинации между *Sec1* и *Sec4*. Все это может оказывать влияние на характер проявления генов устойчивости, входящих в локус *Sec1*. Возможно, этим объясняются колебания по типу устойчивости от 0 до 3 у образцов тритикале данной коллекции (Mikhailova et al., 2010). Нельзя исключить взаимодействие генов устойчивости, локализованных на хромосоме 1RS, с генами устойчивости на других хромосомах ржи. Некоторые различия по типу устойчивости к бурой ржавчине можно также объяснить эпистатическими взаимодействиями между геномами пшеницы и ржи в генотипах тритикале, маркированных спектрами глинаина.

Необходимо отметить, что данные по анализу спектров глинаина образцов тритикале с помощью ранее установленных маркеров хромосом дают возможность контролировать наличие не только генов устойчивости, но и генов, ответственных за другие признаки. Так, в спектрах особенно полиморфных образцов тритикале часто встречаются маркерные блоки $\omega 2_2 34$ и $\omega 2_2 34\gamma 5$, характерные для биотипов ржи, несущих ген доминантной короткостебельности *Н1*. Наличие таких маркерных блоков в спектрах некоторых образцов тритикале, по всей вероятности, указывает на эффективное включение этого гена от доноров ЕМ-1, Малыш-72, Россиянка, используемых в селекции тритикале на Дагестанской опытной станции ВИР.

Выводы

Регистрация спектров глинаина образцов тритикале, устойчивых к бурой ржавчине, в виде «белковых формул» дает надежную информацию для составления «белкового паспорта» каждого образца и удобна для хранения и компьютерной обработки. Это позволит контролировать сохранность генетической структуры образцов в коллекции, при репродукции и в процессе семеноводства.

Выявлено генетическое разнообразие 17-ти исследованных образцов тритикале, что открывает возможность для отбора образцов с благоприятным сочетанием устойчивости с другими полезными признаками.

Определены образцы тритикале:

- со стабильной генетической структурой – Liebre "S" (к-2203); Tapir "S" (к-2336); ТГИ-8/1 (к-1350); Матырское (к-1507); TF-123 Tj-1 (к-1894); БГ-13 (к-1672); Kolor (к-3612);
- полиморфные, содержащие от двух до семи биотипов – Тальва 100 (к-1508); КН-88-109 Т 40-43 (к-3624); AC Frank (к-3634); ПРАГ 126 (к-1568); ТГИ-17/1 (к-1364); АД 52 (к-3419); Картли 6 (к-1505); ПРАГ 60/1 (к-244); ПРАГ 72 (к-454); ПРАГ 140/1 (к-1569).

Наличие межбиотипных гибридов и рекомбинантных генотипов в составе полиморфных образцов свидетельствует о нестабильности генетической структуры и продолжающемся формообразовательном процессе. Выявленный полиморфизм по спектрам глинаина указывает на необходимость исследования выборки большего размера для уточнения состава и исследования свойств отдельных биотипов.

Использование электрофоретических маркеров ряда хромосом, их плеч и отдельных локусов пшеницы и ржи расширяет возможности контроля включения отдельных генных комплексов родителей в гибриды в процессе гибридизации. Это позволит повысить эффективность селекционного процесса не только у тритикале, но и при интрогрессии генетического материала ржи во вновь создаваемые сорта пшеницы с целью повышения иммунитета и устойчивости к неблагоприятным факторам.

Работа выполнена в рамках государственного задания ВИР № 0662-2019-0006 «Поиск, поддержание жизнеспособности и раскрытие потенциала наследственной изменчивости мировой коллекции зерновых и крупяных культур ВИР для развития оптимизированного генбанка и рационального использования в селекции и растениеводстве».

Приносим глубокую благодарность сотрудникам отдела биохимии и молекулярной биологии ВИР Э. Э. Еггю и В. В. Васипову за помощь в оформлении рисунков.

References / Литература

- Gubareva NK, Alpatieva NV (2002) On the use of protein markers in the evaluation of frost-resistance of common winter wheat. *Agrarian Russia* 3: 31–34 [in Russian] (Губарева Н.К., Алпатьева Н.В., К вопросу об использовании белковых маркеров в оценке морозостойкости озимой мягкой пшеницы // Аграрная Россия. 2002. № 3. С. 31–34).
- Gubareva NK, Gavriljuk IP, Konarev AV (2015) Identification of crop varieties by the electrophoretic patterns of storage proteins. *Agrarian Russia* 11: 21–26 [in Russian] (Губарева Н.К., Гаврилюк И.П., Конарев А.В. Идентификация сортов сельскохозяйственных культур по электрофоретическим спектрам запасных белков // Аграрная Россия. 2015. № 11. С. 21–26).
- Khmil TO (1995) Genetic control of rye secalins (*Secale cereale* L.). Abstract of candidate's thesis. St. Petersburg: VIR. 16 p. [in Russian] (Хмель Т.О. Генетический контроль секалинов ржи (*Secale cereale* L.): автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.15. СПб.: ВИР, 1995. 16 с.).

- Konarev AV (2006) The use of molecular markers for solving problems of plant genetics resources and plant breeding. *Agrarian Russia* 6: 4–22 [in Russian] (Конарев А.В. Использование молекулярных маркеров в решении проблем генетических ресурсов растений и селекции // Аграрная Россия. 2006. № 6. С. 4–22).
- Konarev VG (1983) Plant proteins as genetic markers. Moscow: Kolos. 320 p. [in Russian] (Конарев В.Г. Белки растений как генетические маркеры. М.: Колос, 1983. 320 с.).
- Konarev VG (1998) Morphogenesis and molecular-biological analysis of plants. St. Petersburg: VIR. 376 p. [in Russian] (Конарев В.Г. Морфогенез и молекулярно-биологический анализ растений. СПб.: ВИР, 1998. 376 с.).
- Konarev VG (2001) Genomic and chromosomal analysis of triticale. In: Morphogenesis and Molecular Biological Analysis of Plants. 2nd ed. St. Petersburg: VIR. p. 277–283 [in Russian] (Конарев В.Г. Геномный и хромосомный анализ тритикале // Морфогенез и молекулярно-биологический анализ растений. 2-е изд. СПб.: ВИР, 2001. С. 277–283).
- Konarev VG, Gavriljuk IP, Gubareva NK et al. (1993) Theoretical Basis of Plant Breeding. Vol. 1. Molecular biological aspects of applied botany, genetics and plant breeding. VG Konarev (ed.). Moscow: Kolos. 447 p. [in Russian] (Конарев В.Г., Гаврилюк И.П., Губарева Н.К. и др. Теоретические основы селекции. Т. 1. Молекулярно-биологические аспекты прикладной ботаники, генетики и селекции / под ред. В. Г. Конарева. М.: Колос, 1993. 447 с.).
- Konarev VG, Gavriljuk IP, Gubareva NK et al. (2000) Identification of Varieties and Registration of the Cultivated Plants Genetic Diversity by Seed Proteins. St. Petersburg: VIR. 320 p. [in Russian] (Конарев В.Г., Гаврилюк И.П., Губарева Н.К. и др. Идентификация сортов и регистрация генофонда культурных растений по белкам семян. СПб.: ВИР, 2000. 320 с.).
- Konarev VG, Konarev AV, Gubareva NK, Peneva TI (2000) Seed proteins as markers in resolving the problems of genetic plant resources, breeding and seed production. *Cytology and Genetics* 34 (2): 91–104 [in Russian] (Конарев В.Г., Конарев А.В., Губарева Н.К., Пенева Т.И. Белки семян как маркеры в решении проблем генетических ресурсов растений, селекции и семеноводства // Цитология и генетика. 2000. Т. 34. № 2. С. 91–104).
- Mikhailova LA, Merezhko AF, Funtikova EYu (2009) Triticale diversity in leaf rust resistance. *Dokl. Russian Akad. Sel'skokhoz. Nauk* 5: 27–29 [in Russian] (Михайлова Л.А., Мережко А.Ф., Фунтикова Е.Ю. Разнообразие тритикале по устойчивости к бурой ржавчине // Доклады РАСХН. 2009. № 5. С. 27–29).
- Mikhailova LA, Merezhko AF, Funtikova EYu (2010) Genetic control of triticale leaf rust resistance. *Dokl. Russian Akad. Sel'skokhoz. Nauk* 2: 3–6 [in Russian] (Михайлова Л.А., Мережко А.Ф., Фунтикова Е.Ю. Генетический контроль устойчивости тритикале к бурой ржавчине // Доклады РАСХН. 2010. № 2. С. 3–6).
- Peneva TI, Khmil TO, Konarev VG (1994) Genetic control of rye secalins. *Rus. J. Genet.* 30: 118 [in Russian] (Пенева Т.И., Хмыль Т.О., Конарев В.Г. Генетический контроль секалинов ржи // Генетика. 1994. Т. 30. С. 118).
- Peneva TI, Kudryakova NV, Konarev VG (1993) Identification, registration and evaluation of the genetic structure of triticale. In: Molecular genetic aspects of applied botany, genetics and breeding. Moscow: Kolos. p. 175–192 [in Russian] (Пенева Т.И., Кудрякова Н.В., Конарев В.Г. Идентификация, регистрация и оценка генетической структуры тритикале // В кн.: Молекулярно-генетические аспекты прикладной ботаники, генетики и селекции. М.: Колос, 1993. С. 175–192).
- Peneva TI, Kudryavtseva EYu, Klimenkov FI (2016) Registration of the five released varieties of winter triticale based on gliadin spectra, analysis of identity and purity of the varieties in the process of seed production. In: Triticale: materials of the international scientific-practical conference “The role of triticale in stabilizing the grain and feeds production, and the utilization technologies”. 7–8 June 2016, Rostov-on-Don, Pt 1, p. 145–154 [in Russian] (Пенева Т.И., Кудрявцева Е.Ю., Клименков Ф.И. Регистрация по спектрам глиадина пяти районированных сортов озимой тритикале и анализ их подлинности и чистоты в процессе семеноводства // Тритикале: материалы международной научно-практической конференции «Роль тритикале в стабилизации производства зерна, кормов и технологии их использования», 7–8 июня 2016 г. Ростов-на-Дону, 2016. Ч. 1. С. 145–154).
- Peneva TI, Merezhko AF, Konarev AV (2009) Dynamics of the gliadin biotypes composition when creating the ‘Zolotoi Grebeshok’ variety of spring triticale. *Dokl. Russian Akad. Sel'skokhoz. Nauk* 1: 1–4 [in Russian] (Пенева Т.И., Мережко А.Ф., Конарев А.В. Динамика состава глиадиновых биотипов в процессе создания сорта яровой тритикале Золотой гребешок // Доклады Российской академии сельскохозяйственных наук. 2009. № 1. С. 1–4).
- Peneva TI, Mitrofanova OP, Konarev AV (2002) Protein markers in the analysis of genetic stability of wheat varieties containing rye 1R chromatin. *Agrarnaya Russia* 3: 35–40 [in Russian] (Пенева Т.И., Митрофанова О.П., Конарев А.В. Белковые маркеры в анализе генетической стабильности сортов пшеницы, содержащих хроматин 1R ржи // Аграрная Россия. 2002. № 3. С. 35–40).
- Singh NK, Shepherd KW, McIntosh RA (1990) Linkage mapping of genes for resistance to leaf, stem and stripe rusts and ω -secalins on the short arm of rye chromosome 1R. *Theor. Appl. Genet.* 80 (5): 609–616. DOI: 10.1007/BF00224219

ХАРАКТЕРИСТИКА УСТОЙЧИВОСТИ ПЕРСПЕКТИВНЫХ ОБРАЗЦОВ ЯРОВОЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ К ЛИСТОСТЕБЕЛЬНЫМ БОЛЕЗНЯМ

Рсалиев А. С.¹, Гульятеева Е. И.², Шайдаюк Е. Л.²,
Коваленко Н. М.², Молдажанова Р. А.¹,
Пахратдинова Ж. У.¹

CHARACTERISTIC OF PERSPECTIVE COMMON
SPRING WHEAT ACCESSIONS FOR RESISTANCE
TO FOLIAR DISEASES

Rsaliev A. S.¹, Gulytaeva E. I.²,
Shaydayuk E. L.², Kovalenko N. M.²,
Moldazhanova R. A.¹, Pahratdinova Z. U.¹

¹Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности,
080409, Казахстан, Жамбылская область, Кордайский район,
пос. Гвардейский;
✉ aralbek@mail.ru

¹Research Institute for Biological Safety Problems, Gvardeisky Village,
Kordaiskiy District, Zhambyl Province 080409, Kazakhstan;
✉ aralbek@mail.ru

²Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений,
196608, Россия, Санкт-Петербург, Пушкин, ш. Подбельского, д. 3;
✉ eigulytaeva@gmail.com

²All-Russian Institute of Plant Protection, Russia 3 Podbelskoko Shosse,
St. Petersburg 196608, Russia;
✉ eigulytaeva@gmail.com

Листостебельные болезни (ржавчина и пятнистости) являются вредоносными для яровой пшеницы во всех зонах ее возделывания. Выращивание устойчивых сортов – экологически безопасный способ защиты. Целью исследований являлась комплексная оценка 44 перспективных образцов яровой мягкой пшеницы по устойчивости к листостебельным болезням и идентификация у них генов *Lr* и *Sr*. Изучаемый материал был получен из Казахстанско-Сибирской сети улучшения яровой пшеницы (КАСИБ) в 2017 и 2018 гг. Полевые оценки устойчивости к бурой и стеблевой ржавчине, септориозу и пиренофорозу проводили в Южном Казахстане на инфекционном участке НИИ проблем биологической безопасности. В лабораторных условиях оценили проростковую устойчивость образцов пшеницы к пиренофорозу, бурой и стеблевой ржавчине. С использованием фитопатологического теста и молекулярных маркеров проведена идентификация генов *Lr* и *Sr*. В результате полевые оценки отобраны две линии (Лют. KS 14/09-2 и СПЧС 69), с высокoeffективной групповой устойчивостью к ржавчине и пятнистостям. С использованием молекулярных маркеров у линии Лют. KS14/09-2 определены кластер генов *Lr34/Sr57/Yr18/Pm38*, ген *Lr1*, а также пшенично-ржаная транслокация 1BL.1RS, несущая гены *Lr26/Sr31/Yr9/Pm8*. У линии СПЧС 69 выявлена транслокация от пырея с высокoeffективными генами устойчивости к стеблевой (*Sr24*) и бурой (*Lr24*) ржавчине и транслокация 1AL.1RS от ржи с комплексом эффективных генов устойчивости к грибным болезням и вредителям. Устойчивость к септориозу и пиренофорозу показали линии Лют. 393/05, Лют. 2028, Лют. 261, Лют. 1103, Лют. 22-17, Лют. 37-17, л. 4-10-16, Степная 245, к бурой и стеблевой ржавчине – сорта ОмГАУ-100, Элемент 22 и Силач. С использованием молекулярных маркеров выявлено умеренное разнообразие изученных образцов по генам устойчивости. У них выявлены гены *Lr1*, *Lr9*, *Lr10*, *Lr19/Sr25*, *Lr24/Sr24*, *Lr26/Sr31/Yr9/Pm8*, *Lr34/Sr57/Yr18/Pm38*, *Lr37/Sr38/Yr17*, встречающиеся по отдельности или в разных сочетаниях. Данный материал может быть рекомендован для использования в селекции пшеницы на устойчивость к болезням.

Ключевые слова: *Triticum aestivum*, бурая и стеблевая ржавчина, пиренофороз, септориоз, устойчивость, *Lr*-, *Sr*-гены, молекулярный скрининг.

Leaf and stem diseases (rusts and blotches) are harmful to spring wheat in all areas of its cultivation. The use of resistant varieties is an environmentally safe way of protection. The objective of the present study was to comprehensively evaluate leaf and stem disease resistance in 44 promising cultivars of soft spring wheat, as well as to identify *Lr* and *Sr* genes in them. The accessions were obtained from the Kazakhstan-Siberian Spring Wheat Improvement Network (KASIB) in 2017 and 2018. Wheat resistance to leaf and stem rust, to septorios and to tan spot was evaluated in field conditions in Southern Kazakhstan (infection plot at the Research Institute for Biological Safety Problems). Wheat seedlings resistance to septorios, leaf and stem rust was evaluated under laboratory conditions. The *Lr* and *Sr* genes were identified using a phytopathological test and molecular markers. Field studies resulted in selection of two lines, Lut. KS 14/09-2 and SPCHS 69, with highly effective group resistance to rusts and blotches. By using molecular markers, the gene cluster *Lr34/Sr57/Yr18/Pm38*, *Lr1* gene, and wheat-rye translocation 1BL.1RS carrying genes *Lr26/Sr31/Yr9/Pm8* were detected in Lut. KS 14/09-2. A translocation from wheatgrass with highly effective genes of resistance to stem (*Sr24*) and leaf (*Lr24*) rusts, as well as 1AL.1RS translocation from rye with a complex of effective genes of resistance to fungous diseases and pests were detected in the line SPCHS 69. Eight wheat lines (Lut. 393/05, Lut. 2028, Lut. 261, Lut. 1103, Lut. 22-17, Lut. 37-17, line 4-10-16, Stepnaya 245) appeared to be resistant to *Stagonospora nodorum* blotch and tan spot; and four varieties (OmGAU-100, Element 22, Stolypinskaya 2, and Silach) demonstrated resistance to leaf and stem rust. The molecular marker analysis showed moderate genetic diversity of the studied collection in terms of resistance genes. The genes *Lr1*, *Lr9*, *Lr10*, *Lr19/Sr25*, *Lr24/Sr24*, *Lr26/Sr31/Yr9/Pm8*, *Lr34/Sr57/Yr18/Pm38*, *Lr37/Sr38/Yr17*, both separately and in different combinations, were detected in the tested accessions. The evaluated material may be recommended for the use in wheat breeding for disease resistance in Russia and in Kazakhstan.

Key words: *Triticum aestivum*, leaf and stem rust, tan spot, septorios, resistance, *Lr*, *Sr* genes, molecular screening.

Прозрачность финансовой деятельности / The transparency of the financial activities Авторы не имеют финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах.

Для цитирования: Рсалиев А. С., Гульятеева Е. И., Шайдаюк Е. Л., Коваленко Н. М., Молдажанова Р. А., Пахратдинова Ж. У. Характеристика устойчивости перспективных образцов яровой мягкой пшеницы к листостебельным болезням. *Биотехнология и селекция растений*. 2019;2(2):14-23. DOI: 10.30901/2658-6266-2019-2-14-23

Авторы благодарят рецензентов за их вклад в экспертную оценку этой работы / The authors thank the reviewers for their contribution to the peer review of this work

For citation: Rsaliev A. S., Gulytaeva E. I., Shaydayuk E. L., Kovalenko N. M., Moldazhanova R. A., Pahratdinova Z. U. Characteristic of perspective common spring wheat accessions for resistance to foliar diseases. *Plant Biotechnology and Breeding*. 2019;2(2):14-23. (In Russ.) DOI: 10.30901/2658-6266-2019-2-14-23

Дополнительная информация / Additional information Полные данные этой статьи доступны / Extended data is available for this paper at <https://doi.org/10.30901/2658-6266-2019-2-14-23>

Мнение журнала нейтрально к изложенным материалам, авторам и их месту работы / The journal's opinion is neutral to the presented materials, the author, and his or her employer

Рсалиев А. С. orcid.org/0000-0002-9921-6076
Гульятеева Е. И. orcid.org/0000-0001-7948-0307
Шайдаюк Е. Л. orcid.org/0000-0003-3266-6272
Коваленко Н. М. orcid.org/0000-0001-9577-8816
Молдажанова Р. А. orcid.org/0000-0003-2173-3441
Пахратдинова Ж. У. orcid.org/0000-0003-3142-3885

УДК 633.11:632.938
Поступила: 30.04.2019
Принята: 11.07.2019

Все авторы одобрили рукопись / All authors approved the manuscript

Конфликт интересов отсутствует / No conflict of interest

Введение

Яровая пшеница – одна из основных зерновых культур в России и Казахстане. Урожайность коммерческих сортов значительно варьирует по годам, что вызвано неблагоприятными погодными условиями и поражением болезнями. Листостебельные болезни, к которым относится бурая (возбудитель *Puccinia triticina* Erikss.) и стеблевая ржавчина (*Puccinia graminis* Pers. f. sp. *tritici* Erikss. et Henn.), септориоз (*Parastagonospora nodorum* (Berk.) Quaedvl., Verkley & Crous (= *Septoria nodorum* Berk.), и пиренофороз (синоним желтая пятнистость) (*Pyrenophora tritici-repentis* (Died.) Drechsler), являются наиболее вредоносными для яровой пшеницы во всех зонах ее выращивания (Koyschybaev et al., 2017; Sanin, 2012). В период 2001–2016 гг. в Казахстане эпифитотийное развитие бурой ржавчины по отдельности или в комплексе с септориозом наблюдали 8 раз. Допущенные к использованию сорта пшеницы показали высокую восприимчивость к обеим болезням. Потери зерна составляли более 20% (Koyschybaev et al., 2017).

Создание и использование устойчивых сортов – экологически безопасный способ защиты пшеницы от болезней. В последнее десятилетие в России отмечен очевидный прогресс в создании новых сортов пшеницы, в том числе и устойчивых к болезням (Bespalova et al., 2017). Для успешной иммуногенетической защиты значимость представляет разнообразие сортов. Выращивание генетически однородных сортов в регионах, относящихся к единой эпидемиологической зоне, предопределяет быструю потерю их устойчивости. Подтверждением этому является потеря эффективности гена *Lr26* на Северном Кавказе в 1970 годах, гена *Lr19* в Поволжье в 1990 годах и гена *Lr9* в Западной Сибири и на Урале в 2000-х годах (Sibikeev, Krupnov, 2007; Meshkova et al., 2008).

В целях повышения результативности селекционных

программ в России и Казахстане в 1999 г. была создана Казахстанско-Сибирская сеть улучшения яровой пшеницы (КАСИБ), в которую вошли ведущие научные учреждения. В рамках данной организации проводится изучение и обмен перспективным селекционным материалом. Многие образцы пшеницы, изучаемые в КАСИБ, в дальнейшем внедряются в производство и используются в селекционных программах. Для предотвращения генетической эрозии, приводящей к быстрой потере эффективности используемых генов, необходим детальный скрининг нового материала. Он должен включать идентификацию генов с использованием молекулярных маркеров и оценку устойчивости образцов в фазах проростков и взрослых растений. В результате фитопатологического анализа уточняется тип устойчивости (ювенильная, возрастная) и эффективность идентифицированных генов. В современный период для маркер-опосредованной селекции (МАС) пшеницы предложен достаточный набор молекулярных маркеров, но большая часть из них позволяет провести идентификацию генов устойчивости к болезням, вызываемым облигатными патогенами – бурой (*Lr*), стеблевой (*Sr*) и желтой (*Yr*) ржавчине, а также мучнистой росе (*Pm*) (<https://maswheat.ucdavis.edu>).

Целью данных исследований являлась комплексная оценка перспективных образцов яровой мягкой пшеницы КАСИБ по устойчивости к листостебельным болезням и идентификация у них генов *Lr* и *Sr*.

Материалы и методы

Материал исследований включал 12 новых сортов и 32 перспективных линии яровой мягкой пшеницы российской и казахстанской селекции, которые были получены из КАСИБ в 2017–2018 гг. Характеристика данного материала представлена в таблице 1.

Таблица 1. Характеристика изучаемого материала

Table 1. Characteristic of the studied material

№ п/п	Образец Accession	Родословная Pedigree КАЗАХСТАН	Оригинатор Origin
1.	Степная 245	Stepnaya 16/Berkut//Aktube 39	Актюбинская СХОС
2.	Степная 253	Лютесценс С-2207/Степная 60	
3.	Степная 259	Саратовская 29/Степная 62	
4.	ГВК 2127	ВК 4583 (ГВК 1860-12)/Целинная 3с	ВКНИИСХ
5.	ГВК 2161	ВК 4450 (Лют 20/Лада)	
6.	Лют. 857	Омская 18/Лютесценс 32	КазНИИЗиР
7.	Лют. 932	Эритроспермум 287/Казахстанская 17	
8.	Лют. 248/01	Эритроспермум 893/Целиноградка	КазНИИ ЗХ
9.	Лют. 393/05	Карабалыкская 90/90-6	
10.	Линия 4-10-16	Молодежная/Мироновская 808	Карабалыкский СХОС
11.	Линия 22 ЧС	(Lut 424/4/Milan/Sha7/3/CROC_1/Ae.squar (224)/Opata/5/Gle)	
12.	Лют. 48-204-03	Лютесценс 4 Башкирская 20	

№ п/п	Образец Accession	Родословная Pedigree	Оригинатор Origin
13.	Лют. 2028	Лютесценс 253-93-4/Караганднская 21	Карагандинский НИИРиС
14.	Лют. 2102	Лютесценс 1085/Омская 18	
15.	Лют. 30	Павлодарская 93/WH007850ZAK(WA 7850)	Павлодарский НИИСХ
16.	Лют. 65	Лютесценс 44/ЮК-3 (Корея)	
17.	Лют. 261	Лютесценс 337-77-44/Мироновская 808 (РНВ)	
РОССИЯ			
18.	Лют. 1103	Светланка/Александрина	Алтайский НИИСХ
19.	Эритр. 1119	Омская 28/Саратовская 71	
20.	Лют. 8-108-1	И.о. СПЧС 8 №108	Курганский НИИСХ
21.	Лют. 22-17	Терция/Жигулевская	
22.	Лют. 37-17	Любава 2/Прохоровка	
23.	Лют. KS 14/09-2	Омская 32/Соната	Кургансемена
24.	Лют. KS 140/08-3	Омская 37/Салават Юлаев	
25.	Лют. KS 963	Тулайковская 10/Экада 6	
26.	Лют. 1193	Aubaine/Тулайковская 100	Самарский НИИСХ
27.	Лют. 1296	АС Кама/Землячка	
28.	Лют. 1300	Тулайковская 10/Землячка	
29.	Сибирская 21	(Новосибирская 67 × Удача) × Сибирская 17	СИБНИИРС
30.	Новосибирская 16	Памяти Вавенкова * Новосибирская 15	
31.	Новосибирская 41	(Тюменская 80*[(Целинная 20 * АНК 102)] F1*Sport	
32.	Лют. 90-12	Терция × Нива 2	Омский ГАУ
33.	ОмГАУ-100	Лютесценс 444 × Эритроспермум 59	
34.	Столыпинская 2	Gle/3/KA/NAC//TRCH/4/Омская37	
35.	Лют. 3/04-21-11	Lut. 290/97-7/292(32) Tam200/Tut(4)	Омский АНЦ
36.	Лют. 79/04-11	Lut.248-97-11/Омская 38	
37.	СПЧС 69	Алтайская530/3/EMB16/CBRD//CBRD/4/Lut 210.99.10	
38.	Тюменская юбилейная	Лютесценс 41-94 × Терция	ГАУ Северного Зауралья
39.	Тюменочка	(Скала × Тюменская 80) × Омская 32)	
40.	Лют. 443	Бел/3//Altar84/Ae.squar(224)//Pgo/4/C68	НИИСХ Юго-Востока
41.	Лют. 449	Л505*2/Прохоровка//Белянка	
42.	Силич	Лютесценс 210/99-10 × Эр.23090	Челябинский НИИСХ
43.	Эритр. 24841	Челяба 75 х АНК-17В	
44.	Элемент 22	Эритроспермум 33-97/Дуэт	Омский ГАУ
45.	Омская 35	Омская 29/Омская 30	Стандарт
46.	Саратовская 29	Альбидум 24/Лютесценс 55-11	Стандарт

Изучение устойчивости в фазе взрослых растений проводили на инфекционном участке НИИ Проблем Биологической Безопасности (НИИПББ) (Жамбылская область, пос. Гвардейский) в 2018 г. Изучаемые образцы пшеницы опрыскивали водной суспензией уредини-оспор *P. triticina* и *P. graminis* с добавлением детергента Твин 80. Инфекционный материал бурой и стеблевой ржавчины был получен из коллекции микроорганизмов НИИПББ. После инокуляции деланки накрывали полиэтиленовой пленкой на 16–18 часов. Заражение растений проводили вечером в безветренную погоду после предварительного полива опытных посевов. Для накопления и распространения инфекции в питомнике между ярусами сеяли восприимчивые сорта. Для создания благоприятных условий развития болезни опытные деланки регулярно поливали (Rsaliev et al., 2004). Оценку устойчивости пшеницы проводили с момента появления первых сим-

птомов (пустул) и далее через 14 дней. Тип инфекции к бурой ржавчине определяли по шкале Майнса и Джексона, к стеблевой – Стэкмана и Левина (McIntosh et al., 1995). Интенсивность поражения оценивали по шкале Петерсона с соавторами (Peterson et al., 1948).

Изучение устойчивости к пятнистостям проводили в условиях естественного инфекционного фона. Для определения степени поражения использовали шкалы Саари и Прескотта (Saari, Prescott, 1975).

В качестве показателя, характеризующего неспецифическую устойчивость сортов к болезням, использовали критерий скорости нарастания болезни, выражаемый площадью под кривой развития болезни (ПКРБ) (Wilcoxson et al., 1975), который рассчитывали по формуле:

$$S = 1/2 \times (x_1 + x_2) (t_2 - t_1) + \dots + (x_{n-1} + x_n) \times (t_n - t_{n-1}),$$

где S – площадь под кривой развития болезни; x_1 – интенсивность развития болезни на момент первого учета, %; x_2 – интенсивность развития болезни на момент второго учета, %; x_n – интенсивность

развития болезни на момент последнего учета, %; $(t_2 - t_1)$ – количество дней между вторым и первым учетом; $(t_n - t_{n-1})$ – количество дней между последним и предпоследним учетами; n – количество учетов.

Во Всероссийском НИИ защиты растений (ВИЗР) изучили ювенильную устойчивость образцов к бурой и стеблевой ржавчине, и пиренофорозу. Инфекционный материал *P. trititica* и *P. graminis* был размножен с использованием методики лабораторного культивирования патогенов (Mikhailova et al., 1998). Размножение культуры гриба *P. tritici-repentis* выполняли по методике Л.А. Михайловой с соавторами (Mikhailova et al., 2012).

Для изучения ювенильной устойчивости использовали 10–14-дневные проростки (фаза первого листа), которые опрыскивали водной суспензией изучаемых патогенов с добавлением детергента Твин 80. После заражения растения помещали в климатическую камеру Versatile Environmental Test Chamber MLR-352H («SANYO Electric Co., Ltd.», Япония) с контролируемыми условиями (температура 20°C, влажность 70%).

Для изучения устойчивости к бурой ржавчине использовали четыре тест-клона, маркированные вирулентностью к генам *Lr9*, *Lr19* и *Lr26*, и сборную омскую популяцию. Омская популяция была собрана на селекционном посеве Омского государственного аграрного университета в 2018 году и взята в качестве образца азиатской популяции. Используемые клоны и популяция были авирулентными к линиям Thatcher (*TcLr*) с генами *Lr24*, *Lr23*, *Lr28*, *Lr29*, *Lr39*(=41), *Lr45*, *Lr47*, *Lr50*, *Lr51*, *Lr53* и вирулентными к генам *Lr1*, *Lr2a*, *Lr2b*, *Lr2c*, *Lr3a*, *Lr3bg*, *Lr3ka*, *Lr10*, *Lr11*, *Lr14a*, *Lr15*, *Lr17*, *Lr18*, *Lr20*, *Lr21*, *Lr30*. Клоны и омская популяция различались между собой по вирулентности к линиям с генами *Lr9*, *Lr16*, *Lr19* и *Lr26*. Тест-клон №1 был вирулентным к *Lr9* и *Lr26*, и авирулентным к *Lr19* и *Lr16*; клон №2 вирулентным к *Lr19*, *Lr26*, авирулентным к *Lr9*, *Lr16*; клон №3 вирулентным к *Lr26*, авирулентным к *Lr9*, *Lr16*, *Lr19*; омская популяция вирулентной к *Lr9*, авирулентной к *Lr16*, *Lr19*, *Lr26*; клон №4 авирулентным к *Lr9*, *Lr16*, *Lr19* и *Lr26*. Оценку устойчивости к стеблевой ржавчине проводили с использованием сборной западносибирской популяции *P. graminis*, которая характеризовалась авирулентностью к сортам и линиям с генами *Sr24*, *Sr25* и *Sr31*. Эти гены являются высокоэффективными в защите от болезни в России (Skolotneva et al., 2018).

Оценку устойчивости к бурой и стеблевой ржавчине проводили через 8–10 дней после инокуляции с использованием шкалы Майнса и Джексона для бурой ржавчины и Стэкмана и Левина для стеблевой (McIntosh et al., 1995). Растения с типом реакции 0, 1, 2 относили к устойчивым, 3, 4, X – к восприимчивым.

Для инокуляции возбудителем пиренофороза использовали две сборные популяции – казахстанскую и омскую. Вирулентность используемого инокулюма была охарактеризована в предварительных исследованиях (Mironenko et al., 2019). Концентрация суспензии составляла $2-3 \cdot 10^3$ конидиоспор/мл. Оцен-

ку устойчивости проводили через 6–7 дней после инокуляции по 5-бальной шкале (Lamari, Bernier, 1989; Mikhailova et al., 2012). Растения, пораженность которых составила 1 и 2 балла, относили к устойчивым, 3 балла – умеренно-восприимчивым, 4 и 5 – к восприимчивым.

С использованием молекулярных маркеров провели идентификацию следующих генов: *Lr1* (маркер WR003) (Qiu et al., 2007), *Lr9* (SCS5) (Gupta et al., 2005), *Lr10* (Fi.2245/*Lr10-6/r2*) (Chelkowski et al., 2003), *Lr19/Sr25* (SCS265) (Gupta et al., 2006), *Lr20/Sr15* (STS638) (Neu et al., 2002), *Lr21(Lr21L/R)* (<https://maswheat.ucdavis.edu/protocols/Lr21/index.htm>), *Lr24/Sr24* (*Sr24*#12, *Sr24*#50) (Mago et al., 2005), *Lr25/Pm7* (*Lr25F20/R19*) (<https://maswheat.ucdavis.edu/protocols/Lr25/index.htm>), 1BL.1RS (*Lr26/Sr31/Yr9/Pm8*)/1AL.1RS (SCM9) (Weng et al., 2007), *Lr28* (SCS421) (Cherukuri et al., 2005), *Lr29* (*Lr29F24*) (Procunier et al., 1995), *Lr34/Sr57/Yr18/Pm38* (csLV34) (Lagudah et al., 2006), *Lr35/Sr39* (*Sr39*=22) (<https://maswheat.ucdavis.edu/protocols/Lr35/index.htm>), *Lr37/Sr38/Yr17/Pch2/Cre5* (Ventriup/LN2) (Helguera et al., 2003), *Lr41* (GDM35) (Pestsova et al., 2000), *Lr47* (Helguera et al., 2000). ДНК выделяли из листьев 10-дневных проростков пшеницы по методике Д.Б. Дорохова и Э. Клоке (Dorokhov, Kloke, 1996). Амплификацию ДНК проводили в реакционной смеси по предложенным в цитированных выше источниках протоколам.

Результаты и обсуждение

Полевая оценка устойчивости в фазе взрослых растений. В полевых условиях Южного Казахстана высокой устойчивостью к бурой ржавчине (пораженность 0%) характеризовались линии: Лют. 1300, Лют. 90-12, ОмГАУ-100, СПЧС 69 и сорт Силач. К группе устойчивых (пораженность от 5% до 10%) относились образцы Столыпинская 2, Элемент 22, линия 22 ЧС, Эритр. 1119, Лют. 8-108-1, Лют. 1193 и Лют. 1296. Умеренная восприимчивость (пораженность от 20 до 30%) отмечена для линий ГВК 2127, ГВК 2161, Лют. KS 14/09-2, Лют. 3/04-21-11, Лют. 79/04-11, Лют. 443, Лют. 449 и сортов Тюменская юбилейная, Сибирская 21, Новосибирская 41 (табл. 2). Число российских образцов пшеницы, устойчивых к бурой ржавчине, было выше (48%), чем казахстанских (5%).

Сходные результаты получены и при изучении устойчивости к стеблевой ржавчине. Все казахстанские линии пшеницы были восприимчивы к болезни (пораженность 50–90%). Среди линий российской селекции 44% образцов характеризовались устойчивостью. К группе иммунных относились линии ОмГАУ-100 и СПЧС 69 (пораженность 0%); к среднеустойчивым – Лют. KS 14/09-2, Лют. 443, Лют. 449, Тюменочка, Элемент 22 (пораженность до 5%), Лют. 22-17, Лют. 37-17, Лют. KS 140/08-3, Силач (пораженность до 10%).

Таблица 2. Устойчивость образцов яровой пшеницы к возбудителям стеблевой и бурой ржавчины, пиренофороза и септориоза в фазе проростков и взрослых растений

Table 2. Resistance of spring wheat accessions to agents of stem and leaf rust, tan spot and septoria at the seedling and adult plant stages

Образец Accession	Стеблевая ржавчина Stem rust		Пиренофороз Tan spot		Септориоз Septoriosis		Бурая ржавчина Leaf rust				Идентифицированные гены Устойчивости Identified resistance genes							
	Казахстан (ПУ) Kazakhstan, field	ТР в фазе проростков, омск поп. RT, seedlings stage, Omsk popul.	Казахстан (ПУ) Kazakhstan, field	ТР в фазе Проростков RT at seedlings stage	Казахстан (ПУ) Kazakhstan, field	Казахстан (ПУ) Kazakhstan, field	ТР в фазе проростков RT at seedlings stage											
							СП% и ТР* ID% & RT*	ПКРБ AUDC	СП% ID% AUDC	ПКРБ AUDC		Клон №1 Clone 1	Клон №2 Clone 2	Клон №3 Clone 3	Клон №4 Clone 4	омск. поп. Omsk		
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	
Степная 245	80MS	900	3	10	320	2	3	10	60	50MR	780	0	0	2+3	3	0-1;		Lr10
Степная 253	80S	2060	3	40	1080	3	4	10	60	50MR	780	0-1	0	3-4	0-1	0		Lr10
Степная 259	90S	2020	3	20	800	3	4	10	60	50MR	780	3-4	3-4	3-4	3-4	3-4		Lr10
ГВК 2127	10MS	270	0	10	320	1	1	20	280	30MS	600	0	0	3-4	0	0		Lr26/Sr31/Yr9/Pm8
ГВК 2161	10MS	270	0-1	20	540	2	2	20	440	30MS	800	0	0	3-4	0	0		Lr26/Sr31/Yr9/Pm8
Лют. 857	90S	1440	3	40	1080	3	4	10	220	50S	1400	3-4	3-4	3-4	3-4	3-4		Lr34/Sr57/Yr18/Pm38
Лют. 932	90S	1700	3	30	860	4	4	0	0	50S	1400	3-4	3-4	3-4	3-4	3-4		Lr34/Sr57/Yr18/Pm38
Лют. 248/01	60S	1720	3	10	220	2	3	0	0	80S	1380	0	0	0	0	0-1		Lr1
Лют. 393/05	80S	1940	3	10	220	3	3	10	220	80S	1680	3-4	3-4	3-4	3-4	3		Lr1
Линия 4-10-16	80S	1780	3	10	320	3	2	10	220	50S	1400	3-4	3-4	3-4	3-4	3		Lr34/Sr57/Yr18/Pm38 + Lr1
Линия 22 ЧС	50S	1300	3	20	540	3	3	20	280	5R	160	3-4	3-4	3-4	3-4	3		Lr37/Sr38/Yr17/Pm38 + Lr1+Lr10?
Лют. 48-204-03	70S	1740	3	20	280	3	3	20	440	50MS	720	0	0	0	0	0		-
Лют. 2028	80S	1580	3	10	60	2	4	10	220	50MS	980	0	0	0	0	0-1;		-
Лют. 2102	80S	2060	0-1	10	60	3	4	20	280	80S	1580	3-4	3-4	3-4	3-4	3		-
Лют. 30	90MS	1920	2	30	600	3	4	30	500	50MR	780	3-4	3-4	3-4	3-4	3		Lr10
Лют. 65	90S	1740	3-4	20	380	3	4	20	280	70S	1260	3-4	3-4	3-4	3-4	3		-
Лют. 261	80S	2360	3-4	10	220	1	4	0	0	70S	1980	3-4	3-4	3-4	3-4	3		-
Лют. 1103	90S	2420	3	10	220	1	1	0	0	60S	780	3-4	3-4	3-4	3-4	3-4		-
Эригр. 1119	50S	1400	3	0	0	0	1	30	500	10MR	140	3-4	3-4	3-4	3-4	3-4		Lr10
Лют. 8-108-1	60S	780	0	10	60	1	2	20	280	10MR	270	3-4	3-4	3-4	3-4	3		-
Лют. 22-17	10R	220	0-1	10	60	1	3	0	0	50MS	1300	0	0	3-4	0	0-1;		Lr26/Sr31/Yr9/Pm8
Лют. 37-17	10R	270	0-1	10	60	1	3	10	220	50MS	1400	0	0	3	0	0		Lr26/Sr31/Yr9/Pm8

Образец Accession	Стеблевая ржавчина Stem rust		Пиренофороз Tan spot		Септориоз Septoriosis	Бурая ржавчина Leaf rust				Идентифицированные гены Устойчивости Identified resistance genes							
	Казахстан (ПУ) Kazakhstan, field	ТР в фазе проростков, омск поп. RT, seedlings stage, Omsk popul.	Казахстан (ПУ) Kazakhstan, field	ТР в фазе Проростков RT at seedlings stage	Казахстан (ПУ) Kazakhstan, field	ТР в фазе проростков RT at seedlings stage											
						СП% и ТР* ID% & RT*	ПКРБ AUDC	СП% ID% и ТР & RT	ПКРБ AUDC		Клон №1 Clone 1	Клон №2 Clone 2	Клон №3 Clone 3	Клон №4 Clone 4	омск. поп. Omsk popul.		
Лют. KS 14/09-2	5R	110	0-1	10	60	1	3	0	0	20MR	540	0	0	3-4	0;	0	Lr26/Sr31/Yr-9/Pm8 + Lr34/Sr57Yr18/Pm38 + Lr1
Лют. KS 140/08-3	10R	270	0	20	120	3	3	20	280	50MS	1400	0	0	3	0;	0	Lr26/Sr31/Yr-9/Pm8
Лют. KS 963	40MS	980	0	30	700	2	3	10	60	50MR	780	0	0	0	0	0-1;	Lr10
Лют. 1193	80S	1160	0-1	10	320	3	4	30	500	10MR	190	0	0	0	0	0	-
Лют. 1296	50S	1300	0	10	320	3	4	30	500	10R	140	0	0	0	0	0	-
Лют. 1300	80S	1380	0	30	700	4	4	20	280	0	0	0	0	0	0	0	-
Сибирская 21	80S	2160	2	10	320	3	3	20	280	20MS	540	3	0	0	0	3	Lr9
Новосибирская 16	80S	2300	3	10	60	4	4	20	440	40MS	240	3-4	3-4	3-4	3-4	3-4	Lr1 + Lr10
Новосибирская 41	90S	1860	3	20	380	2	1	20	280	20MS	330	0	0	0	0	0-1	-
Лют. 90-12	20S	540	0	10	60	1	2	20	280	0	0	0,3	0	3-4	0,3	0-1	-
ОмГЛУ-100	0	0	0	20	380	3	3	20	280	0	0	0	0	3-4	0	0	Lr26/Sr31/Yr-9/Pm8 Lr10
Столыпинская 2	20MR	490	0	20	380	3	3	30	340	5R	110	0-2	0	3-4	3-4	0-1	Lr34/Sr57Yr18/Pm38
Лют. 3/04-21-11	0	0	0	20	320	2	3	10	60	20R	380	0	0	3	0	3,0	Lr1 + Lr26/Sr31/Yr-9/Pm8
Лют. 79/04-11	5R	110	0;	30	960	3	2	10	60	20MR	280	0	0	0	0-1	0	Lr19/Sr25 + Lr1?
СПЧС 69	0	0	0-1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Lr24/Sr24 + 1AL/RS
Томенская юбил.	80S	2260	0	30	700	3	2	10	60	20MS	380	3	3	3	0;	0	Lr1
Томеюнка	5R	110	0	20	640	3	3	10	220	50MR	1300	3	3	3-4	0-2	0-1-2	Lr26/Sr31/Yr-9/Pm8 + Lr10
Лют. 443	5R	110	0	20	380	3	3	30	500	20MR	280	0	0	0	0	0	Lr19/Sr25 + Lr10
Лют. 449	5R	110	0	20	280	2	3	30	500	20MR	250	0	0	0	0	0	Lr26/Sr31/Yr-9/Pm8 + Lr10?
Силач	10R	140	0	20	280	2	2	20	280	0	0	0	0	0	0	0	Lr9 + Lr10 + Lr26/Sr31/Yr-9/ Pm8
Эригр. 24841	90S	2580	3	20	640	3	3	0	0	80MS	1380	0	0	0	0	0	-
Элемент 22	5R	110	0-1	30	700	3	3	10	220	5R	110	0	0	3	0	0	Lr26/Sr31/Yr-9/Pm8
Омская 35	70S	2140	3	20	640	2	2	30	660	5R	160	3-4	3-4	3-4	3-4	3-4	Lr34/Sr57Yr18/Pm38 + Lr10
Саратовская 29	50S	1340	4	10	320	4	4	40	720	50MS	720	3-4	3-4	3-4	3-4	3-4	-

Примечание. Сокращения в шапке таблицы: ПУ – полевые условия (field);

СП% – степень поражения (Infection Degree, ID%), ТР – тип реакции (Response Type, RT), балл (points);

ПКРБ – площадь под кривой развития болезни (Area Under Disease Curve, AUDC), в условных единицах (convent. units);

Омск. поп. – Омская популяция (*Omsk popul.*) *P. triticea* (Kaz. popul.) *P. triticea*.
Омск. поп. – Омская популяция (*Omsk popul.*) *P. triticea* (Kaz. popul.) *P. triticea*.

R – тип реакции 1 балл; MR – тип реакции 2 балла, MS – тип реакции 3 балла, S – тип реакции 4 балла

Развитие пятнистостей в год исследований в Южном Казахстане оценивалось как умеренное. Максимальное поражение септориозом восприимчивых сортов составляло 30%, пиренофорозом – 40% (табл. 2). На линиях Лют. 932, Лют. 248/01, Лют. 261, Лют. 1103, Лют. 22-17, Лют. KS 14/09-2, СПЧС 69 и Эритр. 24841 симптомы поражения возбудителем септориоза не обнаружены. Пораженность сортов Степная 245, Степная 253, Степная 259, Тюменская юбилейная, Тюменочка, Элемент 22 и линий Лют. 857, Лют. 393/05, Линия 4-10-16, Лют. 2028, Лют. 37-17, Лют. KS 963, Лют. 3/04-21-11, Лют. 79/04-11 не превышала 10%. Остальные образцы относились к группе восприимчивых, поскольку их поражение было на уровне восприимчивого контроля (20–30%). Число линий яровой пшеницы, устойчивых к пиренофорозу, было существенно ниже. Только на двух линиях СПЧС 69 и Эритр. 1119 не отмечено симптомов болезни. У 47% казахстанских и 37% российских образцов пшеницы пораженность не превышала 10%.

В результате полевой оценки устойчивости к комплексу листостебельных болезней в условиях Южного Казахстана, выявлены две линии СПЧС 69 и Лют. KS 14/09-2 с высокоэффективной групповой устойчивостью к ржавчине и пятнистостям. Устойчивостью к двум видам ржавчины характеризовались сорта ОмГАУ-100, Силач, Элемент 22; к пятнистостям (септориозу и пиренофорозу) – линии Лют. 393/05, Лют. 2028, Лют. 261, Лют. 1103, Лют. 22-17, Лют. 37-17, л. 4-10-16 и сорт Степная 245.

Лабораторные исследования устойчивости в фазе проростков. Проростковой устойчивостью к используемым тест-клонам и омской популяции возбудителя бурой ржавчины (тип реакции 0, 1, 2) характеризовалось 29% изученных образцов пшеницы (табл. 2), но только пять из них (Лют. 1296, Лют. 1300, Лют. 1193, СПЧС 69, Силач) не поразились в полевых условиях. Соответственно эти линии характеризуются высоким уровнем ювенильной устойчивости, эффективной на протяжении всего периода вегетации пшеницы. Линии ГВК 2127,

ГВК 2161, Лют. 22-17, Лют. KS 140/08-3, Лют. 3/04-21-11, ОмГАУ-100, Элемент 22 были устойчивы ко всем тест-клонам, за исключением клона №3, вирулентного к *Lr26*; сорт Сибирская 21 к клону №1, вирулентному к *Lr9*; линия Лют. 443 к клону №2, вирулентному к *Lr19*. Таким образом фитопатологический анализ указывает на наличие у них этих генов.

Устойчивый тип реакции (0, 1, 2) при инокуляции омской популяцией стеблевой ржавчины показали 59% линий (см. табл. 2), но только 25% из них (Лют. KS 14/09-2, Лют. KS 140/08-3, ОмГАУ-100, Лют. 3/04-21-11, СПЧС 69, Лют. 443, Лют. 449, Силач, Столыпинская 2, Тюменочка, Элемент 22) были устойчивы в полевых условиях.

Устойчивость (балл поражения 0, 1, 2) к двум популяциям возбудителя пиренофороза (омской и казахстанской) выявлена у 20% образцов (ГВК 2127, ГВК 2161, Лют. 1103, Эритр. 1119, Лют. 8-108-1, Лют. 90-12, СПЧС 69, Силач, Новосибирская 41). Для большинства из них устойчивость в фазе проростков коррелировала с устойчивостью в полевых условиях (за исключением образцов ГВК 2161, Силач, Новосибирская 41). Число образцов, устойчивых к казахстанской популяции *P. tritici-repentis*, было значительно выше (22%), чем к Омской (см. табл. 2).

Согласно предварительному анализу (Mironenko et al., 2019), омская популяция *P. tritici-repentis* была представлена расами 1 и 3, продуцирующими токсины Ptr Tox A, Ptr Tox C и Ptr ToxC соответственно, а казахстанская – расой 7, продуцирующей токсины Ptr ToxA, Ptr ToxB. Токсин ToxA на восприимчивом сорте индуцирует некроз, а токсины ToxB и Ptr ToxC – хлороз.

По результатам фитопатологического анализа, 75% изученных образцов пшеницы, оказались устойчивыми к одной или нескольким болезням (рис. 1). Представленность устойчивых образцов в российском материале была существенно выше, чем в казахстанском.



Рис. 1. Соотношение (в %) различающихся по устойчивости к листостебельным болезням образцов в изученной коллекции яровой мягкой пшеницы.

Fig. 1. Accessions (in %) with resistance to leaf and stem diseases in the studied common spring wheat collection

Идентификация генов устойчивости с использованием молекулярных маркеров. Гены устойчивости, идентифицированные у образцов яровой пшеницы КАСИБ, представлены в таблице 2. У линии Лют. KS14/09-2, высокоустойчивой к обоим видам ржавчины, определены кластер генов *Lr34/Sr57/Yr18/Pm38*, ген *Lr1*, а также пшенично-ржаная транслокация 1BL.1RS, несущая гены *Lr26/Sr31/Yr9/Pm8*. У линии СПЧС 69 выявлена транслокация, переданная от пырея обыкновенного с высокоэффективными в России генами устойчивости к стеблевой (*Sr24*) и бурой (*Lr24*) ржавчине и транслокация 1AL.1RS от ржи, несущая комплекс эффективных генов устойчивости к грибным болезням. Для выявления пшенично-ржаных транслокаций 1BL.1RS и 1AL.1RS использован универсальный маркер *scm9*. Ампликон размером 207 п.о. указывает на наличие транслокации 1BL.1RS, а 228 п.о. – на транслокацию 1AL.1RS (Weng et al., 2007).

Показана широкая представленность у изученного материала пшенично-ржаной транслокации 1BL.1RS. Она обнаружена у 25% изученных образцов (например, ГВК 2127, ГВК 2161, Лют. 22-17, Лют. 37-17, Лют. KS 14/09-2, Лют. KS 140/08-3, Элемент 22), а в ряде случаев – в сочетании с другими генами (*Lr10*, *Lr1* *Lr9*). Все эти образцы с транслокацией 1BL.1RS характеризовались высоким уровнем устойчивости к стеблевой ржавчине на протяжении всего периода вегетации. Ген *Sr31*, локализованный в транслоцированной хромосоме 1BL.1RS, является классическим примером эффективной и долговременной генетической защиты растений пшеницы от стеблевой ржавчины. Его широкое распространение в сортах пшеницы обеспечивало защиту от болезни, начиная с 1970 годов. Вирулентность к *Sr31* впервые была отмечена в 1999 году в Уганде. Данный единичный случай оповестил мир о появлении новой расы стеблевой ржавчины, получившей имя *Ug99*. В 2006 году раса *Ug99* обнаружена в Йемене, в 2007 году – в Иране, в 2009 –

в Пакистане. В России и Казахстане ген *Sr31* до настоящего времени остается эффективным (Scolotneva et al., 2018), но территориальная близость Казахстана со странами, где обнаружена раса *Ug99*, предполагает возможность ее заноса.

Гены устойчивости к бурой ржавчине *Lr1*, *Lr10*, *Lr26* и *Lr34*, широко представленные в изученном материале, относятся к группе малоэффективных в России и Казахстане, а ген *Lr9* – к частично эффективным. Он утратил свою эффективность в западноазиатских регионах России и Северном Казахстане, но остается эффективным на Северном Кавказе и Северо-Западе (Gulyaeva et al., 2011; 2018). Показано, что сочетание этих генов в одном сорте может способствовать повышению уровня полевой устойчивости (Dakouri et al., 2013). В данном исследовании это подтверждается для линии KS 14/09-2, несущей гены *Lr26*, *Lr34*, *Lr1* и сорта Силач с генами *Lr9*, *Lr26*, *Lr10*. У сорта Столыпинская 5, устойчивого к бурой ржавчине, идентифицирован только один ген – *Lr34*. Данный факт указывает на наличие у него дополнительных *Lr*-генов.

Транслокация от *Aegilops ventricosa* Tausch. с генами устойчивости к бурой *Lr37*, стеблевой *Sr38* и желтой *Yr17* ржавчине, церкоспореллезной корневой гнили *Pch2* и злаковой цистообразующей нематодой *Cre5* определена у линии 22 ЧС. В полевых условиях она показала восприимчивость к стеблевой и устойчивость к бурой ржавчине. Транслокация от пырея обыкновенного с генами *Sr25* и *Lr19*, идентифицирована у линий Лют. 79/04-11 и Лют. 443. В полевых условиях эти линии были высокоустойчивы к стеблевой ржавчине (5R) и умеренно восприимчивы к бурой ржавчине (20MR).

Проведенный молекулярный анализ выявил умеренное генетическое разнообразие изученной коллекции пшеницы. Представленность в изученном материале идентифицированных генов показана на рисунке 2.

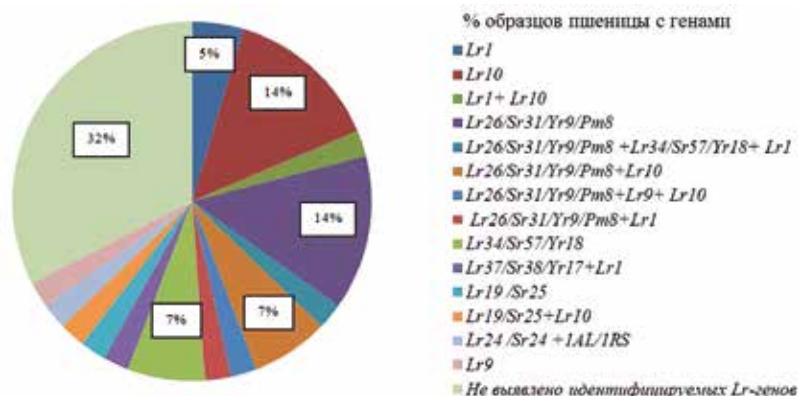


Рис. 2. Соотношение (в %) образцов, защищенных различными генами устойчивости к листовостеблевым болезням, в изученной коллекции яровой мягкой пшеницы

Fig. 2. Accessions (in %) protected by different genes of resistance to leaf and stem diseases in the studied common spring wheat collection

Заключение

В результате проведенных исследований охарактеризована устойчивость коллекции пшеницы КАСИБ к комплексу листостебельных болезней. Выделено два образца с групповой устойчивостью к бурой и стеблевой ржавчине, септориозу и пиренофорозу; 3 образца, устойчивых к бурой и стеблевой ржавчине и 8 образцов, устойчивых к септориозу и пиренофорозу. С использованием молекулярных маркеров проведена идентификация генов устойчивости к бурой и стеблевой ржавчине. Выделенные линии яровой пшеницы с групповой устойчивостью к болезням и высокоэффективными генами могут быть рекомендованы для селекции в качестве доноров.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства сельского хозяйства Республики Казахстан в рамках программно-целевого финансирования на 2018-2020 гг. (ИРН BR0649329).

The present work was financially supported by the Ministry of Agriculture of the Republic of Kazakhstan within the framework of program-targeted funding for 2018-2020 (IRN BR0649329).

References/Литература

- Bespalova LA, Romanenko AA, Kolesnikov FA et al. (2017) Varieties of wheat and triticale (Sorta pshenicy i triticales). Krasnodar, 2017. 168 p. [in Russian] (Беспалова Л.А., Романенко А.А., Колесников Ф.А. и др. Сорты пшеницы и тритикале. Краснодар, 2017. 168 с.).
- Chelkowski J, Golka L, Stepien L (2003) Application of STS markers for leaf rust resistance genes in near-isogenic lines of spring wheat cv. Thatcher. *J. Appl. Genet.* 44: 323–338.
- Cherukuri DP, Gupta SK, Charpe A, Koul S, Prabhu KV, Singh RB, Haq Q (2005) Molecular mapping of *Aegilops speltoides* derived leaf rust resistance gene *Lr28* in wheat. *Euphytica* 143: 19–26. DOI: 10.1007/s10681-005-1680-6
- Dakouri A, McCallum BD, Radovanovic N, Cloutier S (2013) Molecular and phenotypic characterization of seedling and adult plant leaf rust resistance in a world wheat collection. *Mol. Breeding* 32: 663–677. DOI: 10.1007/s11032-013-9899-8.
- Dorokhov DB, Kloke E (1997) Rapid and economical technology of RAPD analysis of plant genomes. *Rus. J. Genet.* 3 (4): 443–450 [in Russian] (Дорохов Д.Б., Клоке Э. Быстрая и экономичная технология RAPD анализа растительных геномов // Генетика. 1997. Т. 33. № 4. С. 443–450).
- Gulyaeva EI, Kosman E, Dmitriev AP, Baranova OA (2011) The structure of *Puccinia triticina* populations determined by virulence and DNA-markers in the Northwestern Russia in 2007. *Mycology and Phytopathology* 45 (1): 70–81 [in Russian] (Гуляева Е.И., Косман Е., Дмитриев А.П., Баранова О.А. Структура популяций *Puccinia triticina* по вирулентности и ДНК-маркерам в Северо-Западном регионе РФ в 2007 году // Микология и фитопатология, 2011. Т. 45. № 1. С. 70–81).
- Gulyaeva EI, Shaydayuk EL, Shamanin VP, Akhmetova AK, Tyunin VA, Shreyder ER, Kashina IV, Eroshenko LA, Sereda GA, Morgunov AI (2018) Genetic structure of Russian and Kazakhstani leaf rust (*Puccinia triticina* Erikss.) agent populations as assessed by virulence profiles and SSR markers. *Agricultural Biology* 53 (1): 85–95 [in Russian] (Гуляева Е.И., Шайдаюк Е.Л., Шаманин В.П., Ахметова А.К., Тюнин В.А., Шрейдер Е.Р., Кашина И.В., Ерошенко Л.А., Серeda Г.А., Моргунов А.И. Генетическая структура Российских и Казахских популяций возбудителя бурой ржавчины *Puccinia triticina* Erikss. по вирулентности и SSR-маркерам // Сельскохозяйственная биология. 2018. Т. 53. № 1. С. 85–95). DOI: 10.15389/agrobiology.2018.1.85rus
- Gupta SK, Charpe A, Koul S, Prabhu KV, Haq QM (2005) Development and validation of molecular markers linked to an *Aegilops umbellulata*-derived leaf rust resistance gene, *Lr9*, for marker-assisted selection in bread wheat. *Genome* 48: 823–830. DOI: 10.1139/G05-051
- Gupta SK, Charpe A, Prabhu KW, Haque OMR (2006) Identification and validation of molecular markers linked to the leaf rust resistance gene *Lr19* in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 113: 1027–1036. DOI: 10.1007/s00122-006-0362-7
- Helguera M, Khan I A, Dubcovsky J (2000) Development of PCR markers for wheat leaf rust resistance gene *Lr47*. *Theor. Appl. Genet.* 101: 625–631. DOI: 10.1007/s001220051397
- Helguera M, Khan IA, Kolmer J, Lijavetzky D, Zhong-qi L, Dubcovsky J (2003) PCR assays for the *Lr37-Yr17-Sr38* cluster of rust resistance genes and their use to develop isogenic hard red spring wheat lines. *Crop Science* 43: 1839–1847. DOI: 10.2135/cropsci2003.1839
- Koishybaev M, Kanafin BK, Fedorenko EN, Gots AY, Litovchenko ZH (2017) Stability sources of spring common wheat to types of rust and Septoria in North Kazakhstan. *International Research Journal* 12 (66): 117–122 [in Russian] (Койшыбаев М., Канафин Б.К., Федоренко Е.Н., Готс А.Ю., Литовченко Ж.И. Источники устойчивости яровой мягкой пшеницы к видам ржавчины и септориоза в Северном Казахстане // Международный научно-исследовательский журнал. 2017. Т. 12. № 66. С. 117–122). DOI: 10.23670/IRJ.2017.66.098
- Lagudah ES, McFadden H, Singh RP, Huerta-Espino J, Bariana HS, Spielmeier W (2006) Molecular genetic characterization of the *Lr34/Yr18* slow rusting resistance gene region in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 114: 21–30. DOI: 10.1007/s00122-006-0406-z
- Lamari L, Bernier CC (1989) Evolution of wheat lines and cultivars to tan spot [*Pernyophora tritici-repentis*] based on lesion type. *Can. J. Plant Sci.* 11 (1): 49–56.
- Mago R, Bariana HS, Dundas IS (2005) Development of PCR markers for the selection of wheat stem rust resistance genes *Sr24* and *Sr26* in diverse wheat germplasm. *Theor. Appl. Genet.* 111: 496–504. DOI: 10.1007/s00122-005-2039-z
- McIntosh RA, Wellings CR, Park RF (1995) *Wheat rust: an atlas of resistance genes*. CSIRO/Kluwer, Australia/Dordrecht. 205 p.
- Meshkova LV, Rosseeva LP, Shreyder ER, Sidorov AV (2008) Virulence of pathotypes of wheat brown rust pathogen to TH LR 9 in the regions of Siberia and the Urals (Virulentnost' patotipov vozbuditelya buroy rzhavchiny pshenicy k TH LR 9 v regionah Sibiri i Urala). In: Vtoraya Vserossiyskaya konferenciya "Sovremennye problemy immuniteta rastenij k vrednym organizmam" – The Second All-Russian Conference "Modern Problems of Plant Immunity to Pests". St. Petersburg: All-Russian Institute of Plant Protection (VIZR). p. 70–73 [in Russian] (Мешкова Л.В., Росеева Л.П., Шрейдер Е.Р., Сидоров А.В. Вирулентность патотипов возбудителя бурой ржавчины пшеницы к TH LR 9 в регионах Сибири и Урала // Вторая Всероссийская конференция «Современные проблемы иммунитета растений к вредным организмам». СПб.: ВИЗР, 2008. С. 70–73).
- Mikhailova LA, Mironenko NV, Kovalenko NM (2012) Yellow leaf spot of wheat: guidelines for the study of yellow spot (*Pyrenophora tritici-repentis*) agent populations and resistance varieties (Zhel-taya pyatnistost pshenicy: metodicheskie ukazaniya po izucheni-yu populyacij vozbuditelya zheltoj pyatnistosti *Pyrenophora tritici-repentis* i ustojchivosti sortov). St. Petersburg: All-Russian Institute of Plant Protection (VIZR). 56 p. [in Russian] (Михайлова Л.А., Мироненко Н.В., Коваленко Н.М. Желтая пятнистость пшеницы: методические указания по изучению популяций возбудителя желтой пятнистости *Pyrenophora tritici-repentis* и устойчивости сортов. СПб.: ВИЗР, 2012. 56 с.).
- Mikhailova LA, Gulyaeva EI, Mironenko NV (1998) Methods for studying the structure of leaf rust agent populations (Metody issledovaniy struktury populyacii vozbuditelya buroy rzhavchiny pshenicy). In: Sbornik metodicheskikh rekomendacij po zash-

- chite rastenij – Collection of guidelines for plant protection. St. Petersburg: All-Russian Institute of Plant Protection (VIZR). p. 105–126 [in Russian] (Михайлова Л.А., Гуляева Е.И., МIRONENKO Н.В. Методы исследований структуры популяции возбудителя бурой ржавчины пшеницы // Сборник методических рекомендаций по защите растений. СПб.: ВИЗР, 1998. С. 105–126).
- Mironenko NV, Kovalenko NM, Baranova OA (2019) Characteristics of the geographically distant populations of *Perenophora tritici-repentis* in terms of virulence and ToxA and ToxB toxin-forming genes. *Plant Protection News* 1 (99): 24–29 [in Russian] (МIRONENKO Н.В., КОВАЛЕНКО Н.М., БАРАНОВА О.А. Характеристика географически отдаленных популяций *Perenophora tritici-repentis* по вирулентности и генам токсинообразования ToxA и ToxB // Вестник защиты растений. 2019. Т. 1. № 99. С. 24–29). DOI: 10.31993/2308-6459-2019-1(99)-24-29
- Neu C, Stein N, Keller B (2002) Genetic mapping of the *Lr20-Pm1* resistance locus reveals suppressed recombination on chromosome arm 7AL in hexaploid wheat. *Genome* 45: 737–744. DOI: 10.1139/g02-040
- Pestsova E, Ganai MW, Röder MS (2000) Isolation and mapping of microsatellite markers specific for the D genome of bread wheat. *Genome* 43(4): 689–697. DOI: 10.1139/g00-042
- Peterson RF, Campbell AB, Hannah AE (1948) A diagrammatic scale for estimating rust intensity on leaves and stems of cereals. *Canad. J. Res.* 26: 496–500.
- Procunier JD, Townley-Smith TF, Fox S, Prashar S., Gray M., Kim W K., Czarnecki E. Dyck PL (1995) PCR-based RAPD/DGGE markers linked to leaf rust resistance genes *Lr29* and *Lr25* in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Genetics and Breeding* 49: 87–92.
- Qiu JW, Schürch AC, Yahiaoui N, Dong LL, Fan HJ, Zhang ZJ, Keller B, Ling HQ (2007) Physical mapping and identification of a candidate for the leaf rust resistance gene *Lr1* of wheat. *Theor. Appl. Genet.* 115: 159–168. DOI: 10.1007/s00122-007-0551-z
- Rsaliev ShS, Tileubaeva ZS, Rsaliev AS, Agabaeva ACh (2004) Methods for identifying important grain crop varieties within the introduced breeding material: methodical recommendation (Metody vyjavlenija cennyh sortov zernovyh kul'tur sredi introducirovannyh selekcionnyh materialov: metodicheskaja rekomendacija). Inv. No. 828. 15 p. [in Russian] (Рсалиев Ш.С., Тилеубаева Ж.С., Рсалиев А.С., Агабаева А.Ч. Методы выявления ценных сортов зерновых культур среди интродуцированных селекционных материалов: методическая рекомендация. пгт. Гвардейский. Инв. № 828. 15 с.).
- Saari EE, Prescott JM (1975) A scale for appraising the foliar intensity of wheat diseases. *Plant Dis. Rep.* 59: 377–380.
- Sanin SS (2012) Epiphytotic diseases of cereal crops: theory and practice. Selected works (Epifitotii boleznej zernovyh kul'tur: teoriya i praktika. Izbrannye trudy). Moscow: All-Russian Research Institute of Phytopathology (VNIIF). p. 446–458 [in Russian] (Санин С.С. Эпифитотии болезней зерновых культур: теория и практика. Избранные труды. М.: Всероссийский научно-исследовательский институт фитопатологии (ВНИИФ). 2012. С. 446–458).
- Skolotneva ES, Bukatich EYu., Boiko NI, Piskarev VV, Salina EA (2018) Screening of the international stem rust nursery trap for Ug99 in conditions of the forest-steppe Ob river area in 2017 (Skrining mezhdunarodnoy pitomnika stebel'voy rzhavchiny na Ug99 v usloviyakh Priob'skoy lesostepi v 2017 godu). In: Genofond i selektsiya rasteniy: materialy IV Mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii – The gene pool and plant breeding: materials of the IV International Scientific Practical Conference, Novosibirsk, p. 313–318 [in Russian] (Сколотнева Е.С., Букагич Е.Ю., Бойко Н.И., Пискарев В.В., Салина Е.А. Оценка пшеничного питомника-ловушки для расы стеблевой ржавчины Ug99 в условиях лесостепи Приобья в 2017 году // Генофонд и селекция растений: материалы IV Международной научно-практической конференции. Новосибирск, 2018. С. 313–318).
- Sibikeev SN, Krupnov VA (2007) Evolution of leaf rust and protection from it in the Volga region (Evolyuciya listovoj rzhavchiny i zashchita ot nee v Povolzh'e). *Vestnik Saratovskogo gosuniversiteta im. Vavilova – The Vavilov Bulletin of the Saratov State University*. Special edition: 92–94 [in Russian] (Сибикеев С.Н., Крупнов В.А. Эволюция листовой ржавчины и защита от нее в Поволжье // Вестник Саратовского государственного университета им. Вавилова. Спец. выпуск. 2007. С. 92–94).
- Weng Y, Azhaguvel P, Devkota R.N, Rudd JC (2007) PCR based markers for detection of different sources of 1AL.1RS and 1BL.1RS wheat-rye translocations in wheat background. *Plant Breed.* 126: 482–486. DOI: 10.1111/j.1439-0523.2007.01331.x
- Wilcoxson RD, Skovmand B, Atif AH (1975) Evaluation of wheat cultivars for ability to retard development of stem rust. *Annual Applied Biology* 80(3): 275–281.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ МЕТОДА ВОЗВРАТНЫХ СКРЕЩИВАНИЙ В ДИГАПЛОИДНОЙ СЕЛЕКЦИИ КУКУРУЗЫ

Михайлов М. Э.

Институт генетики, физиологии и защиты растений
MD2002, Молдова, Кишинев, ул. Лесная, 20;
✉ mihailov-me@mail.ru

Дигаплоидные (ДН) линии, получаемые удвоением генома гаплоидов, широко применяются в селекции многих культур, так как позволяют в сжатые сроки переводить варианты генов в гомозиготное состояние. Однако в селекции кукурузы преимущества дигаплоидов используются еще не в полной мере. В настоящей работе дана оценка эффективности метода возвратных скрещиваний и получили дальнейшее развитие оригинальные авторские схемы, направленные на создание максимально продуктивной гомозиготной линии кукурузы на основе ДН-линий, полученных из межлинейного гибрида F_1 . Исходный материал – линии кукурузы Rf7 и Ku123. Цикл селекции состоял в получении гаплоидов из выбранного генотипа (матроклинная гаплоидия с применением индуктора), последующем удвоении хромосом (с помощью колхицина или спонтанно) и размножении полученных дигаплоидов для получения нового набора ДН-линий. В первом цикле ДН-линии получали из гибрида F_1 (Rf7 × Ku123), а в следующих циклах – из генотипов, полученных скрещиванием выбранной ДН-линии предыдущего цикла с F_1 , P_1 или P_2 . Выполнены три цикла селекции на продуктивность, в 2017 году проведено одновременное полевое испытание ДН-линий всех циклов. Селекционный прогресс оценивали по приросту продуктивности первого початка в сравнении с лучшим родителем Rf7 (103,9 г/растение в 2017 году). В результате первого цикла селекции на основе гибрида F_1 получены 43 ДН-линии, продуктивность лучшей из них (rk-5) составила 112,5 г/раст. Три линии (rk-6, rk-5 и rk-22), отобранные для следующего цикла, затем были скрещены с F_1 либо с родительской линией Rf7. Во втором цикле селекции получены серии из 41, 49 и 16 линий соответственно. Продуктивность лучших генотипов составила 121,2, 117,0 и 107,1 г/раст. Третий цикл включал популяции из 24 и 8 линий, полученных на основе возвратных скрещиваний с линиями Rf7 и Ku123 соответственно. Лучшие генотипы этих серий характеризовались продуктивностью 135,6 и 97,7 г/раст. В результате селекции получена линия rk-433, на 30,5% превосходящая по продуктивности лучшего родителя Rf7. Селекционный прогресс составил в среднем 10,2% за цикл. В дигаплоидной селекции кукурузы перспективно использование возвратных скрещиваний отобранных ДН-линий из разных циклов с исходным материалом или с F_1 . При таком методе заметный прогресс возможен и при небольшом объеме циклов, включающих от 20 до 50 ДН-линий.

Ключевые слова: удвоенные гаплоиды, кукуруза, дигаплоидная селекция, благоприятные аллели, продуктивность, инбредные линии.

Прозрачность финансовой деятельности / The transparency of the financial activities Автор не имеет финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах.

Автор благодарит рецензентов за их вклад в экспертную оценку этой работы / The author thank the reviewers for their contribution to the peer review of this work

Дополнительная информация / Additional information Полные данные этой статьи доступны / Extended data is available for this paper at <https://doi.org/10.30901/2658-6266-2019-2-24-32>

Мнение журнала нейтрально к изложенным материалам, авторам и их месту работы / The journal's opinion is neutral to the presented materials, the author, and his or her employer

Автор одобрил рукопись / Author approved the manuscript

Конфликт интересов отсутствует / No conflict of interest

EFFICIENCY OF THE BACKCROSSING METHOD IN DIHAPLOID MAIZE BREEDING

Mikhailov M. E.

Institute of Genetics, Physiology and Plant Protection,
20 Lesnaya St., Chisinau MD2002, Moldova
✉ mihailov-me@mail.ru

The doubled haploid (DH) lines, obtained by doubling the haploid genome, are now widely used in breeding many crops, since they allow to transfer gene variants to the homozygous state in a short time. However, the advantages of doubled haploids are not fully utilized in maize breeding. The present work is devoted to the evaluation of the backcrossing method efficiency and to further development of the original schemes of creating highly productive homozygous maize lines on the basis of DH lines originating from an interline F_1 hybrid. Rf7 and Ku123 maize lines were used as the initial material. The breeding cycle consisted of producing haploid plants in the selected genotype (matroclin haploidy using an inducer), subsequent chromosome doubling (colchicine-induced or spontaneous), followed by multiplication of the doubled haploids for obtaining a new set of DH lines. In the first cycle, the DH lines were obtained from the F_1 hybrid (Rf7 × Ku123), while in the subsequent cycles they were obtained from the genotypes obtained by crossing a DH line selected from the previous cycle with F_1 , P_1 or P_2 . Three cycles of selection for productivity were performed, and in 2017 the DH lines obtained in all cycles were simultaneously tested in the field. The breeding progress was estimated by the increase in the first ear productivity compared to the best parent Rf7 (103.9 g per plant in 2017). The first selection cycle resulted in 43 DH lines obtained on the basis of the F_1 hybrid. Productivity of the best line rk-5 amounted to 112.5 g per plant. Three lines (rk-6, rk-5 and rk-22) selected for the next cycle were further crossed with F_1 or with the parental line Rf7. The second selection cycle yielded three series containing 41, 49 and 16 lines, while productivity of the best genotypes was 121.2, 117.0 and 107.1 g per plant, respectively. The third cycle included populations of 24 and 8 lines obtained through backcrosses with Rf7 and Ku123 lines, respectively. The best genotypes in these series had productivity of 135.6 and 97.7 g per plant. As a result of selection, the obtained rk-433 line had a productivity 30.5% higher than that of the best parent Rf7. The progress averaged 10.2% per cycle. In maize breeding using doubled haploids it is promising to use backcrosses of the selected DH lines with the initial material or with F_1 . Thanks to such an approach, a noticeable progress can be reached with a small number of cycles including from 20 to 50 DH lines.

Key words: doubled haploids, maize, doubled haploid breeding, favorable alleles, grain yield, inbred lines.

Для цитирования: Михайлов М. Э.

Эффективность метода возвратных скрещиваний в дигаплоидной селекции кукурузы. *Биотехнология и селекция растений*. 2019;2(2):24-32. DOI: 10.30901/2658-6266-2019-2-24-32

For citation: Mikhailov M. E.

Efficiency of the backcrossing method in dihaploid maize breeding. *Plant Biotechnology and Breeding*. 2019;2(2):24-32. (In Russ.) DOI: 10.30901/2658-6266-2019-2-24-32

ORCID:

Михайлов М. Э. orcid.org/0000-0003-1204-410X
УДК 633.15:631.527

Поступила в редакцию: 15.10.2018
Принята к публикации: 11.06.2019

Введение

Дигаплоидные (DH) линии – это гомозиготные линии, получаемые удвоением генома гаплоидов. Гаплоиды получают из мужских или женских гамет исходного диплоидного растения. В отличие от многих других видов растений, у которых андроклинные гаплоиды получают из культуры пыльников, у кукурузы применяется большей частью матроклинный способ, когда зерна с гаплоидным зародышем развиваются из редуцированной яйцеклетки после опыления пыльцой специальной линии – гаплоидного индуктора. Геном гаплоидного организма затем удваивают и после размножения получают полностью гомозиготную дигаплоидную (DH) линию. Полученный результат равносителен результату многолетнего инбридинга. В генетическом отношении DH-линии подобны рекомбинантным инбредным линиям (RILs), но выгодно отличаются от них сжатыми сроками получения и отсутствием остаточной гетерозиготности, характерной для линий, получаемых инбридингом.

В массовом порядке DH-линии начали использовать сравнительно недавно, начиная с 1990-х годов. В последние десятилетия дигаплоиды широко используются в селекции наряду с RILs (Melchinger et al., 2013), а в селекции кукурузы их роль оценивается даже как революционная (Hu et al., 2016). По данным J. Murovec и B. Bohanec (2012), на основе дигаплоидных линий создано 290 сортов различных сельскохозяйственных культур, среди которых рис, пшеница, тритикале, ячмень, баклажан, дыня, перец.

Основное применение дигаплоиды кукурузы нашли в селекционных программах, в которых DH-линии выступают как замена RILs (например, Bordes et al., 2006). С помощью дигаплоидов можно быстро переводить варианты генов в состояние полной гомозиготности и таким образом экономить время. Согласно A. Barkley и F. G. Ghumley (2012), создание сорта пшеницы от закладки опыта до выхода на рынок занимает 8–12 лет обычными методами и 6–9 лет с помощью дигаплоидов.

Дигаплоиды, по сравнению с RILs, предоставляют новые возможности комбинирования генетического материала и позволяют использовать в практической селекции новые подходы.

T. Lübberstedt и U. K. Frei (2012) предлагали использовать дигаплоиды для интрогрессии сразу нескольких генов. Обычным методом насыщающего беккроссирования можно переносить лишь ограниченное число генов, но с применением DH-линий возможности этого метода усиливаются благодаря свойственному им расщеплению. Если, например, в F_2 , полученном от скрещивания диплоидных генотипов, сочетание из 5 генов встречается с частотой 1/1024, то среди DH-линий – с частотой 1/32.

Этот подход следует признать перспективным, хотя о практической реализации его у нас сведений нет. Пока

что дигаплоиды использовали для интрогрессии единичных генов, например, гена устойчивости к гербициду у горчицы (Mithila, Hall, 2007) и гена устойчивости к желтой ржавчине у пшеницы (Bakhtiar et al., 2014). Дигаплоиды в этих случаях использовались лишь на завершающем этапе селекции для быстрой гомозиготизации отобранных вариантов – то есть в том же качестве, в каком используются RILs.

Наше внимание привлекла задача создания из гибрида гомозиготной линии, в которой было бы накоплено как можно большее число полученных от обоих родителей аллелей, оказывающих положительное влияние на проявление хозяйственно ценных признаков (далее – благоприятные аллели). В настоящее время в дигаплоидной селекции обычно ограничиваются одним циклом, получая из исходной популяции (гибрида, сорта, синтетика и пр.) популяцию DH-линий и выбирая из них лучшую. Гаметическое расщепление позволяет создавать вторичные популяции DH-линий (то есть новые циклы) от скрещивания лучшей DH-линии с исходным материалом, используя его, как донор благоприятных аллелей. В предыдущей нашей работе (Mikhailov, 2010) показано, как можно таким способом, цикл за циклом, накапливать в DH-линиях аллели с положительными аддитивными эффектами. Это, в сущности, и есть упомянутая выше интрогрессия групп генов, но проводимая вслепую, без генетических маркеров, с отбором только по фенотипу.

В данной работе представлены результаты трех циклов дигаплоидной селекции в бипарентальной [ред. двуродительской] популяции кукурузы с применением возвратных скрещиваний DH-линий с F_1 , а также с родительскими формами (P_1 и P_2).

Материалы и методы

Исходный материал для селекции – простой гибрид кукурузы Rf7 × Ku123, который далее будем для краткости обозначать как F_1 . Его урожайность составляет 60–80 ц/га в хорошие годы. Он примерно на четверть уступает по урожайности таким районированным в Молдове гибридам, как M291MB и M450MB, но выбран нами из-за высокой эффективности получения дигаплоидов. Линия Rf7 отличается хорошей урожайностью (40–45 ц/га), у линии Ku123 урожайность ниже (30 ц/га), но она отличается засухоустойчивостью.

Гаплоидные растения получали, применяя созданные в нашем институте индукторы MHI и LHI. При опылении индуктором в большинстве случаев происходит нормальное двойное оплодотворение, но некоторые зерна развиваются с триплоидным эндоспермом и гаплоидным зародышем, который содержит только хромосомы от материнской формы. Оба индуктора несут доминантный аллель *R1-nj*, который в сочетании с другими генами

антоциановой окраски вызывает пигментацию зародыша, что позволяет отличать гаплоиды от диплоидов на стадии сухих зерновок. Гаплоидные зародыши не окрашены, так как в них отсутствует аллель *R1-nj* (Nanda, Chase, 1966).

Для удвоения генома гаплоидов применяли разные варианты колхициновой обработки. Чаще всего использовали метод С. Даймлинга (Deimling et al., 1997): у проростков длиной 3–4 см отщипывали кончики coleoptилей и погружали на 12 часов в 0,06% раствор колхицина с добавлением 0,5% DMSO, после чего проростки пересаживали в поле. Применяли и беспересадочный метод с обработкой проростков прямо в поле: раствор колхицина концентрации 0,030–0,012% подавали по нитке через прокол, проходящий ориентировочно через точку роста. В некоторых вариантах отмечалась высокая частота спонтанного удвоения хромосом, и в таких случаях обходились без колхицина.

Растения, выжившие после обработки, впоследствии самоопылялись. Это было возможно для тех растений, у которых в результате обработки произошло удвоение хромосом в клетках хотя бы небольшого сектора зародышевой метелки. Каждая семья, полученная от самоопыления обработанных колхицином растений, представляла собой ДН-линию. Как правило, они были малочисленны (многие представлены только одним зерном), поэтому в следующем сезоне их размножали. Каждый цикл получения ДН-линий, включал, таким образом, три этапа: 1) получение гаплоидов, 2) удвоение хромосом, 3) размножение.

Первичная популяция состояла из 43 ДН-линий, полученных непосредственно из гибрида F_1 и получивших обозначения с *rk-1* по *rk-60*, а вся первичная популяция

обозначена как «серия *rk-0*». От трех линий этой серии получены три популяции второго цикла, и от двух линий второго цикла получены две популяции третьего цикла (схема на рис. 1).

Дигаплоидные линии испытывали по мере их получения. Самое полное испытание проведено в 2017 году, когда испытывались одновременно представители всех трех циклов. Испытание проводили в трех повторностях по 5 растений в каждой, при густоте стояния 3 раст./м². Контрольные генотипы (*Rf7*, *rk-5*, *rk-6*, *rk-22*, *rk-138*, *rk-148* и F_2) высевали в 6 повторностях. Продуктивность оценивали после сушки початков, при влажности зерна около 10%. Проводили отбор на продуктивность первого початка. Во-первых, агрономически предпочтительнее, когда продуктивность зависит в основном от первого початка. Вторые початки чаще теряются, при ручной уборке их часто пропускают, и тогда оценка урожайности может оказаться необъективной. Во-вторых, продуктивность второго початка сильно зависит от внешних условий.

Кроме дигаплоидных линий, в тех же условиях, но в отдельно расположенных блоках испытывались потомства от тест-скрещиваний с родительскими формами *Rf7* и *Ky123*.

Средние значения показателей продуктивности у дигаплоидных линий сравнивались с ожидаемыми по аддитивно-доминантной модели, в рамках которой значение признака определяется только внутрилокусными взаимодействиями (аддитивными и доминантными), а неаллельные взаимодействия отсутствуют (Mather, Jinks, 1985). Воспроизводимость результатов по годам оценивали по значениям коэффициента корреляции Пирсона.

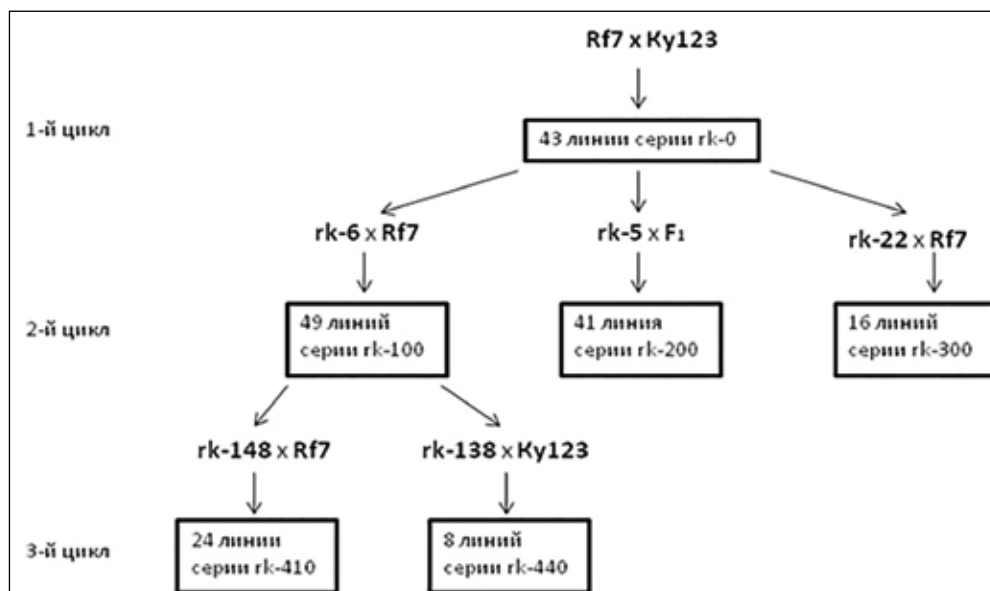


Рис. 1. Схема селекционного процесса, использованного в работе

Fig. 1. Diagram of the selection process used in the work

Результаты

Первый цикл. Дигампоидные линии первого цикла, полученные непосредственно из F_1 , испытывали по мере их создания в период с 2010 по 2017 год. На рисунке 2 представлено графическое распределение этих линий по продуктивности первого початка в разные годы изучения.

В первом цикле ДН-линии распределились не вокруг среднего родительского значения, как ожидалось по аддитивно-доминантной модели, а вокруг худшего родителя Ky123. Около половины линий имели продуктивность

ниже, чем Ky123, тогда как отдельные линии достигали или превышали по продуктивности уровень лучшего родителя Rf7. Для 2017 года реконструирована ожидаемая продуктивность первого початка у линии Ky123, которая составила 75 г/раст.

Распределение ДН-линий по продуктивности явно несимметрично, в распределениях хорошо заметны растянутые «нижние хвосты» (рис. 2). Асимметричность распределения и сдвиг его в нижнюю сторону свидетельствует о неаллельных взаимодействиях комплементарного типа, когда эффект суммы генов больше суммы эффектов.

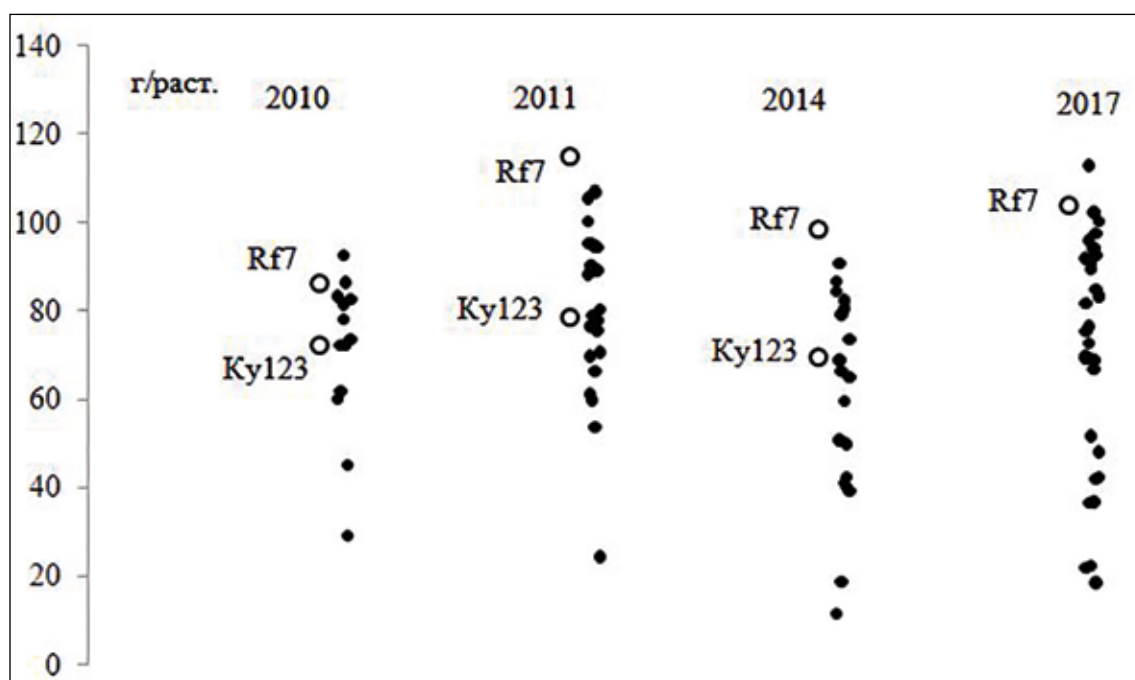


Рис. 2. Значения продуктивности первого початка у линий серии rk-0. Линии на диаграмме обозначены точками, по оси ординат отложены значения их продуктивности. Крупными точками обозначены исходные родительские формы Rf7 и Ky123

Fig. 2. The first ear grain yield in DH lines of the rk-0 series. Lines marked by dots in the diagram; grain yield values are plotted on the y-axis. Large dots indicate the original parental lines Rf7 and Ku123

Воспроизводимость результатов по годам довольно неплохая: корреляции между значениями признака в разные годы изучения составляют $r = 0,74 \div 0,76$ (рассчитаны при сравнении данных 2011–2017 гг. и 2014–2017 гг., где оценено много общих линий). Лучшей ДН-линией первого цикла признана rk-5, так как по результатам испытаний в 2010 и 2017 гг. она превысила по продуктивности линию Rf7. Остальные линии ни разу не превысили по продуктивности первого початка линию Rf7, за исключением rk-6, для которой превышение наблюдалось только в 2010 году.

Второй цикл. Согласно схеме, обоснованной нами

ранее (Михайлов, 2010), второй цикл следовало бы заложить от скрещивания лучшей линии первого цикла rk-5 с F_1 , что и было впоследствии сделано. Но вначале было решено отступить от схемы и выбрать линию не по продуктивности, а по комбинационной способности и скрестить ее с одним из родителей. Это решение было вызвано тем, что в нашем распоряжении оказалась информация о продуктивности потомств от тест-скрещиваний ДН-линий с родителями, использование которой в схеме не предусмотрено, но которая позволяет сделать заключения о распределении благоприятных (плюс) аллелей между родителями.

При испытаниях потомств от тест-скрещиваний обнаружилась высокая продуктивность гибрида $rk-6 \times Rf7$, почти равная продуктивности F_1 ($Rf7 \times Ky123$): 150,2 г/раст. по сравнению с 156,2 г/раст. у F_1 в 2009 г., 131,6 по сравнению с 147,0 в 2010 г. и 188,9 по сравнению с 192,8 в 2011 г. Таким образом, комбинативная способность линии $rk-6$ почти сравнялась с комбинативной способностью линии $Ky123$. Второй цикл был заложен от скрещивания этой линии с $Rf7$, а не с F_1 . Из гибрида $rk-6 \times Rf7$ было произведено 49 ДН-линий, получивших обозначения с $rk-101$ и выше, а весь набор был обозначен как «серия $rk-100$ » (рис. 1).

Следующая серия, $rk-200$, насчитывающая 41 линию, была получена от скрещивания $rk-5 \times F_1$. Линия $rk-5$ выбрана по собственной продуктивности. Предполагалось, что в ней накоплено больше всего благоприятных аллелей от обоих родителей, и число их можно увеличить, перенеся их из F_1 как из оптимального донора. В качестве примера проследим генотип произвольного локуса A . Линия $rk-5$ может иметь генотип AA или aa . Если линия имеет генотип AA , то скрещивая ее с F_1 , получаем $AA \times Aa = AA + Aa$. Растения с генотипом AA (половина растений в потомстве) дадут затем начало гаплоидам, несущим аллель A , и далее ДН-линиям

с генотипом AA . Из другой половины растений с генотипом Aa будут получены гаплоиды, несущие аллели A и a и затем ДН-линии AA и aa в соотношении 1:1. Следовательно, $\frac{3}{4}$ от числа ДН-линий второго цикла будут иметь генотип AA и $\frac{1}{4} - aa$. И наоборот, если у линии $rk-5$ генотип aa , то $\frac{3}{4}$ линий второго цикла будут с генотипом aa и $\frac{1}{4}$ с генотипом AA . Таким образом, выполнение второго цикла в таком варианте приведет к обновлению генома линии-предшественника (в данном случае $rk-5$) в среднем на четверть.

Третья серия, $rk-300$ (включавшая 15 линий) была получена из гибрида от скрещивания $rk-22 \times Rf7$ и представляла собой дублирующий вариант серии $rk-100$.

Результаты одновременного испытания линий в 2017 году приведены в таблице и на рисунке 3. Удачными оказались два варианта их трех: $rk-100$ и $rk-200$.

Серия $rk-100$ испытывалась дважды, в 2013 и 2017 гг., и результаты воспроизвелись удовлетворительно, с корреляцией $r = 0,69$. Серии $rk-200$ и $rk-300$ тоже испытывались в течение двух лет, один из которых, 2015 г., был засушливым и потому нетипичным. Результаты, полученные в 2015 г., очень слабо коррелировали с данными 2017 года ($r = 0,36$), поэтому для двух последних серий лучше принимать во внимание только результаты 2017 года.

Таблица. Результаты одновременного испытания ДН-линий в 2017 г.

Table. Results of DH lines simultaneous test in 2017

Цикл Cycle	Серия Series	Число ДН-линий Number of DH lines		Продуктивность, г/раст. Grain yield, g/plant			
		общее total	превосходящих по продуктивности $Rf7$ With productivity above that of $Rf7$	средняя mean	медиана median	max	min
1	$rk-0$	31	1(3)	71,1 (76,5)	76,2 (86,6)	112,5 (112,8)	18,2 (20,6)
2	$rk-100$	43	6(11)	85,0 (91,9)	84,4 (93,1)	121,2 (128,6)	31,7 (34,6)
	$rk-200$	40	9(13)	87,1 (93,3)	90,6 (67,4)	117,0 (124,4)	48,6 (50,3)
	$rk-300$	15	1(1)	81,8 (83,2)	82,2 (83,3)	107,1 (108,1)	39,6 (39,6)
3	$rk-410$	24	4(4)	90,8 (91,0)	93,0 (93,4)	135,6 (135,6)	46,1 (46,1)
	$rk-440$	8	0(0)	59,2 (66,0)	49,0 (68,6)	97,7 (97,7)	22,8 (27,2)
Контроль Controls	$Rf7$			103,9 (104,4)			
	F_2			138,8 (155,5)			

Примечание. Данные без скобок относятся к первому початку, данные в скобках – к общей продуктивности

Note: The data without brackets refer to the first ear; the total grain yield is given in brackets

Если судить по данным 2017 года, то средняя продуктивность в двух успешных сериях выросла примерно на 1/5 по сравнению с первым циклом, независимо от того, учитывалась ли продуктивность вторых початков или нет. Ряд линий превосходили по продуктивности лучшего родителя Rf7. Если учитывать продуктивность только первого початка, то в серии rk-100 таких линий было 11 из 50 в 2013 году и 6 из 43 в 2017, из них четыре линии превосходили лучшего родителя по продуктивности в оба года изучения. В 2017 году в серии rk-200 таких линий было 9 из 40.

Распределение ДН-линий по продуктивности, судя по

диаграммам, стало более симметричным, «нижние хвосты» стали менее выраженными, за счет чего сократилась абсолютная вариация. Сдвиг центра распределения в нижнюю сторону относительно ожидаемого по аддитивно-доминантной модели уменьшился. Если для серии rk-0 он равнялся 18,1 в 2017 году, то для серий rk-100 и rk-200 – 12,4 и 13,8. Значения ожидаемых средних составили: для серии rk-0: $MP = \frac{Rf7 + Ky123}{2} = 89,2$, для серии rk-100: $\frac{Rf7 + rk6}{2} = 97,4$, для серии rk-200: $\frac{rk5 + MP}{2} = 100,9$. Таким образом неаллельная компонента во втором цикле сохранилась, хотя и уменьшилась.

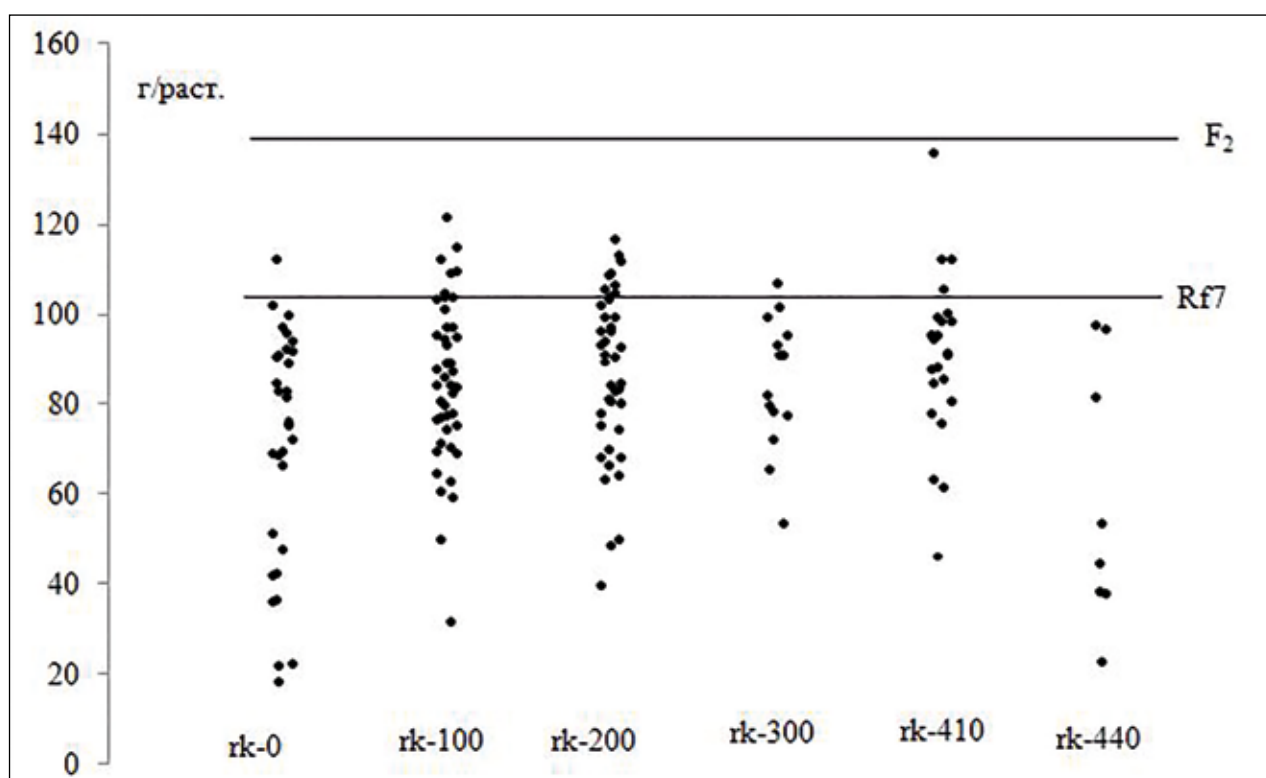


Рис. 3. Продуктивность первого початка во всех сериях в 2017 году

Fig. 3. The first ear grain yield for all series in 2017

В серии rk-300 отмечен меньший прогресс. Средняя продуктивность линий по сравнению с первым циклом выросла на 15,1%, а если учитывать продуктивность вторых початков – то на 8,8%. В 2017 году среди 15 ДН-линий только rk-305 превосходила по продуктивности линию Rf7.

Селекционный прогресс можно оценивать и по лучшей линии в цикле. Тогда по продуктивности первого початка прогресс составит 7,8% и 4,1% для серий rk-100 и rk-200, соответственно, а по общей продуктивности – 14,0% и 10,3%. Для серии rk-300 ни по одному из этих

показателей прогресса не наблюдалось.

Выбрать лучшую линию во втором цикле затруднительно, из-за влияния внешних условий и эффекта величины выборки. Поэтому самые перспективные линии испытывали дополнительно. По совокупности всех испытаний лучшей линией в серии rk-100 оказалась rk-142, которая, к сожалению, не была представлена в 2017 году. В 2016 году эта линия по продуктивности первого початка почти вплотную приблизилась F_2 ($Rf7 \times Ky123$), хотя заметно уступила F_2 по общей продуктивности. Переход за уровень F_2 означает состояние, когда использова-

ние ДН-линии выгоднее, чем пересев семян от F_1 , и которое можно назвать частичным закреплением гетерозиса. Поэтому на рисунке 3 обозначен, наряду с уровнем линии Rf7, и уровень F_2 (Rf7 × Ky123).

Третий цикл. Решение о проведении третьего цикла основывалось на результатах испытания серии rk-100 в 2013 году. Предшественник этой серии, rk-6, был отобран не по продуктивности, а по комбинационной способности. Результаты 2013 года показали, что этот прием может быть удачным, поэтому было решено повторить его в двух вариантах: 1) получить серию дигаплоидов из максимально продуктивного тест-скрещивания с Rf7; 2) получить серию дигаплоидов из максимально продуктивного тест-скрещивания с Ky123.

По продуктивности был отобран материал от двух комбинаций текст-скрещиваний, на основе которых затем получили серии из 24 и 8 линий. Эти серии получили обозначения rk-410 и rk-440. Небольшой объем серий вызван тем, что в этом случае было решено обойтись без колхидина, полагаясь на спонтанное удвоение. Обе серии испытаны в 2017 году, в общем посеве.

Серия rk-410 оказалась лучшей как по средней продуктивности входящих в нее линий, так и по продуктивности лучшей линии. Средняя продуктивность линий серии rk-410 составила 90,8 г/раст., что на 6,8% выше средней продуктивности линий серии-предшественника rk-100 (85,0 г/раст.) (см. таблицу). Значение продуктивности первого початка лучшей линии этой серии (rk-433) оказалось на 11,9% выше, чем у лучшей линии второго цикла rk-117 и вплотную приблизилось к значе-

нию F_2 (Rf7 × Ky123), хотя из-за отсутствия вторых початков показатели общей продуктивности были ниже, чем у F_2 . К сожалению, не было возможности сравнить эту линию с rk-142. Другим преимуществом этой серии является почти полное отсутствие вторых початков в составляющих ее линиях. Неаллельные взаимодействия уменьшились: сдвиг центра распределения вниз относительно ожидаемого среднего $\frac{Rf7+rk148}{2} = 95,7$ составляет уже 4,9, что значительно ниже, чем в предыдущих сериях.

Другая серия – rk-440 – оказалась явно неудачной. Ни одна линия не превысила по продуктивности уровень Rf7, а среднее значение продуктивности оказалась даже ниже, чем в первом цикле.

Общий итог подведем по данным одновременного испытания линий в 2017 году. Началась селекция с двух линий, Rf7 и Ky123, лучшая из которых, Rf7, имеет продуктивность 103,9 г/раст. Это значение считаем стартовым. Конечное значение продуктивности (135,6 г/растение у линии rk-433) превысило его на 30,5%, что можно считать селекционным прогрессом за три цикла или в среднем 10,2% за цикл. На рисунке 4 изображен схематически селекционный путь от Rf7 до rk-433 через два промежуточных этапа (серии rk-0 и rk-100). Промежуточные приросты продуктивности выражены двояко: по лучшей линии в цикле и по средним значениям в цикле. Вторая величина более устойчивая и точная, но зато первая величина важнее практически, так как цель дигаплоидной селекции – получить хорошую линию, а не хорошую серию.

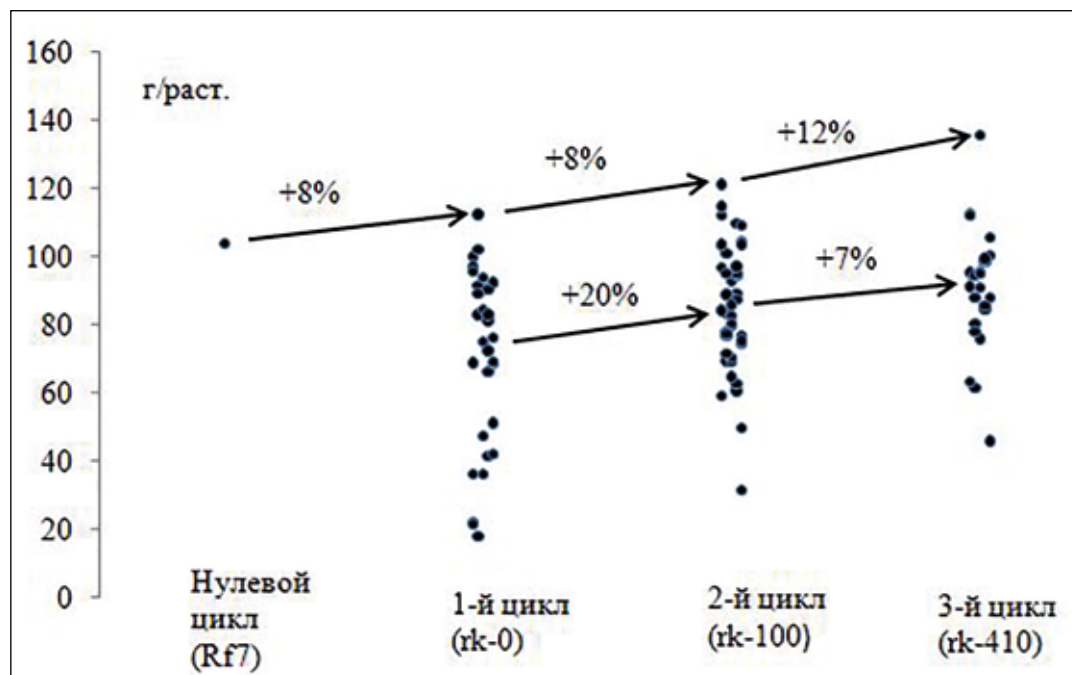


Рис. 4. Прогресс в трех циклах селекции по данным одновременного испытания линий в 2017 г.

Fig. 4. Yield improvement achieved in three selection cycles according to the simultaneous test data of 2017

Обсуждение

Достигнутый результат (увеличение продуктивности в среднем на 10,2% за цикл) выглядит неплохо на фоне других результатов, полученных у кукурузы методом рекуррентной селекции. Например, J. Bordes et al. (2006) сравнивали два способа рекуррентной селекции: обычный и с включением дигамноидных стадий. В обоих случаях получен селекционный прогресс по комбинационной способности около 7% за цикл. Z.-B. Peng et al. (2007) испытывали 3 варианта рекуррентной селекции и достигли уровня селекционного прогресса за цикл 5–6% *per se* и 3–5% по комбинационной способности. В исследованиях M. M. El-Rouby et al. (2017) селекционный прогресс за цикл составил 9% *per se*, а в работе S. Jenweerawat et al. (2009) – 15% по комбинационной способности.

Наши результаты показывают, что в дигамноидной селекции можно с успехом применять такие приемы, которые в обычной рекуррентной селекции были бы рискованными. Если в рекуррентной селекции улучшенный генотип скрестить с исходным материалом с целью возврата утраченных в ходе селекции благоприятных аллелей, то это приведет не к прогрессу, а к регрессу.

Если в рекуррентной селекции ведется «мягкий» отбор, для того, чтобы избежать потери благоприятных аллелей и не потерять генетическое разнообразие, то свойственное дигамноидам расщепление 1 : 1 позволит применять противоположную стратегию: вести предельно жесткий отбор, а утраченные благоприятные аллели возвращать в геном через скрещивания с генотипами, полученными на предыдущих стадиях селекции или при скрещиваниях с исходным материалом. При таких скрещиваниях будет восстанавливаться и генетическое разнообразие в популяции ДН-линий.

Наш результат также показывает, что эффективнее вести ступенчатую селекцию, пусть и с небольшим числом вариантов на каждом этапе, чем искать наилучший вариант в многочисленном первом цикле (как, например, в работе O. Odiyo et al. (2014), где дигамноидная селекция ограничилась одним циклом, в котором было получено 806 ДН-линий). Можно приблизительно оценить для нашего случая, насколько вероятно найти в цикле гк-0 линию с такой же продуктивностью, как гк-433, если бы мы решили сделать этот цикл более многочисленным. Отклонение продуктивности гк-433 от среднего гк-0 составляет 3,38σ. Для нормального распределения вероятность такого события 1/2800, то есть надо получить около 3000 ДН-линий, чтобы найти линию с такой же продуктивностью, как гк-433. В то же время трехступенчатая селекция потребовала испытания всего 116 линий: 43 в серии гк-0, 49 в серии гк-100 и 24 в серии гк-410.

Остается открытым вопрос о лучшем способе выбора линии-предшественника для закладки следующего цик-

ла. В нашем эксперименте этот выбор производился пять раз. Один раз (при получении серии гк-200) предшественник выбирался по собственной продуктивности, и выбор оказался удачным. В остальных четырех случаях, когда предшественник выбирался по комбинационной способности, два раза выбор оказывался удачным и два раза неудачным. Выбор по комбинационной способности, как видим, не всегда эффективен, но об эффективности альтернативного способа выбора – по собственной продуктивности – нельзя сказать ничего определенного, пока мы располагаем только одним примером.

Следует ожидать, что при достаточно большом числе благоприятных аллелей, накопленных в геноме дигамноидных линий, скрещивание с исходным материалом будет уже менее эффективным: теряться плюс-аллелей будет больше, чем приобретаться. В этих случаях дальнейший прогресс возможен, если после скрещивания с исходным материалом проводить скрещивания с лучшей линией предыдущего цикла, используя ее в качестве донора для возврата утраченных плюс-аллелей. В предыдущей нашей работе такие скрещивания названы восстановительными (Mikhailov, 2010).

Уровень селекционного прогресса при использовании описанного метода в селекции кукурузы предсказать сложно. Теоретически таким путем можно повысить продуктивность ДН-линий и до уровня F_1 , так как, согласно современным представлениям, за продуктивность F_1 отвечают в основном доминантные взаимодействия, а не сверхдоминантные (Kaeppler, 2012; Fievet et al., 2018). На практике это зависит от того, какое число благоприятных аллелей требуется накопить в геноме кукурузы для достижения такого результата. Выяснить это можно лишь экспериментально, в процессе дальнейшей дигамноидной селекции.

Выводы

1. В дигамноидной селекции кукурузы можно применять метод возвратных скрещиваний, когда материалом для очередного цикла является потомство от скрещивания лучшей дигамноидной линии предыдущего цикла с исходным материалом (F_1 , P_1 или P_2).
2. При таком методе очередной цикл селекции надо выполнять не менее чем в двух параллельных вариантах от разных линий-предшественников, так как при одном варианте выбор предшественника может оказаться неудачным.
3. Для эффективной дигамноидной селекции кукурузы с использованием такого метода достаточно получать в цикле 20–50 дигамноидных линий.

References/Литература

- Bakhtiar F, Afshari F, Najafian G, Mohammadi M (2014) Backcross-breeding and doubled-haploid facilitated introgression of stripe rust resistance in bread wheat. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 47 (14): 1675–1685. DOI: 10.1080/03235408.2013.854612
- Barkley A, Chumley FG (2012) A Doubled haploid laboratory for Kansas wheat breeding: An economic analysis of biotechnology adoption. *International Food and Agribusiness Management Review* 15 (2): 99–120.
- Bordes J, Charmet G, de Vaulx RD et al. (2006) Doubled haploid versus S_1 family recurrent selection for testcross performance in a maize population. *Theor. Appl. Genet.* 112: 1063–1072. DOI 10.1007/s00122-006-0208-3
- Deimling S, Röber F, Geiger HH (1997) Methodik und genetik der *in-vivo* haploiden induction bei mais. *Vortr. Pflanzenzüchtung* 38: 203–204.
- El-Rouby MM, El-Sheikh MH and Awad Allah SM (2017) Increasing the efficiency of recurrent selection for yield in maize. *Alexandria Science Exchange Journal* 38 (2): 193–202.
- Fiévet JB, Nidelet T, Dillmann C, de Vienne D (2018) Heterosis is a systemic property emerging from non-linear genotype-phenotype relationships: evidence from *in vitro* genetics and computer simulations. *Front. Genet.* 9: 159. DOI: 10.3389/fgene.2018.00159
- Hu H, Schrag T, Peis R et al. (2016) The genetic basis of haploid induction in maize identified with a novel genome-wide association method. *Genetics* 202: 1267–1276. DOI: 10.1534/genetics.115.184234
- Jenweerawat S, Aekatasawan C Laosuwan P, Hallauer AR (2009) Interpopulation hybrid development in maize using modified reciprocal recurrent selection. *Thai Journal of Agricultural Science* 42 (3): 139–148.
- Kaeppler S (2012) Heterosis: many genes, many mechanisms – and the search for an undiscovered unifying theory. *ISRN Botany* 2012 (Article ID 682824): 1–12. DOI: 10.5402/2012/682824
- Lübberstedt T, Frei UK (2012) Application of doubled haploids for target gene fixation in backcross programs. *Plant Breed.* 131: 449–452. DOI: 10.1111/j.1439-0523.2011.01948.x
- Mather K, Jinks JL (1985) *Biometrical Genetics*. Moscow: Mir. 463 p. [in Russian] (Мазер К., Джинкс Дж. Биометрическая генетика. М.: Мир, 1985. 463 с.).
- Melchinger AE, Schipparck W, Würscum T et al. (2013) Rapid and accurate identification of *in-vivo* induced haploid seeds based on oil content in maize. *Sci. Rep.* 3: 1–5. DOI: 10.1038/srep02129
- Mikhailov ME (2010) A new possibility of dihaploid lines use: enriching-restoring breeding scheme. *Rus. J. Genet.* 46 (6): 758–764 [in Russian] (Михайлов М.Э. О новой возможности использования дигаплоидных линий: схема обогатительно-восстановительной селекции // Генетика. 2010. Т. 46, № 6. С. 853–860). DOI: 10.1134/S1022795410060177
- Mithila J, Hall JC (2007) Production of an auxinic herbicide-resistant microspore-derived doubled haploid wild mustard (*Sinapis arvensis* L.) plant. *Crop Prot.* 26 (3): 357–362. DOI: 10.1016/j.cropro.2005.07.017
- Murovec J, Bohanec B (2012) Haploids and doubled haploids in plant breeding. In: IY Abdurakhmonov (ed.). *Plant breeding*. Rijeka, Croatia: Intech. p. 87–106. DOI: 10.5772/29982. Available from: <https://www.intechopen.com/books/plant-breeding/haploids-and-doubled-haploids-in-plant-breeding>
- Nanda DK, Chase SS (1966) An embryo marker for detecting monohaploids of maize (*Zea mays* L.). *Crop Sci.* 6: 213–215.
- Odiyo O, Njoroge K, Chemining'wa G, Beyenec Y (2014) Performance and adaptability of doubled haploid maize testcross hybrids under drought stress and non-stress conditions. *International Research Journal of Agricultural Science and Soil Science* 4 (8): 150–158. DOI: 10.14303/irjas.2014.055
- Peng Z-B, Li MS., Liu X-Z, Li J-C (2007) Comparisons of three recurrent selection methods in the improvement of maize populations. *Agricultural Sciences in China* 6 (6): 657–664. DOI: 10.1016/S1671-2927(07)60097-2

КОК-САГЫЗ (*TARAXACUM KOK-SAGHYZ* RODIN): МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ КАУЧУКА И ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПОДХОДОВ

Кулуев Б. Р.¹, Минченков Н. Д.², Гумерова Г. Р.¹

¹Институт биохимии и генетики Уфимского Федерального исследовательского центра РАН,
450054, Россия, Уфа, пр. Октября, д. 71;
✉ kuluev@bk.ru

²Гимназия № 39, 450077, Россия, Уфа, ул. Достоевского, д. 67

Натуральный каучук является стратегическим природным сырьем, который широко применяется при производстве шин, военной техники, в медицине и в других отраслях. Около 90% добычи каучука высокого качества приходится на *Hevea brasiliensis* (Willd. ex A. Juss.) Müll. Arg. Однако этот природный источник каучука весьма уязвим к грибным заболеваниям. Синтетический каучук уступает по физико-химическим и механическим свойствам натуральному, в связи с чем существует необходимость в поиске альтернативных источников данного сырья. Наиболее перспективным альтернативным гевеем каучуконосом является одуванчик кок-сагыз (*Taraxacum kok-saghyz* Rodin). В его корнях накапливается каучук, не уступающий по качеству гевейному, содержание которого у высокопродуктивных линий достигает 27% к сухой массе корней. В связи с этим целью данной статьи является описание хозяйственно ценных компонентов *T. kok-saghyz*, некоторых методов выделения натурального каучука из корней этого растения, а также подходов по микроклональному размножению и генетической трансформации кок-сагыза и близких видов. В СССР в середине XX века в основе промышленного метода выделения каучука из кок-сагыза лежала предварительная обработка корней 2% раствором щелочи, которая может оказывать негативное влияние на качество каучука. Поэтому разработка новых, но в то же время недорогих промышленных методов выделения каучука из корней кок-сагыза весьма актуальна. Одновременно в некоторых странах мира ведется селекционная работа, направленная на увеличение как размеров корней кок-сагыза, так и содержания каучука в них. В связи с этим возникает необходимость в разработке лабораторных экспресс-методов выделения каучука. Нами был отработан и оптимизирован лабораторный метод выделения каучука из сухой растительной ткани при помощи воды и ацетона, с финальной экстракцией гексаном. Разработанный нами протокол экстракции каучука показал результаты, сопоставимые с литературными данными. Для выведения более продуктивных форм проводятся также эксперименты по микроклональному размножению и генетической трансформации кок-сагыза, однако число таких работ пока небольшое, что, видимо, связано с низкими регенерационными способностями данного вида одуванчиков.

Ключевые слова: натуральный каучук, *Taraxacum kok-saghyz*, инулин, экстракция каучука, микроклональное размножение, волосовидные корни, трансгенные растения.

Прозрачность финансовой деятельности / The transparency of the financial activities Авторы не имеют финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах.

Авторы благодарят рецензентов за их вклад в экспертную оценку этой работы / The authors thank the reviewers for their contribution to the peer review of this work

Дополнительная информация / Additional information Полные данные этой статьи доступны / Extended data is available for this paper at <https://doi.org/10.30901/2658-6266-2019-2-33-43>

Мнение журнала нейтрально к изложенным материалам, авторам и их месту работы / The journal's opinion is neutral to the presented materials, the author, and his or her employer

Все авторы одобрили рукопись / All authors approved the manuscript

Конфликт интересов отсутствует / No conflict of interest

RUSSIAN DANDELION (*TARAXACUM KOK-SAGHYZ* RODIN): RUBBER EXTRACTION METHODS AND PROSPECTS FOR BIOTECHNOLOGICAL METHODS APPLICATION

Kuluev B. R.¹, Minchenkov N. D.², Gumerova G. R.¹

¹Institute of Biochemistry and Genetics
of the Ufa Research Center of RAS,
71 Prospect Oktyabrya, Ufa 450054, Russia;
✉ kuluev@bk.ru

²Ufa Gymnasium No. 39, 67 Dostoevsky St., Ufa 450077, Russia

Natural rubber is a strategic natural raw material, which is used in the production of tires and military equipment, in medicine and other industries. An alternative to *Hevea brasiliensis* (Willd. ex A. Juss.) Müll. Arg. and the most promising rubber plant is the Russian dandelion (*Taraxacum kok-saghyz* Rodin). The rubber that accumulates in the roots of this dandelion is not inferior in quality to the natural rubber from *H. brasiliensis*, and its content reaches 27% of the dry weight of roots. The purpose of this paper is to describe the economically important components of *T. kok-saghyz* roots, the main methods for extracting natural rubber from the roots, as well as the approaches to micropropagation and genetic transformation of *kok-saghyz* and related species. In the middle of the 20th century, the industrial method of isolating rubber from Russian dandelion in the USSR was based on preliminary treatment of the roots with a 2% solution of alkali, which could negatively affect rubber quality. Therefore, it is important to develop new, rapid, but at the same time, inexpensive methods of rubber extraction from *T. kok-saghyz*. Some of them are considered in this paper. The breeding of Russian dandelion should be aimed at both increasing the root size and the content of rubber. In this regard, the development of laboratory express methods for rubber extraction is also important. The authors have developed and optimized a method for extracting rubber from dry plant tissue using polar solvents (water and acetone), with the final extraction with a non-polar solvent (hexane). The developed rubber extraction protocol showed results comparable to the literature data. In order to create more productive plant forms, experiments are also being conducted on *T. kok-saghyz* micropropagation and genetic transformation. However, the number of such works is still very small, probably due to the low regenerative abilities of this dandelion species.

Keywords: natural rubber, *Taraxacum kok-saghyz*, inulin, rubber extraction, micropropagation, hairy roots, transgenic plants.

Для цитирования: Кулуев Б. Р., Минченков Н. Д., Гумерова Г. Р. Кок-сагыз (*Taraxacum kok-saghyz* Rodin): методы выделения каучука и перспективы использования биотехнологических подходов. *Биотехнология и селекция растений*. 2019;2(2):33-43. DOI: 10.30901/2658-6266-2019-2-33-43

For citation: Kuluev B. R., Minchenkov N. D., Gumerova G. R. Russian dandelion (*Taraxacum kok-saghyz* Rodin): rubber extraction methods and prospects for biotechnological methods application. *Plant Biotechnology and Breeding*. 2019;2(2):33-43. (In Russ.) DOI: 10.30901/2658-6266-2019-2-33-43

ORCID:

Гумерова Г. Р. orcid.org/0000-0003-2789-174X

Кулуев Б. Р. orcid.org/0000-0002-1564-164X

УДК 58.08:633.91

Поступила в редакцию: 07.02.2019

Принята к публикации: 11.06.2019

Введение

Натуральный каучук на сегодняшний день является незаменимым сырьем, прежде всего для шинной промышленности, где его доля в составе смеси для легковой покрышки составляет 15–20%, а для грузовой доходит до 85% (Chaldaeva, Khusainov, 2013). Достоинство натурального каучука в отличие от синтетического – его высокая износостойкость и способность выдерживать серьезные вертикальные нагрузки, что особенно важно для авиационных шин, которые делают исключительно из натуральной резины. Натуральный каучук также широко применяется в военной промышленности, медицине и многих других отраслях, поэтому в мире наблюдается постоянное увеличение спроса на данный вид природного сырья (Korzinov, 2008).

Основным источником натурального каучука в мире является гевея бразильская *Hevea brasiliensis* (Willd. ex A. Juss.) Müll. Arg., которая выращивается плантационным способом преимущественно в странах Юго-Восточной Азии (Kuluev et al., 2015). Российская империя начиная с XIX века, а затем и СССР полностью зависели от зарубежных поставщиков гевейного каучука. Но в 1931 году перед советскими учеными была поставлена задача провести поиск растений-каучуконосов на всей территории страны. В СССР в течение всего двух лет (1931–1932 гг.) на каучуконость было исследовано 1048 видов растений из 316 родов, входящих в 95 семейств (Lapin, 1936). Среди этих растений свыше 50 показали довольно высокое содержание каучука. Наибольший показатель наблюдался у кок-сагыза (*Taraxacum kok-saghyz* Rodin), крым-сагыза (*T. hybernum* Steven) и тау-сагыза (*Scorzonera tau-saghyz* Lipsch. et Bosse) из семейства Asteraceae (Астровые). Из этих трех растений в СССР широко возделывался в промышленных масштабах только кок-сагыз. Первые исследования не показали существенной разницы между накоплением каучука у кок-сагыза и крым-сагыза, однако следует учесть, что кок-сагыз накапливал то же самое количество сырья за один вегетационный цикл, а крым-сагыз за два (Ignatiev, 1939). К тому же, крым-сагыз оказался более требователен к климату, чем кок-сагыз, так как может расти как многолетнее растение исключительно в средиземноморской зоне (Philippov et al., 1948; Polovenko et al., 1950).

Начиная с 2010-х годов в мире наблюдается новая волна интереса к кок-сагызу, особенно в США и Европе (Schmidt et al., 2010; Collins-Silva et al., 2012). Это связано как с потенциальной уязвимостью плантаций гевеи в Юго-Восточной Азии, прежде всего к грибным заболеваниям, так и привлекательной возможностью производства натурального каучука на больших территориях с умеренным климатом, что весьма актуально в условиях постоянного роста спроса на данный вид сырья (Garshin et al., 2016; Kuluev et al., 2017). Несмотря на большие

усилия по доместикации кок-сагыза (Luo et al., 2018), эти работы еще далеки от завершения. Потенциал по увеличению урожайности и улучшению качества каучука кок-сагыза пока еще не реализован. В связи с этим возрастает актуальность выбора методов выделения каучука и изучения его основных физико-химических свойств. Эти методы нужны для отбора наиболее продуктивных линий кок-сагыза, получаемых при использовании традиционных методов селекции, химического и радиационного мутагенеза, генетической трансформации и геномного редактирования (Iaffaldano et al., 2016). Целью данной статьи является описание хозяйственно ценных компонентов корней *T. kok-saghyz*, некоторых методов выделения каучука из этого растения, как в лабораторных условиях, так и в промышленных масштабах, а также подходов по микрোকлональному размножению и генетической трансформации кок-сагыза и близких видов. Также здесь приводится краткое описание разработанного нами протокола выделения каучука из корней кок-сагыза при помощи гексана.

Хозяйственно ценные компоненты корней кок-сагыза

В корнях кок-сагыза накапливается высококачественный каучук, причем содержание его по отношению к сухой массе корней по данным разных источников варьирует в довольно широких диапазонах: 12–15% (Polovenko et al., 1950), 2,98–27,89% (Keller, 1936), 6–24% (Kobelev, 1937), 10–27% (Pavlov, 1942). В 1940-е годы были также получены тетраплоидные формы кок-сагыза (Navashin, Gerasimova, 1941; Warmke, 1945; Navashin, Gerasimova-Navashina, 1951), однако они характеризовались в основном увеличенным размером корней и семян, тогда как по содержанию каучука высокие значения не были зафиксированы. В одной из недавних работ сообщается, что в однолетнем корне кок-сагыза (в сухом состоянии) содержится до 7,6% каучука (хлороформенный экстракт), до 35,9% водорастворимых углеводов (главным образом инулина), 25% смолы (ацетоновый экстракт) и около 54% некаучуковых компонентов (лигнин, белки, клетчатка и пр.) (Khairullin et al., 2014). Основным показателем высокого качества каучука является его молекулярная масса. Лучший растительный каучук с молекулярной массой около 1,3 млн г/моль получают из гевеи (Swanson et al., 1979). Такая же высокая молекулярная масса каучука (более 1 млн г/моль) характерна лишь для нескольких каучуконосных растений (Collins-Silva et al., 2012; Bushman et al., 2006), среди которых именно кок-сагыз занимает особое место, так как его каучук характеризуется высокой износостойкостью и это растение можно культивировать в условиях умеренного пояса.

Вторым по хозяйственной ценности компонентом кор-

ней кок-сагыза считается инулин. Это вещество является основной составляющей водного экстракта корней кок-сагыза, который можно отделить на первых стадиях выделения каучука. Инулин не переваривается в желудочно-кишечном тракте человека и относится к группе пищевых волокон, в связи с этим применяется в медицине в качестве пребиотика (Ladnova, Merkulova, 2008). Также инулин служит исходным материалом для промышленного получения фруктозы и этилового спирта. Для получения фруктозы инулин обрабатывается кислотами, а фруктоза, в свою очередь, при сбраживании дрожжами дает этиловый спирт, способ получения которого из корней кок-сагыза описывается в статье П. К. Бобкова (Bobkov, 1939). Этот метод основан на выделении инулина из разрезанных корней путем экстракции на диффузионной батарее (водная экстракция). Полученный диффузионный сок смешивают с кислотой, вызывая осахаривание инулина до фруктозы, затем фруктозу сбраживают в этанол. В свою очередь этанол может быть использован для производства одного из видов синтетического каучука – бутадиенового с формулой $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}_2$. Первый этап – превращение этанола в бутадиен, второй – полимеризация бутадиена. Таким образом, корни кок-сагыза могут быть использованы не только для продуцирования натурального каучука, но и для получения искусственного каучука (рис. 1). После отделения инулина и каучука все растительные остатки от корней кок-сагыза можно использовать для изготовления кормовых добавок. Возможность одновременного получения из корней кок-сагыза каучука, инулина и кормовых добавок способствует повышению рентабельности промышленного выращивания данной культуры и переработки растительного материала. Однако ввиду того, что такие технологии обработки корней кок-сагыза до сих пор не реализованы, производство натурального каучука из одуванчиков как в России, так и в мире до сих пор считается менее рентабельным, чем выработка каучука из гевеи в тропических странах.

Технологии экстракции каучука из кок-сагыза для промышленности

Каучук в корнях кок-сагыза находится как в жидком некоагулированном состоянии в виде латекса, так и в твердом коагулированном состоянии в виде нитей (Keller, 1936, Koyalovich, 1939). Существуют методы получения каучука как путем его извлечения из латекса, так и путем непосредственного выделения из растительной ткани. Непосредственное выделение каучука из растительной ткани может быть проведено с помощью обработки органическими растворителями или разрушением клетчатки реактивами и последующей агломерацией каучука. Существуют также механические методы выделе-

ния каучука (Keller, 1936). В кок-сагызе основная часть каучука содержится в млечниках, пронизывающих ткани корня. Стенки клеток млечников состоят в основном из целлюлозы, гемицеллюлозы (связующие гликаны) и лигнина. При обработке корней кок-сагыза водой в диффузионной батарее из них выделяется большинство водорастворимых веществ, в первую очередь, инулин. Процесс выделения каучука в таком случае выглядит так: клетчатка и все остальные вещества, которые нужно отделить, растворяются, и каучук освобождается от примесей. На советских предприятиях для разрушения тканей растений чаще всего использовали гидроксид натрия (рис. 1). Гемицеллюлозы под воздействием щелочи гидролизуются до молочной, муравьиной и сахарной кислот. Лигнины растворяются в щелочи в виде натриевых соединений. При воздействии образующихся в ходе выделения кислот целлюлоза гидролизуетсся до глюкозы, гемицеллюлозы – до сахара. Однако полного растворения кислотами и щелочами ненужных частей корня добиться невозможно. Но в целом такого разрушения тканей корня вполне было достаточно, чтобы отделить нити каучука. Поэтому вышеописанный метод был принят за основу в отечественном производстве. В то же время, по некоторым данным (Bobkov, 1939), щелочь все же отрицательно влияла на качество каучука и поэтому были предложены и другие подходы для обработки растительного материала.

К примеру, существуют еще методы отделения каучука, основанные на механическом разрушении тканей корня при помощи измельчителей и на микробиологическом разрушении (сбраживании) (Bobkov, 1939). При микробиологическом способе для обогащения сырья вводятся специальные микроорганизмы, разрушающие углеводы. В таком случае выделение инулина должно предшествовать экстракции каучука. В целом же были сделаны выводы о малоэффективности данного метода ввиду его длительности, примитивности существовавшей в то время технологии, а также того, что полученный каучук приобретал специфический неприятный запах, который невозможно было устранить даже в процессе дальнейшей обработки (Kogan, 1939).

В результате использования описанных выше методов экстракции после разрушения растительной ткани получается так называемая пульпа, содержащая каучук. Так, в пульпе содержалось углеводорода каучука (в % к сухим веществам) при щелочной подготовке – 8,9%, механическом измельчении – от 12 до 15%, микробиологической подготовке (сбраживании) – от 20 до 30% (Bobkov, 1939). Пульпа состоит из воды (96–97%), смол и каучука (до 1%), сухих веществ (2–3%). Каучук и смолы в пульпе содержатся в виде глобул. Удельный вес частиц каучука несколько меньше веса остатков ткани. Однако разница удельных весов настолько мала, что каучук вместе с другими частицами всплывает на поверхность. Для отделения каучука от частиц ткани корня пульпу центрифугируют (см. рис. 1), и она разделяется на три слоя: на стен-

ках барабана осаждаются частицы тканей корня, затем идет слой воды и на ее поверхности скапливается каучук. Каучук отделяют от остатков тканей и сушат в термостате и на вальцах.

Таким образом, исходя из приведенной выше информации, можно сформулировать общий алгоритм экстракции каучука из корней кок-сагыза, применявшийся в промышленности до середины XX века в СССР (см. рис. 1):

- 1) Промывка корней.
- 2) Нарезка корней.
- 3) Отделение латекса, в котором содержится до 30% некоагулированного каучука. Пропуск данного этапа выделения приводил к большим потерям каучука при экстракции. Методики отделения латекса в промышленности СССР были основаны на разрезании корня на тонкие пластинки и естественном стекании латекса с периодическим встряхиванием. «Большая энциклопедия нефти и газа» (<http://ngpedia.ru/>) предлагает использовать следующий метод более эффективного выделения латекса из кок-сагыза. Чисто отмытые свежие корни кок-сагыза режут поперек на куски тол-

щиной 1 см. Эти куски помещают в мешалку, наполненную так называемой приемочной жидкостью, являющейся 1%-ным водным раствором аммиака NH_3 с небольшим количеством защитных веществ – декстрина, казеина, агара, альбумина или экстракта мыльного корня. Под действием естественного тургора латекс выделяется из нарезки в раствор. Но это выделение является неполным, так что приемочную жидкость несколько раз меняют, чтобы добиться полного извлечения латекса. Этот раствор, ввиду малой концентрации растворенных веществ, неудобен для дальнейшего выделения из него каучука, поэтому он подвергается концентрированию в молочном сепараторе. Полученный концентрат содержит 40% сухого вещества.

4) Четвертый этап заключается в отделении водорастворимых веществ, среди которых особое место занимает инулин (см. рис. 1).

5) Разрушение тканей корня щелочью.

6) Центрифугирование и отделение каучука.

7) Сушка каучука на вальцах или в термостате.

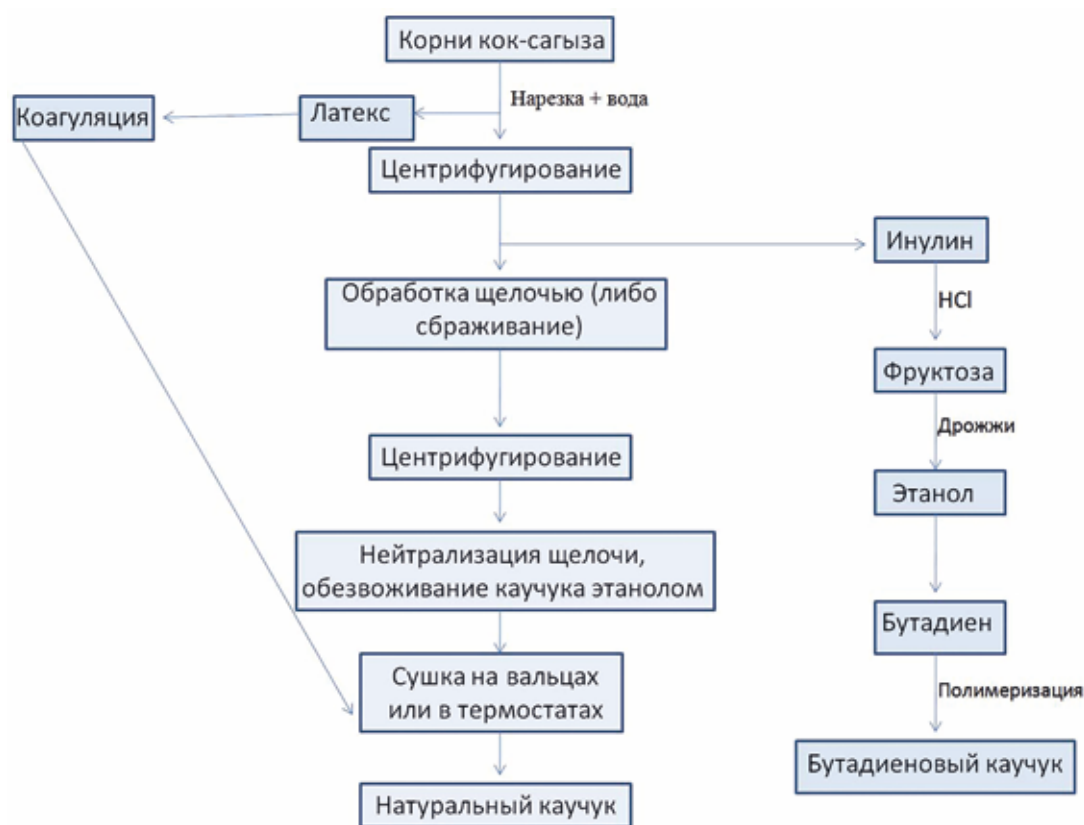


Рис. 1. Общая схема получения из корней кок-сагыза натурального каучука, инулина, фруктозы, этилового спирта и бутадиенового каучука в промышленных масштабах

Fig. 1. General diagram of natural rubber, inulin, fructose, ethyl alcohol and butadiene rubber industrial production from *kok-saghyz* roots

Из-за неблагоприятного влияния щелочи на свойства получаемого каучука, еще в 30-е годы XX века велись исследования по разработке методов экстракции каучука полярными и неполярными растворителями (Tverskaya, Iossa, 1938). Различные органические растворители начали применять для экстракции каучука еще в XIX веке. К примеру, в качестве экстрагентов каучука использовали бензин, сероуглерод, толуол (Keller et al., 1936). При этом предлагалась предварительная обработка исходного сырья соляной кислотой, аммиачным раствором окиси меди и хлористым цинком для лучшего растворения клетчатки. В недавнем исследовании (Rzymiski, 2014) для выделения каучука из кустарника гваюлы (*Parthenium argenteum* L.) использовали ацетон (полярный растворитель), в котором каучук не растворяется, ацетонитрил (среднеполярный растворитель) и циклогексан (неполярный растворитель), в которых каучук растворяется. Похожий подход был использован также для выделения каучука из молочая *Euphorbia characias* L. (Spano et al., 2012). Учитывая общую схожесть химических составов клеток растений, можно предположить, что эти методы подойдут и для кок-сагыза, к тому же в гваюле каучук, как и часть каучука в кок-сагызе, накапливается в паренхиме. В цитируемом исследовании (Rzymiski, 2014) также описаны интересные способы сушки растительной ткани, что необходимо для перевода всего каучука в коагулированное состояние. В начале предлагается проведение лиофилизации при температуре -80°C , затем последовательная сушка в печи при температуре 60°C и при комнатной температуре. D. Ramirez-Cadavid et al. (2017) предлагают разрезать корни кок-сагыза на небольшие куски (2 см) и сушить их в течение 4–7 дней в воздушной печи при температуре 50°C . Благодаря такому способу высушивания, из 752 кг свежих корней получалось 188 кг сухих.

Стоит отметить, что работа с сушеными и со свежими корнями имеет как свои достоинства, так и недостатки. Работая с сухими корнями, можно миновать этап выделения латекса, так как весь каучук в данном случае находится в коагулированном состоянии, что позволяет экономить реактивы и ускорить технологический процесс. С другой стороны, на сушку корней уходит довольно много времени и энергии для работы воздушных печей или термостатов. К тому же повышение температуры может неблагоприятно влиять на свойства каучука.

Процесс выделения каучука из сухих корней идет в два этапа. В первом пробу ткани смешивают с ацетоном (полярный растворитель) и центрифугируют, во втором – с циклогексаном (неполярный растворитель). Центрифугирование после обработки ацетоном длится пять минут, при этом каучук в ацетоне не растворяется. Исследования проводились при температуре от 24 до 100°C . Экспериментальные исследования W. Rzymiski (2014) также показали, что ацетон должен быть комнатной температуры, а циклогексан нагрет до температуры 100°C . Кроме

того, было установлено, что обработка тканей растений кипящей водой вызывает деградацию каучука, что является еще одним доказательством того, что классический щелочной метод экстракции каучука требует альтернативы. Показано, что для более полного разрушения тканей и растворения некаучуковых компонентов один и тот же растительный материал следует обрабатывать ацетоном трижды (Ramirez-Cadavid et al. 2017).

Еще один способ получения пульпы (блендерный) описан в исследовании (Buranov, Elmuradov, 2010) и заключается в следующем. В течение двух дней после сборки урожая корни кок-сагыза разрезают на части массой примерно 0,5 г. Куски корней помещали в блендер, содержащий 90 мл холодного водного экстракционного буфера ($0,1\%$ Na_2SO_3 и $0,2\%$ NH_3) и измельчали в течение 30 секунд. Затем суспензию фильтровали через сетку диаметром 1 мм. Оставшиеся на сетке частицы вновь измельчали в таком же растворе и фильтровали. Полученный гомогенат центрифугировали и осадение частиц происходило так же, как описано в исследовании П. К. Бобкова (Bobkov, 1939).

Как говорилось выше, в кок-сагызе до 30% всего каучука содержится в виде латекса (Koyalovich, 1939), и он может теряться в процессе рассмотренного метода выделения при использовании сырых корней. Самый простой метод получения каучука из латекса практикуется при выращивании гевеи и заключается в следующем: собранный латекс заливают в неглубокий поддон и отстаивают в течение одной недели. В результате отстаивания латекс превращается в плотную массу, которую потом пропускают через пресс, чтобы отжать воду. Полученные листы каучука сушат несколько часов в тени, в процессе чего каучук окисляется и коричневеет.

В настоящее время наибольшее распространение получил способ выделения каучука из латекса на лентоотливочной машине, похожей на установку, которую используют при производстве бумаги. В этом процессе латекс с антиокислителями и коагулянтами (CaCl_2 , CH_3COOH и др.) проходит через короткую трубу диаметром 2,5 см при температуре 40°C , в которой и происходит коагуляция. После этого смесь поступает на крутящуюся стальную ленту с множеством мелких отверстий (примерно 400 на 1 см^2). Жидкие вещества просачиваются через них, а каучук остается на ленте.

Специально для кок-сагыза был разработан метод радиокоагуляции латекса (Sandomirskij, 1938). Этот метод основан на том, что при воздействии на латекс высокочастотным электрическим полем, он начинает нагреваться и частицы каучука переходят в быстрые колебательные движения, в результате чего происходит коагуляция. Основным достоинством этого способа является то, что он достаточно экономичен и не требует использования химикатов, вредных как для структуры глобул каучука, так и для работников производства.

Лабораторные методы определения содержания каучука в корнях кок-сагыза

Современная селекция каучуконосов направлена, в том числе, на повышение содержания в них каучука. Чтобы определить среднюю урожайность растений, нужно взять множество препаратов тканей с разных экземпляров и исследовать их в короткий срок. В 1935 году сотрудником Устиновской НИС П. А. Столбиным был предложен экспресс-метод количественного определения каучука (Koyalovich, 1939). Суть этого метода состоит в обработке сырых отрезков корней весом в 1,2 грамма в 3-процентном растворе щелочи, растиранием отрезков на стекле, обработке в течение четырех часов концентрированной H_2SO_4 , нейтрализации кислоты 3% раствором щелочи в течение ночи, промывке, сушке пленок в термостате при температуре $70^\circ C$ и взвешивании. Во всех случаях проверки этого метода были получены сильно заниженные результаты. Во-первых, это происходило вследствие того, что автор работал с сырыми отрезками корней, не учитывая потерю каучука в виде латекса. Во-вторых, H_2SO_4 , используемая для разрушения клетчатки, плохо влияет на каучук, окисляя его. В результате этого до 93,5% каучука переводится в хрупкий порошок, состоящий из двух частей – растворимой и нерастворимой в ацетоне. Растворимая часть имеет состав $C_{20}H_{30}O$, а нерастворимая – $C_{10}H_{16}$ (Koyalovich, 1939).

Все корни кок-сагыза могут быть разделены на три группы – с одним стержневым корнем, со стержневыми и боковыми корнями и с мочковатой корневой системой. Известно, что разные части корня содержат неодинаковое

количество каучука, поэтому, чтобы получить наиболее точные результаты нужно исследовать такой участок корня, где содержание каучука наиболее приближено к общему проценту. Поэтому были разработаны методы взятия средней пробы, которые сводятся к следующему (Koyalovich, 1939):

1) В случае использования корневой системы с выраженным стержневым корнем он делится на три части и берется средняя.

2) У растений с мочковатой корневой системой берутся 3-4 корешка, также делятся на три части, и исследуется средняя.

3) Конечный результат представляет собой среднее арифметическое из всех проанализированных проб.

Выбор средней части объясняется тем, что участки из корневой шейки содержат наименьший процент каучука, нижние – наибольший. Кроме того, в боковых корешках процент каучука всегда выше (Koyalovich, 1939). Взятые изложенным выше способом средние отрезки подвергаются сушке в термостате при температуре $50^\circ C$. Сушка является обязательной, так как, во-первых, вызывает полную коагуляцию каучука, оставшегося в виде латекса, а, во-вторых, позволяет хранить пробы неопределенно долгое время. Процесс извлечения каучука из высушенных проб состоит из стадий обработки 3% щелочью, прогрева в кипящей водяной бане, нейтрализации на часовом стекле соляной кислотой, обезвоживания при помощи 96% этилового спирта и сушки в термостате при $50^\circ C$. Количество каучука в заданном объеме можно также определять в ацетонитриловом растворе посредством метода измерения поглощения УФ-лучей (Rzymiski, 2014).

Исходя из литературных данных следует, что наибо-



Рис. 2. Выращивание кок-сагыза на опытном участке ИБГ УФИЦ РАН: а – розетка листьев кок-сагыза; б – общий вид растения; в – корни кок-сагыза.

Fig. 2. *Kok-saghyz* grown at an experimental plot of IBG UFRC RAS: a – rosette of leaves; b – general view of the plant; c – *kok-saghyz* roots.

лее подходящими лабораторными методами выделения каучука являются технологии последовательного применения различных растворителей. Нами, к примеру, был отработан метод гексановой экстракции каучука из корней одуванчиков в лабораторных условиях. В течение двух лет мы выращиваем кок-сагыз в опытном участке Института биохимии и генетики Уфимского Федерального исследовательского центра РАН (ИБГ УФИЦ РАН) (рис. 2а, б). Наши исследования проводятся с целью доместикации кок-сагыза, увеличения размеров корней и повышения содержания каучука в них методами классической селекции. В этой связи нами была поставлена задача разработать протокол для лабораторного выделения каучука из корней этого растения.

Для процедуры выделения каучука осенью у растений кок-сагыза откапывали корни (рис. 2в) и высушивали их при комнатной температуре в течение трех недель, размельчали ножницами, замораживали в фарфоровой ступке с пестиком при температуре -80°C . Далее корни растирали до порошкообразного состояния и переносили в пробирки эппендорф (1,5 мл), затем взвешивали сухую массу порошка корней. В растительный порошок добавляли 1 мл дистиллированной воды, перемешивали образцы в течение 30 минут, центрифугировали при 12 тыс. об./мин в течение 20 мин., надосадочную жидкость удаляли. Процедуру водной экстракции проводили дважды для более полного удаления водорастворимых компонентов. Затем в образцы добавляли по 1 мл ацетона и перемешивали их в течение 3 часов (на встряхивателе «Ротамикс»), центрифугировали при 12 тыс. об./мин, в течение 20 мин, надосадочную жидкость удаляли. Таким образом, из растительного порошка убирали водный и ацетоновый экстракты, а каучук благодаря его переходу при сушке в коагулированное состояние и нерастворимость в полярных растворителях преимущественно продолжал оставаться в этих образцах. Последующую экстракцию каучука проводили при помощи гексана, который добавляли в количестве 1 мл, образцы перемешивали 16 часов (на встряхивателе «Ротамикс»). Затем образцы центрифугировали при 12 тыс. об./мин, в течение 20 мин, надосадочную жидкость переносили в новые заранее взвешенные микропробирки объемом 1,5 мл. Гексановый экстракт высушивали в термостате при $+50^{\circ}\text{C}$ в течение 2,5 часов в вытяжном шкафу. Определяли массу высушенного экстракта. Результаты выражали в виде процента гексанового экстракта к сухой массе растительного материала. При этом надо учитывать, что в гексановом экстракте содержание каучука составляет в среднем 80% (Keller, 1936), то есть окончательный продукт обычно содержит примеси. Также надо иметь в виду, что отработанный нами метод не подходит для работы с сырыми корнями, так как при этом некоагулированный каучук будет теряться вместе с латексом.

Нами было показано, что однолетние растения кок-сагыза, выращенные на опытном участке ИБГ УФИЦ РАН,

накапливают в корнях в среднем 5% каучука (гексановый экстракт) на сухую массу корней. В целом в рамках всего эксперимента содержание каучука в разных корнях варьировало от 3,4 до 10,5%. Согласно литературным данным, содержание каучука на сухую массу корней в однолетней культуре кок-сагыза варьирует от 2,7 до 11,5% (Filipov et al., 1948). Исходя из этого, мы заключили, что используемый нами протокол выделения каучука из корней кок-сагыза дает результаты, довольно близкие с описанными в литературе.

В дальнейшем, используя вышеописанный метод, мы выделили каучук из 15-ти крупных корней кок-сагыза и получили шар диаметром 1,7 см (рис. 3) который по всем внешним признакам проявлял качества натурального каучука: эластичность, пластичность, прыгучесть, нерастворимость в воде и этаноле. Модификации предложенного нами метода должны быть направлены на уменьшение количества примесей в выделяемом каучуке, что может быть осуществлено дополнительными стадиями очистки при помощи этилового спирта, ацетона и других полярных растворителей. Таким образом, представленный нами гексановый метод микровыделения каучука в будущем (при дальнейших улучшениях) может быть предложен для лабораторных исследований каучуконосных растений, однако вряд ли подойдет для промышленности ввиду относительной дороговизны используемых реактивов.



Рис. 3. Шар из гексанового экстракта, полученный из 15-ти корней кок-сагыза. Масштаб: 1 см

Fig. 3. Ball of hexane extracted from 15 roots of *T. kok-saghyz*. Scale: 1 cm

Культивирование *in vitro* и генетическая трансформации растений рода *Taraxacum* L.

Для успешной доместикации и выведения культурных сортов кок-сагыза кроме методов экспресс-анализа содержания каучука также существует необходимость в разработке методов микрклонального размножения и генетической трансформации данного вида растений. Культивирование изолированных тканей и органов на искусственных питательных средах в регулируемых асептических условиях является важным этапом в биотехнологии каучуконосных растений, поскольку открывает новые возможности для их прикладных и фундаментальных исследований. *In vitro* системы растений являются удобными модельными объектами для изучения сложных механизмов, лежащих в основе клеточной дифференциации, органогенеза, соматического эмбриогенеза и т. д. Возможность получения целых растений (регенерантов) из трансформированной культуры клеток или тканей является ключевым этапом в современной генной инженерии и биотехнологии растений. В этой связи, способам легко воспроизводимого *in vitro* культивирования целевых растений уделяется особое внимание. Однако по отношению к представителям рода *Taraxacum* в литературе имеются весьма немногочисленные данные по культивированию изолированных тканей.

В первых работах по индукции каллусогенеза использовали изолированные корневые экспланты *T. officinale* F. H. Wigg. (Bowes, 1970, 1971; Booth, Satchuthanantavale, 1974), на которых изучали влияние различных фитогормонов на эффективность каллусогенеза и органогенеза (листьев и корней). В большинстве случаев из таких каллусов регенерировали тератоматозные побеги, поэтому дальнейшие исследования были направлены именно на получение здоровых побегов. В связи с ограниченностью природного растительного сырья, в первую очередь, для биотехнологических целей необходима разработка эффективного способа *in vitro* микроразмножения. Так, с использованием оптимального соотношения ауксинов и цитокининов были получены регенеранты *T. mongolicum* Hand.-Mazz из корневой культуры (Song et al., 1999) и листовых эксплантов (Grout., 2010), *T. platycarpum* Dahlst также из корневой культуры (Lee et al., 2004) и листовых эксплантов (Bae et al., 2005), *T. officinale* из каллусной ткани (Jamshieed et al., 2010) и из листовых и черешковых эксплантов (Кныазев et al., 2007). Недавно было проведено разностороннее изучение регенерационной способности разных типов эксплантов (листьев, черешков и корней), полученных из *in vivo* и *in vitro* растений *T. officinale* в результате воздействия различных комбинаций фитогормонов (Rawat et al., 2018). Результаты этого исследования показали, что черешки из *in vitro* растений являются наиболее пригодными для прямого органогенеза, в то время как для

непрямого более предпочтительными являются корневые экспланты. Сообщается также о том, что и для кок-сагыза ведутся работы по разработке методов микрклонального размножения (Gavrilova et al., 2015), однако авторы не сообщают, какие для этого были использованы питательные среды и концентрации фитогормонов. По нашим собственным неопубликованным данным, кок-сагыз гораздо менее отзывчив к стимуляции микрклонального размножения в отличие от *T. officinale*, *T. brevicorniculatum* Korol. и *T. hybernum*.

Получение и дальнейшее культивирование трансгенных волосовидных (бородатых) корней (hairy roots), индуцированных в результате заражения *Agrobacterium rhizogenes*, является особой перспективной технологией для масштабного биотехнологического производства корневых метаболитов. Такой большой интерес обусловлен появлением у трансформированной корневой культуры способности к неограниченному изолированному росту на безгормональной среде и сверхпродукции корневых метаболитов. В случае с кок-сагызом, это в первую очередь каучук и инулин. В первых работах по индукции волосовидных корней растений рода *Taraxacum* использовали различные типы эксплантов *T. platycarpum*, которые инфицировали штаммом 15834 *A. rhizogenes* (Lee et al., 2004). Выяснилось, что эффективность трансформации была наиболее высокой при использовании корневых эксплантов по сравнению со стеблевыми или семядольными листьями. Также было показано, что такие трансформированные корни активно регенерировали в здоровые побеги в три раза лучше, чем интактные корни (Lee et al., 2004). В другом исследовании (Mahesh, Jeyachandran, 2011) для получения волосовидных корней *T. officinale* помимо штамма 15834, использовали штамм A4, инфицирование листовых эксплантов которым оказалось более эффективным. Более того, количественный анализ показал, что эти корни оказались сверхпродукентами сесквитерпеновых лактонов по сравнению с корнями дикого типа. Ранее с успехом осуществлено редактирование генома кок-сагыза путем доставки с помощью *A. rhizogenes* CRISPR/Cas-компонентов в составе бинарного вектора для нокаутирования одного из генов биосинтеза инулина (Iaffaldano et al., 2016). В целях изучения возможности биотехнологического продуцирования натурального каучука были разработаны методы индукции волосовидных корней не только у *T. kok-saghyz*, но и у *T. hybernum* (Кныазев et al., 2017a; Кныазев et al., 2017b). В данных работах использовали различные типы эксплантов, которые инфицировали штаммами A4 и 15834 *A. rhizogenes* при разнообразных условиях инокуляции. Наибольшая эффективность трансформации обоими штаммами наблюдалась при укалывании иглой, содержащей суспензию из агробактерий в область подсемядольного колена (гипокотилей).

Параллельно с *A. rhizogenes*-опосредованной индукцией корневых культур ведутся работы по генетиче-

ской трансформации растений рода *Taraxacum* с помощью *A. tumefaciens* с целью получения их трансгенных форм. Так, Y. H. Song et al. (1999) и S. E. Yeo с K. S. Roh (2001) показали возможность агробактериальной трансформации *T. mongolicum*, используя в качестве эксплантов фрагменты листьев. *T. platycarpum* также был генетически трансформирован вышеописанным способом (Bae et al., 2005). В работе T. W. Bae et al. (2005) были получены растения *T. platycarpum*, в геном которых добавили ген 3-гидрокси-3-метилглутарил-КоА редуктазы. Продукт этого гена является ключевым ферментом в регуляции биосинтеза изопrenoидов, сверхэкспрессия которого приводит к увеличению накопления многих вторичных метаболитов. В данном случае листовые экспланты трансформировали с помощью штамма EHA105 *A. tumefaciens* (Bae et al., 2005). В работе А. В. Князева и А. В. Чемерис (Knyazev, Chemeris, 2012) показано, что *T. officinale* может быть трансформирован с использованием также штамма AGL0 *A. tumefaciens*. Для кок-сагыза известны лишь единичные работы в данном направлении, к примеру, ранее были созданы трансгенные растения кок-сагыза путем трансформации листовых дисков штаммом EHA105 *A. tumefaciens*, где для регенерации растений использовали 6-бензиламинопурин и индолилуксусную кислоту (Collins-Silva et al., 2012).

Заключение

Значительная часть резины в мире производится из искусственного каучука, получаемого полимеризацией различных углеводородов. Однако натуральный каучук остается незаменимым природным сырьем из-за ряда его уникальных свойств и спрос на него во всем мире продолжает расти (Dykman et al., 2011). Так как натуральный каучук превосходит по некоторым характеристикам искусственный, то его используют в местах с повышенной нагрузкой, особенно в военной отрасли. Немаловажно его значение в медицине. Каучук является основой для некоторых лекарствовосодержащих пластырей, из него и его производных делают имплантаты различных органов человека. Следовательно, натуральный каучук является очень ценным стратегическим сырьем для любого государства. Обеспечить нашу страну отечественным каучуком вполне возможно, выращивая растение кок-сагыз, дающее достаточное количество высококачественного сырья. Кроме того, это растение является довольно неприхотливым к климату и почве, в отличие от других каучуконосов юга России и Средней Азии, таких как крым-сагыз и тау-сагыз, требующих более теплого климата, приближенного к средиземноморскому и среднеазиатскому, соответственно. Благодаря этой особенности кок-сагыз можно выращивать в средней полосе России, в том числе и в Республике Башкортостан, которая была

одним из лидеров по производству кок-сагыза и натурального каучука в СССР. Более того, учитывая большую территорию нашей страны, производство и экспорт натурального каучука и инулина из кок-сагыза в будущем способно принести бюджету России немалый доход. Однако выведение высокопродуктивных линий и сортов кок-сагыза сдерживается недостаточной разработанностью методов количественного и качественного экспресс-анализа каучука, а также генетической трансформации данного вида растения.

Интерес к данной тематике вызван проводимыми исследованиями по теме государственного задания № AAAA-A19-119021190011-0.

References/Литература

- Bae TW, Park HR, Kwak YS, Lee HY, Ryu SB (2005) *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of a medicinal plant *Taraxacum platycarpum*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 80: 51–57.
- Bobkov PK (1939) Poluchenie kauchuka iz kornej kok-sagyz. *Kauchuk i rezina* 8: 67–70 [in Russian] (Бобков П.К. Получение каучука из корней кок-сагыза // Каучук и резина. 1939. № 8. С. 67–70).
- Bol'shaya entsiklopediya nefti i gaza. Available from: <https://www.ngpedia> [in Russian] (Большая энциклопедия нефти и газа. URL: <https://www.ngpedia>).
- Booth A, Satchuthanathavale R (1974) Regeneration in root cuttings in *Taraxacum officinale*. II. Effects of exogenous hormones on root segments and root callus cultures. *New Phytol.* 73: 453–460.
- Bowes BG (1970) Preliminary observations on organogenesis in *Taraxacum officinale* tissue cultures. *Protoplasma* 71 (1): 97–202.
- Bowes BG (1971) The occurrence of shoot teratomata in tissue cultures of *Taraxacum officinale*. *Planta* 100 (3): 272–276.
- Buranov AU, Elmuradov BJ (2010) Extraction and characterization of latex and natural rubber from rubber-bearing plants. *J. Agric. Food. Chem.* 58: 734–743. DOI: 10.1021/jf903096z
- Bushman BS, Scholte AA, Cornish K, Scott DJ, Brichta JL, Vederas JC, Ochoa O, Michelmore RW, Shintani DK, Knapp SJ (2006) Identification and comparison of natural rubber from two *Lactuca* species. *Phytochemistry* 67: 2590–2596. DOI: [org/10.1016/j.phytochem.2006.09.012](https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.09.012)
- Chaldaeva DA, Khusainov AD (2013) Primenenie naturalnogo i sinteticheskogo kauchuka v proizvodstve shin. *Vestnik Kazanskogo tekhnologicheskogo universiteta – Bulletin of Kazan Technological University* 16 (11): 195–198 [in Russian] (Чалдаева Д. А., Хусаинов А. Д. Применение натурального и синтетического каучука в производстве шин // Вестник Казанского технологического университета. 2013. Т. 16. № 11. С. 195–198).
- Collins-Silva J, Nural AT, Skaggs A, Scott D, Hathwaik U, Woolsey R, Schegg K, McMahan C, Whalen M, Cornish K, Shintani D (2012) Altered levels of the *Taraxacum kok-saghyz* (Russian dandelion) small rubber particle protein, TksRPP3, result in qualitative and quantitative changes in rubber metabolism. *Phytochemistry* 79: 46–56. DOI: [10.1016/j.phytochem.2012.04.015](https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2012.04.015)
- Dykman AS, Gil'manov HH, Fedorcova EV, Busygin VM, Moiseev II (2011) Perspektivnye vozmozhnosti mirovogo proizvodstva natural'nogo i izoprenovogo kauchukov. *Ekonomika i upravlenie* 10: 46–51 [in Russian] (Дыкман А. С., Гильманов Х.Х., Федорцова Е. В., Бусыгин В. М., Моисеев И.И. Перспективные возможности мирового производства натурального и изопренового каучуков // Экономика и управление. 2011. № 10. С. 46–51).
- Filippov DI, Nichiporovich AA, Aksel'rod DM (eds) (1948) Kul'tura kauchukonosov v SSSR. Moscow: OGIZ-Sel'hozgiz. p. 90–93.

- [in Russian] (Филиппов Д.И., Ничипорович А.А., Аксельрод Д.М. Культура каучуконосов в СССР. М.: ОГИЗ-Сельхозгиз, 1948. С. 90–93).
- Garshin MV, Kartuha AI, Kuleev BR (2016) Kok-sagyz: osobennosti kul'tivirovaniya, perspektivy vozdel'yvaniya i vnedreniya v sovremennoe proizvodstvo. *Biomika – Biomix* 8 (4): 323–333. [in Russian] (Гаршин М.В., Картуха А.И., Кулеев Б.Р. Кок-сагыз: особенности культивирования, перспективы возделывания и внедрения в современное производство // Биомика. 2016. Т. 8. № 4. С. 323–333).
- Gavrilova VA, Pendinen GI, Petrosyan IA, Kon'kova NG, Kutuzova SN, Vakhrusheva TYe, Sirotinkin NV, Brach NB, Dunayeva SYe, Zhuravlev YeV, Gavrilenko TA (2015) Mikroklonal'noye razmnzheniye kok-sagzya - istochnika natural'nogo kauchuka i lateksa. In: *Biotehnologiya: sostoyaniye i perspektivy razvitiya: materialy VIII Moskovskogo mezhdunarodnogo kongressa Pt 2, Moscow*, p. 26–28. [in Russian] (Гаврилова В.А., Пендинен Г.И., Петросян И.А., Конькова Н.Г., Кутузова С.Н., Вахрушева Т.Е., Сиrotинкин Н.В., Брач Н.Б., Дунаева С.Е., Журавлев Е.В., Гавриленко Т.А. Микроклональное размножение кок-сагыза – источника натурального каучука и латекса // Биотехнология: состояние и перспективы развития: материалы VIII Московского международного конгресса. М., 2015. Ч. 2. С. 26–28).
- Grout BWW (2010) Evaluation of total antioxidant production in seed and in vitro populations of *Taraxacum mongolicum* and *T. officinale*. *Acta Hort.* 925: 275–280. DOI: 10.17660/ActaHortic.2011.925.41
- Iaffaldano B, Zhang Y, Cornish K (2016) CRISPR/Cas9 genome editing of rubber producing dandelion *Taraxacum kok-saghyz* using *Agrobacterium rhizogenes* without selection. *Ind. Crops Prod.* 30: 356–362. DOI: 10.1016/j.indcrop.2016.05.029
- Ignatiev AM (1939) O kauchuke iz krym-sagzya. *Kauchuk i rezina* 6: 41–44 [in Russian] (Игнатиев А.М. О каучуке из крым-сагыза // Каучук и резина. 1939. № 6. С. 41–44).
- Jamshied S, Das S, Sharma MP, Srivastava PS (2010) Difference in in vitro response and esculin content in two populations of *Taraxacum officinale* Weber. *Physiology and Molecular Biology of Plants* 16 (4): 353–358.
- Keller AB (1936) *Kauchuk i kauchukonosy*. Moscow ; Leningrad: Izdatel'stvo Akademii nauk SSSR. 487 p. [in Russian] (Келлер А.Б. Каучук и каучуконосы. М. ; Л.: Издательство Академии наук СССР, 1936. 487 с.).
- Khajrullin RZ, Vlasova YuS, Yanov VV (2014) Perspektivy ispol'zovaniya al'ternativnykh vidov rastitel'nogo syr'ya dlya proizvodstva natural'nogo kauchuka. *Vestnik Kazanskogo tekhnologicheskogo universiteta* 17 (13): 205–206 [in Russian] (Хайруллин Р.З., Власова Ю.С., Янов В.В. Перспективы использования альтернативных видов растительного сырья для производства натурального каучука // Вестник Казанского технологического университета. 2014. Т. 17. № 13. С. 205–206).
- Knyazev AV, Chemeris AV, Vahitov VA (2007) Kallusoobrazovanie i morfogenez u *Taraxacum officinale* Weber v kul'ture in vitro. *Vestnik biotekhnologii i fiziko-himicheskoy biologii im. Y.A. Ovchinnikova* 3 (3): 5–9 [in Russian] (Князев А.В., Чемерис А.В., Вахитов В.А. Каллусообразование и морфогенез у *Taraxacum officinale* Weber в культуре in vitro // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. 2007. Т. 3. № 3. С. 5–9).
- Knyazev AV, Chemeris AV (2012) Oposredovannaya *Agrobacterium tumefaciens* transformatsiya oduvanchika *Taraxacum officinale* Weber. *Biomika – Biomix* 2 (2): 47–53 [in Russian] (Князев А.В., Чемерис А.В. Опосредованная *Agrobacterium tumefaciens* трансформация одуванчика *Taraxacum officinale* Weber // Биомика. 2012. Т. 2. № 2. С. 47–53).
- Knyazev AV, Kuleev BR, Mikhaylova EV, Yasybaeva GR, Chemeris AV (2017a) Aseptic germination and *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of *Taraxacum kok-saghyz* Rodin. *Plant Root*. 11: 64–69. DOI: 10.3117/plantroot.11.64
- Knyazev AV, Kuleev BR, Fateriya AV, Yasybaeva GR, Chemeris AV (2017b) Aseptic germination and *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of *Taraxacum hybernum* Steven. *Plant Tissue Cult. Biotech.* 27 (2): 141–151. DOI: 10.3329/ptcb.v27i2.35019
- Kobeleve VK (1937) *Selekciya kauchukonosnykh rastenij* 3: 641–670 [in Russian] (Кобелев В.К. Селекция каучуконосных растений. 1937. Т. 3. С. 641–670).
- Kogan LM (1939) Tekhnologiya izvlecheniya natural'nogo kauchuka. *Kauchuk i rezina* 8: 32 [in Russian] (Козан Л.М. Технология извлечения натурального каучука // Каучук и резина. 1939. № 8. С. 32).
- Korzinov N (2008) Bitva za rezinu. S chego nachinaetsya shina. *Populyarnaya mekhanika – Popular mechanics* 2 [in Russian] (Корзинов Н. Битва за резину. С чего начинается шина // Популярная механика. 2008. № 2). URL: <http://www.porpmech.ru/vehicles/7329-bitva-za-rezinu-s-chego-nachinaetsya-shina/>
- Koyalovich NB (1939) Kolichestvennoye opredeleniye kauchuka v kornevykh kauchukonosakh. *Kauchuk i rezina* 7: 26–29 [in Russian] (Коялович Н.Б. Количественное определение каучука в корневых каучуконосах // Каучук и резина. 1939. № 7. С. 26–29).
- Kuleev BR, Berezhneva ZA, Chemeris AV (2017) Hydroponic and aeroponic growing of Russian dandelion *Taraxacum kok-saghyz* Rodin. *Biomix* 9 (2): 96–100 [in Russian] (Кулеев Б.Р., Бережнева З.А., Чемерис А.В. Гидропонное и аэропонное выращивание одуванчика *Taraxacum kok-saghyz* Rodin // Биомика. 2017. Т. 9. № 2. С. 96–100).
- Kuleev BR, Garafutdinov RR, Maksimov IV, Sagitov AM, Chemeris DA, Knyazev AV, Vershinina ZR, Baymiev AnK., Muldashev AA, Baymiev AIK, Chemeris AV (2015) Natural rubber, its sources and components. *Biomix* 7 (4): 224–283 [in Russian] (Кулеев Б.Р., Гарафутдинов Р.Р., Максимов И.В., Сагитов А.М., Чемерис Д.А., Князев А.В., Вершинина З.Р., Баймиев А.Н., Мулдашев А.А., Баймиев А.И., Чемерис А.В. Натуральный каучук, его источники и составные части // Биомика. 2015. Т. 7. № 4. С. 224–283).
- Ladnova OL, Merkulova EG (2008) Primeneniye inulina i stevii pri razrabotke receptur produktov novogo pokoleniya. *Uspekhi sovremennoye estestvoznaniya* 2: 33–34 [in Russian] (Ладнова О.Л., Меркулова Е.Г. Применение инулина и стевии при разработке рецептур продуктов нового поколения // Успехи современного естествознания. 2008. № 2. С. 33–34).
- Lapin AK (1936) Kul'tura kauchukonosov. In: *Sel'skoye hozyajstvo SSSR. Ezhegodnik. 1935. Moscow: Sel'hoziz*. p. 65–73 [in Russian] (Лопин А.К. Культура каучуконосов // В кн.: Сельское хозяйство СССР. Ежегодник. 1935. М.: Сельхозгиз, 1936. С. 65–73).
- Lee M, Yoon ES, Jeong J, Choi YE (2004) *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation of *Taraxacum platycarpum* and changes of morphological characters. *Pl Cell Rep*. 22: 822–827.
- Luo Z, Iaffaldano BJ, Cornish K (2018) Colchicine-induced polyploidy has the potential to improve rubber yield in *Taraxacum kok-saghyz*. *Ind. Crop. Prod.* 112: 75–81. DOI: 10.1016/j.indcrop.2017.11.010
- Mahesh A, Jeyachandran R (2011) *Agrobacterium rhizogenes*-mediated hairy root induction in *Taraxacum officinale* and analysis of sesquiterpene lactones. *Plant Biosystems* 145 (3): 620–626. DOI: 10.1080/11263504.2011.584702
- Navashin MS, Gerasimova EN (1941) Poluchenie tetraploidnogo kok-sagzya i ego prakticheskoye znachenie. *Doklady akademii nauk SSSR – Transactions (Doklady) of the USSR Academy of Sciences. Earth Science Sections* 31 (1): 47–50 [in Russian] (Навашин М.С., Герасимова Е.Н. Получение тетраплоидного кок-сагыза и его практическое значение // Доклады академии наук СССР. 1941. Т. 31. № 1. С. 47–50).
- Navashin MS, Gerasimova-Navashina EN (1951) O tetraploidii i tetraploidnom kok-sagzye. *Agrobiologiya* 6: 102–109 [in Russian] (Навашин М.С., Герасимова-Навашина Е.Н. О тетраплоидии и тетраплоидном кок-сагызе // Агробология. 1951. № 6. С. 102–109).
- Pavlov NV (1942) *Dikie poleznyye tekhnicheskie rasteniya*. Moscow. 640 p. [in Russian] (Павлов Н.В. Дикие полезные технические растения. М., 1942. 640 с.).
- Polovenko IS, Filippov DI, Pravdin FN, Furman LM (1950) Kok-sagyz. Moscow: Gosudarstvennoye izdatel'stvo sel'skohozyajstvennoy literatury. p. 40–58 [in Russian] (Половенко И.С., Филиппов Д.И., Правдин Ф.Н., Фурман Л.М. Кок-сагыз. М.: Государственное издательство сельскохозяйственной литературы, 1950).

- Ramirez-Cadavid D, Cornish K, Michel F (2017) *Taraxacum kok-saghyz*: compositional analysis of a feedstock for natural rubber and other products. *Ind. Crop. Prod.* 107: 624–640. DOI: 10.1016/j.indcrop.2017.05.043
- Rawa'a, AM, Hassawi DS, Ibraheem NK (2018) In vitro micropropagation of *Taraxacum officinale* medicinal plant by direct and in director gamogenesis. *Plant Archives* 18 (2): 2273–2284.
- Rzymiski WM (2014) Extraction of natural rubber from alternative sources. *KGK rubberpoint* 67: 22–27.
- Sandomirskij D (1938) Radiokoagulyaciya lateksa. *Kauchuk i rezina* [in Russian] (Сандомирский Д. Радиокоагуляция латекса // Каучук и резина. 1938. С. 88).
- Schmidt T, Lenders M, Hillebrand A, van Deenen N, Munt O, Reichelt, Eisenreich W, Fischer R, Prüfer D, Gronover CS (2010) Characterization of rubber particles and rubber chain elongation in *Taraxacum kok-saghyz*. *BMC Biochem.* 11 (11). DOI: 10.1186/1471-2091-11-11
- Song YH, Wong PF, Chua NH (1999) Tissue culture and genetic transformation of dandelion. *Acta Hort* 289: 261–262.
- Spano D, Pintus F, Mascia C, Scorciapino MA, Casu M, Floris G, Medda R (2012) Extraction and characterization of a natural rubber from *Euphorbia characias* latex. *Biopolymers* 97: 589–594. DOI: 10.1002/bip.22044
- Swanson CL, Buchanan RA, Otey FH (1979) Molecular weights of natural rubbers from selected temperate zone plants. *J. Appl. Polym. Sci.* 23: 743–748. DOI: org/10.1002/app.1979.070230309
- Tverskaya SS, Iossa MM (1938) *Kauchuk i rezina* 2: 84–87 [in Russian] (Тверская С.С., Иосса М.М. Каучук и резина. 1938. № 2. С. 84–87).
- Warmke HE (1945) Experimental polyploidy and rubber content in *Taraxacum kok-saghyz*. *Botanical Gazette* 106 (3): 316–324.
- Yeo SE, Roh KS (2001) Transformation of *Taraxacum mongolicum* Hand, by *Agrobacterium tumefaciens*. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* 16: 480–485

ОТДАЛЕННАЯ ГИБРИДИЗАЦИЯ КАК МЕТОД ПОЛУЧЕНИЯ ГАПЛОИДНЫХ РАСТЕНИЙ У ЗЛАКОВ

Дьячук Т. И., Акинина В. Н., Хомякова О. В.,
Калашникова Э. В.

Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Юго-Востока,
410010, Россия, г. Саратов, ул. Тулайкова, 7;

✉ cell_selection@list.ru

В статье представлен обзор литературы по получению гаплоидных растений у злаков методом отдаленной гибридизации и механизмы, лежащие в основе селективной элиминации хромосом одного из родительских геномов во время раннего развития зародыша. Элиминация хромосом – распространенный феномен у отдаленных гибридов, который проявляется в разной степени в различных комбинациях: от потери одной или двух хромосом до элиминации полного набора хромосом одного из родителей. В последнем случае возникают гаплоидные растения, удвоение числа хромосом которых приводит к получению удвоенных гаплоидов (ДН-линий). Гомозиготность удвоенных гаплоидов послужила основой для их широкого использования в генетике и селекции растений. Использование данного подхода позволяет сократить время получения гомозиготных линий в среднем на пять лет, что приводит к экономии людских ресурсов и посевных площадей. Разработка «*bulbosum*» метода получения гаплоидов ячменя оказала революционное влияние на хромосомную инженерию злаков и ее использование в селекции растений. Однако разработанный на этой основе метод не мог эффективно использоваться для получения гаплоидов пшеницы, тритикале и других злаков из-за чувствительности пыльцы *Hordeum bulbosum* L. к генам-ингибиторам скрещиваемости пшеницы (*Kr*-генам). Эффективным опылителем для различных видов злаков явилась кукуруза. Скрещивания с дикорастущим злаком *Imperata cylindrica* (L.) Raeusch. выявили преимущества по сравнению со скрещиваниями пшеница × кукуруза и тритикале × кукуруза благодаря длительной продолжительности цветения этого вида и высокой частоте формирования зародышей и регенерации гаплоидных растений.

Ключевые слова: колосовые злаки, отдаленная гибридизация, гаплоидия, селективная элиминация хромосом, селекция.

Прозрачность финансовой деятельности / The transparency of the financial activities Авторы не имеют финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах.

Авторы благодарят рецензентов за их вклад в экспертную оценку этой работы / The authors thank the reviewers for their contribution to the peer review of this work

Дополнительная информация / Additional information Полные данные этой статьи доступны / Extended data is available for this paper at <https://doi.org/10.30901/2658-6266-2019-2-44-52>

Мнение журнала нейтрально к изложенным материалам, авторам и их месту работы / The journal's opinion is neutral to the presented materials, the author, and his or her employer

Все авторы одобрили рукопись / All authors approved the manuscript

Конфликт интересов отсутствует / No conflict of interest

DISTANT HYBRIDIZATION AS A METHOD OF HAPLOID PRODUCTION IN CEREALS

Djatchouk T. I., Akinina V. N.,
Khomyakova O. V., Kalashnikova E. V.

Agricultural Research Institute of South-East Region,
7, Toulaikov St., Saratov, 410010, Russia;

✉ cell_selection@list.ru

Elimination of chromosomes is a phenomenon widespread in distant hybrids. It ranges from the loss of one or two chromosomes to elimination of whole chromosome complement of one of the parents. Such elimination leads to the production of haploid plants, which then are treated with colchicine to double the chromosome number and to develop DH-lines. Homozygosity of doubled haploids serves as a basis for their wide use in plant genetics and breeding. The use of this approach reduces the time required for obtaining homozygous lines by 5 years on the average. It leads to savings in human resources, energy and acreage. The development of the “*bulbosum*” method for haploid barley production had a strong influence on the chromosome engineering in cereals and its implementation in plant breeding. However, the method developed on that basis could not be used effectively for producing haploids of wheat, triticale, etc. because of *Hordeum bulbosum* L. pollen sensitivity to genes inhibiting wheat crossability (*Kr* genes). The crosses with *Imperata cylindrica* (L.) Raeusch. is an efficient alternative to the widely used wheat × maize and triticale × maize crosses due to abundant pollen supply within a longer time period, significantly higher frequency of embryos formation and haploid plants regeneration.

Key words: cereals, distant hybridization, selective chromosome elimination, haploidy, breeding.

Для цитирования: Дьячук Т. И., Акинина В. Н., Хомякова О. В., Калашникова Э. В. Отдаленная гибридизация как метод получения гаплоидных растений у злаков (обзор проблемы). *Биотехнология и селекция растений*. 2019;2(2):44-52. DOI: 10.30901/2658-6266-2019-2-44-52

For citation: Djatchouk T. I., Akinina V. N., Khomyakova O. V., Kalashnikova E. V. Distant hybridization as a method of haploid production in cereals (a review of the problem). *Plant Biotechnology and Breeding*. 2019;2(2):44-52. (In Russ.) DOI: 10.30901/2658-6266-2019-2-44-52

УДК 631.1:581.143.6

Поступила в редакцию: 11.06.2019

Принята к публикации: 31.07.2019

Гаплоиды (от греч. гаплос – простой, одиночный) – спорофиты, в соматических клетках которых содержится половинное (гаплоидное) число хромосом (n вместо $2n$), причем из каждой пары гомологичных хромосом представлена одна. Удвоенные гаплоиды (DH) – генотипы, возникшие в результате удвоения числа хромосом гаплоидного организма. Основное селекционное преимущество гаплоидов – одноэтапное получение гомозигот, позволяющее быстро фиксировать морфофизиологические параметры адаптивности и сокращать сроки создания сортов, отвечающих всем требованиям современного рынка. С практической точки зрения наиболее распространенными являются два аспекта их применения: 1) ускоренное создание сортов у самоопыляемых культур и 2) получение гомозиготных линий в селекции на гетерозис, где создание инцухт-линий занимает 5-6 лет. Сроки селекции при использовании гаплоидов сокращаются в среднем на 5 лет (Wedzony et al., 2009; Dunwell, 2010; Liu et al., 2014; Humphreys, Knox, 2015). С применением различных гаплоидных технологий создано около 300 сортов экономически значимых сельскохозяйственных культур, 150 из которых относятся к представителям семейства Poaceae Barnhart. Число сортов, полученных с применением гаплоидных технологий, постоянно увеличивается (Dunwell, 2010). В Канаде 30% всех посевных площадей пшеницы заняты сортами, созданными на основе DH-технологий. Из приведенного в обзоре D. Дж. Хамфрис и Н. Е. Нокс (Humphreys, Knox, 2015) списка 47-ми DH-сортов этой культуры следует, что только два из них получены методом культуры пыльников, а остальные – методом селективной элиминации хромосом («maize» technique). В то же время в селекции ячменя наибольшее применение получил метод культуры пыльников – семь сортов из восьми созданы этим методом.

Для эффективного использования гаплоидов в селекционных программах, они должны удовлетворять следующим критериям: (1) эффективности получения DH-линий для любых генотипов, (2) DH-линии должны отражать спектр генетической изменчивости гибрида и (3) DH-линии должны быть генетически стабильны (Snape et al., 1986). Существуют различные методы получения гаплоидных растений, однако их массовое получение стало возможным с развитием методов культивирования растительных тканей *in vitro*.

Для искусственного получения гаплоидов у злаков применяются два метода: культура пыльников и ее разновидность – культура изолированных микроспор и отдаленная гибридизация с последующей селективной элиминацией хромосом вида-опылителя (Chistyakova, 2000; Djatchouk, 2003; Devaux, Pickering, 2005; Pratap et al., 2006; Ignatova, 2011; Hazarica et al., 2013; Gosal, Wani, 2018; Srivastava, Singh, 2018). Одним из основных преимуществ метода селективной элиминации хромосом в сравнении с культурой пыльников у злаков является отсутствие альбиносных

растений и генетическая стабильность DH-линий (Devaux, Pickering, 2005; Chaudhary et al., 2014).

Несовместимость родительских геномов в отдаленных скрещиваниях имеет различные проявления. Важнейшее из них – кариотипическая нестабильность гибридов. Хромосомы одного из родителей, чаще всего отцовские, частично или полностью элиминируют из гибридного ядра. Этот феномен, названный «хромосомной элиминацией», проявляется в различных межвидовых и межродовых скрещиваниях (Davies, 1974; Surikov, Dunaeva, 1989; Djatchouk, 2003; Ignatova, 2011; Pratap et al., 2006; Chaudhary et al., 2014). В результате в развивающемся зародыше остается только гаплоидный набор хромосом материнского родителя. Общая схема селективной элиминации хромосом при отдаленных скрещиваниях включает: скрещивание видов « z » и « y », формирование гибридной зиготы, элиминацию хромосом вида « y », получение удвоенных гаплоидов после диплоидизации хромосом (Houben et al., 2011). Исследования аномалий митотического цикла предоставляет информацию о процессе элиминации хромосом. Хромосомы опылителя в метафазе располагаются вне экваториальной плоскости. Сестринские хромосомы в анафазе не двигаются к полюсам. Они формируют микроядра, и, в конечном итоге, дегенерируют.

Для объяснения причин селективной элиминации хромосом предлагались различные гипотезы: асинхронности митотических циклов скрещиваемых видов (Gupta, 1969), асинхронности синтеза ядерных белков, приводящей к потере отдельных хромосом (Laurie, Bennet, 1989), пространственного разделения геномов в интерфазе (Linde-Laursen, von Bothner, 1999). Кроме того, существуют гипотезы деградации чужеродных хромосом специфическими нуклеазами хозяина (Davies, 1974), специфической видовой инактивации хромосом (Jin et al., 2004; Mochida et al., 2004), и нерасхождения хромосом одного из родителей в анафазе (Ishii et al., 2010). Элиминация хромосом является выражением одной из форм постгамной несовместимости, обеспечивающей репродуктивную изоляцию видов (Surikov, Dunaeva, 1989). По мнению X. К. Чаудхари с соавторами (Chaudhary et al., 2014), клеточные механизмы, вовлекаемые в процесс однородительской элиминации хромосом, до настоящего времени остаются плохо понятными.

Барьеры несовместимости, проявляющиеся на постгамной стадии, ингибируют нормальное развитие гибридных семян. Одно из проявлений постгамной несовместимости – отсутствие развития эндосперма, приводящее к голоданию зародыша и его последующей гибели. Своевременная изоляция зародыша и его культивирование на искусственной питательной среде *in vitro* является основополагающим принципом технологии embryo rescue («спасения» незрелых зародышей), обеспечивающей получение жизнеспособных растений в отдаленных скрещиваниях (Filippis, 2014; Lulsdorf et al., 2014; Sahijram, Rao, 2015; Gosal, Wani, 2018).

Получение гаплоидов в скрещиваниях *Hordeum vulgare* L. × *H. bulbosum* L.

В селекции ячменя метод селективной элиминации хромосом широко используют для получения гаплоидов при скрещивании *Hordeum vulgare* × *H. bulbosum* (так называемый «*bulbosum*»-метод). Первые такой межвидовой гибрид был получен еще в 1934 году. При скрещивании тетраплоидного *H. bulbosum* (♀) с тетраплоидным *H. vulgare* (♂) было получено одно стерильное растение (Kuckuck, 1934). Однако, причина появления в первом поколении растений, внешне похожих на обыкновенный ячмень, выяснилась гораздо позднее. Эксперименты с применением методов цитологии, проведенные одновременно в Голландии (Lange, 1971) и Канаде (Symko, 1969; Kasha, Kao, 1970), объяснили возникновение гаплоидных растений у межвидовых гибридов ячменя вследствие элиминации хромосом *H. bulbosum*. В тех случаях, когда в качестве женского родителя авторы использовали как диплоидные, так и тетраплоидные генотипы обыкновенного ячменя, а в качестве отцовского – диплоидные клоны *H. bulbosum*, было получено большое количество схожих с обыкновенным ячменем гаплоидных и дигаплоидных растений и только единичные гибриды. Авторы установили, что появление гаплоидных растений материнского типа не было следствием партеногенеза. В этих комбинациях происходило двойное оплодотворение, а гаплоидный набор хромосом у полученных растений был следствием селективной элиминации хромосом *H. bulbosum* в чужеродной цитоплазме *H. vulgare*.

Элиминация хромосом *H. bulbosum* происходит как во время митоза, так и в интерфазе и сопровождается формированием микроядер и прогрессивной гетерохроматизацией. Полная элиминация хроматина луковичного ячменя происходит в течение 5–9 дней после опыления. Скорость элиминации хромосом зависит от генотипа родителей, а также условий их выращивания. Повышение температуры от +25°C до +30°C ускоряет элиминацию хромосом *H. bulbosum* (Humphreys, 1978; Pickering, Morgan, 1985; Gernand et al., 2006). Элиминация хромосом начинается уже в анафазе зиготы, при этом в каждом делении теряется до трех хромосом (Bennet et al., 1976). Цитоэмбриологические исследования различных стадий развития зародышей предоставили новую информацию и привели к разработке научных основ метода получения гаплоидов. Результаты этих исследований не только подтвердили элиминацию хромосом луковичного ячменя, но и выявили критические периоды развития зародыша, сроки гибели эндосперма и необходимость дальнейшего культивирования эмбрионов на искусственной питательной среде для завершения процесса развития и прорастания. Применение технологии *embryo rescue* обеспечило на следующем этапе повышение эффективности метода и его дальнейшее использования в селекционном процессе

(Konzak et al., 1951; Bhojwani, Dantu, 2013; Filipis, 2014; Lulsdorf et al., 2014; Sahijram, Rao, 2015).

В работе Sanie с коллегами (Sanie et al., 2011) установлено, что селективная элиминация хромосом *H. bulbosum* опосредована утратой одного из видов гистонового белка H3(CENH3) в центромере. Потеря функции центромер приводит к тому, что хромосомы луковичного ячменя не прикрепляются к веретену деления, они формируют микроядра и дегенерируют. Авторы изучили механизм, лежащий в основе селективной элиминации хромосом на ранних стадиях развития зародышей и роль специфического гистона центромер CENH3. Они заключают, что: 1) инактивация центромер в хромосомах *H. bulbosum* направляет митоз-зависимый процесс селективной элиминации хромосом в скрещиваниях *H. vulgare* × *H. bulbosum*; 2) инактивацию центромеры вызывает потеря гистона CENH3, а не сайленсинг соответствующего гена (Sanie et al., 2011).

Элиминация хромосом опылителя может происходить как во время митоза, так и в интерфазе (Gernand et al., 2006; Sanie et al., 2011). Интерфазная элиминация связана с разделением геномов, «отчуждением» хроматина отцовского родителя, формированием микроядер и их дегенерацией. Элиминация может сопровождаться структурными перестройками хромосом элиминирующего генома, вызывающими нарушение в расхождении хромосом в митозе с последующим формированием микроядер (Sanie et al., 2011).

Несовместимость при скрещивании обыкновенного и луковичного ячменя контролируется геном(-ами), локализованными в 7-ой хромосоме обыкновенного ячменя, который подавляет прорастание пыльцы и рост пыльцевых трубок луковичного ячменя. Наблюдается гомеологичность 7-ой хромосомы ячменя и хромосом пшеницы 5-ой группы сцепления, на которых локализованы три доминантных гена, контролирующих несовместимость при скрещивании пшеницы с рожью (Pickering, 1983). Степень элиминации хромосом *H. bulbosum* при скрещивании с *H. vulgare* зависит, прежде всего, от соотношения родительских геномов. Реципрокные скрещивания *H. vulgare* и *H. bulbosum* одного уровня плоидности (соотношение геномов 1^v : 1^b) приводят, как правило, к получению гаплоидных и дигаплоидных растений культурного ячменя. Растения в потомстве комбинаций с соотношением геномов 1 *vulgare* : 2 *bulbosum* являются стабильными гибридами (Kasha, Sadasivaiah, 1971; Lange, 1971).

Генотип растения-опылителя и условия выращивания донорных растений влияют на степень элиминации хромосом (Simpson et al., 1980; Pickering, 1983; Thörn, 1992; Chistyakova, 2000; Ignatova, 2011). Выход гибридов в зависимости от опылителя варьирует от 0 до 50%. Генотип обыкновенного ячменя влияет на степень дифференциации зародышей. В опытах с 13 клонами *H. bulbosum* (2n) и 6 сортами обыкновенного ячменя (2n) показана

но, что выход гаплоидных растений зависит от генотипов обоих родителей, а также от особенностей их взаимодействия между собой. При скрещивании обыкновенного ячменя сорта Emig образуются нестабильные гибриды, у которых хромосомы *H. bulbosum* элиминируют в последующих генерациях. В то же время гибридизация сорта обыкновенного ячменя Vada приводит к получению стабильных гибридов (Simpson et al., 1980).

В засушливых условиях Поволжья эффективность гибридизации обыкновенного и луковичного ячменя связана не только с обратимыми и необратимыми нарушениями, проявляющимися в отдаленных скрещиваниях, но и влиянием температуры и влажности воздуха на прохождение всех этапов развития зародыша и элиминацию хромосом луковичного ячменя. В условиях низкой влажности и повышенных температур, складывающихся в период опыления и формирования зародышей, элиминация хромосом луковичного ячменя является абсолютной. Гибридные растения выявляли в единичных случаях при выращивании донорных растений в теплице (Djatchouk, 2003).

Протоколы получения гаплоидных растений ячменя методом «*bulbosum*» представлены в работах: Jensen (1977), Kasha (2005), Houben, (2011), Ignatova (2011).

Получение гаплоидов пшеницы

Возможность использования метода селективной элиминации хромосом для получения гаплоидов у других видов при обнаружении у них соответствующих опылителей была предсказана К. Дж. Кейша и К. Н. Као (Kasha, Kao, 1970). Об успешном использовании *H. bulbosum* для получения гаплоидов мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L. ($2n = 6x = 42$) сообщил И. Р. Бэркли (Barclay, 1975). При скрещивании сорта пшеницы Chinese Spring с диплоидным или тетраплоидным луковичным ячменем происходило двойное оплодотворение. Спустя 14–18 суток после опыления фиксировали первые признаки дегенерации эндосперма, в связи с чем возникла необходимость применения технологии «спасения» зародышей (*embryo rescue*). Цитологический анализ 50 растений из 70 полученных показал, что они имеют гаплоидный набор хромосом, независимо от уровня пloidности луковичного ячменя. Однако, скрещивание пшеницы с *H. bulbosum* ограничивается лишь немногими генотипами и контролируется локусами *Kr1*, *Kr2*, *Kr3* и *Kr4* на хромосомах 5A, 5B, 5D и 1A соответственно (Jalani, Moss, 1980; Sitch, Snape, 1985; Zheng, Luo, 1992). Гены-ингибиторы скрещиваемости не влияют на прорастание пыльца и скорость роста пыльцевых трубок до микропиле. Число пыльцевых трубок, достигших микропиле, у «отзывчивых» генотипов было значительно большим.

Скрещивание пшеницы с *H. bulbosum* не нашло применения в селекционной практике из-за чувствительности пыльца к генам-ингибиторам скрещиваемости. Сорт Chinese Spring обладает рецессивными аллелями скрещиваемости *kr1* и *kr2*. Рецессивный аллель гена скрещиваемости *kr1* Chinese Spring был перенесен в европейские сорта пшеницы путем получения линий с замещениями хромосомы 5B, что обеспечило получение гаплоидных растений у сортов мягкой пшеницы Highbury, Sisco и Sappo (Snape, Simpson, 1980). Однако, длительные временные затраты по переносу рецессивных аллелей скрещиваемости препятствовали широкому использованию такого подхода в селекционной практике.

Существенный прогресс в совершенствовании метода селективной элиминации хромосом у пшеницы достигнут благодаря подбору других видов-опылителей. Скрещивания (пшеница × кукуруза) явились приемлемой альтернативой скрещиваниям пшеница × луковичный ячмень из-за меньшей чувствительности пыльца кукурузы к генам-ингибиторам скрещиваемости (Laurie, Bennet, 1986, 1988a; Morshedi, Darvey, 1995; Lei et al., 1996; 1988b). Первое сообщение о формировании зародышей при гибридизации пшеницы и кукурузы было приведено в работе (Zenkteler, Nitzsche, 1984). Позднее эти результаты были подтверждены Д. А. Лаури и М. Д. Беннетт (Laurie, Bennet, 1986). Цитологические исследования показали, что пыльца кукурузы успешно прорастает на рыльце пшеницы, достигает зародышевого мешка, и происходит оплодотворение. Гибридная зигота содержит 21 хромосому пшеницы и 10 хромосом кукурузы. Гибридная зигота кариотипически нестабильна, так как хромосомы кукурузы не прикрепляются к веретену деления. Центромеры не прикрепляются к микротрубочкам веретена из-за прогрессивной потери активности центромер. В результате хромосомы кукурузы элиминируют через три-четыре митоза, что приводит к формированию гаплоидного зародыша пшеницы ($2n = 21$). Зародыши, состоящие из восьми и более клеток, уже не содержат хромосом кукурузы. Такие зародыши всегда абортуют по причине ранней дегенерации эндосперма, если они остаются на материнском растении (Laurie, Bennet, 1988a, 1989; Laurie, 1989a).

Скрещивания пшеницы с кукурузой являются эффективными для получения гаплоидов у большинства пшеничных генотипов, в том числе, у трудно отзывчивых в культуре пыльников *in vitro* (Chaudhary et al., 2002; Pratap et al., 2006). Выход гаплоидных эмбрионов в отдельных скрещиваниях достигает 53% (Morshedi, Darvey, 1995). Регуляторы роста (например, ауксины) играют критическую роль в развитии зародыша. Обработка раствором 2,4-Д (инъекция в верхнее междоузлие или опрыскивание опыленных колосьев) способствуют развитию и дифференциации гаплоидных зародышей (Matzk, Mahn, 1994; Suenaga et al., 1997).

При скрещивании твердой пшеницы с кукурузой зигота имеет 24 хромосомы (14 – от твердой пшеницы и 10 – от кукурузы). Уровень плоидности не является барьером для получения гаплоидных зародышей (Ahmad, Chowdhry, 2005). Однако эффективность применения пыльцы кукурузы для получения гаплоидов твердой пшеницы в большинстве опытов составила 1-2 ДН-линии на 100 опыленных цветков, что связывают с отсутствием D-генома у этого вида (Cherkaoui et al., 2000; Devaux, Pickering, 2005).

Более высокая эффективность получения гаплоидов и независимость результатов от генотипа материнской формы в скрещиваниях (пшеница × кукуруза) по сравнению с культурой пыльников и техникой «bulbosum» послужили основой их широкого применения в селекционной практике (Devaux, Pickering 2005; Jauhar et al., 2008; Weyen, 2009; Humphreys, Knox, 2015).

Успешная индукция гаплоидов у мягкой пшеницы достигнута при использовании в качестве опылителя африканского проса – *Pennisetum glaucum* L. (= *Pennisetum americana* L.). При скрещивании Chinese Spring (*kr1*, *kr2*) с африканским просом (генотип Tift23BE) завязываемость зерновок составила 28,6% от числа опыленных цветков. Определение чисел хромосом в метафазах зигот подтвердило гибридное происхождение зародышей (21 хромосома пшеницы + 7 хромосом проса). Гибридные зародыши были кариотипически нестабильны и теряли хромосомы африканского проса в первых четырех делениях. В скрещиваниях сорта Highoury, отличающегося от Chinese Spring наличием в локусах доминантных аллелей генов скрещиваемости, получено 31% завязываемости зерновок, что достоверно не отличалось от скрещиваний с Chinese Spring (Laurie, 1989b).

Показана возможность использования пыльцы сорго *Sorghum bicolor* L. для получения гаплоидов мягкой пшеницы с применением цитозембриологического контроля процесса элиминации хромосом. Растения мягкой пшеницы сорта Chinese Spring опыляли пыльцой сорго сорта S9B ($2n = 2x = 20$). В 69 из 100 опыленных цветков, зафиксированных через 48 часов после опыления, имелся либо зародыш или эндосперм, либо зародыш и эндосперм. Частота одинарного или двойного оплодотворения варьировал от 50 до 91. Зиготы обнаружены в зародышевом мешке через 25–27 часов после опыления. Они содержали 21 крупную хромосому пшеницы и 10 мелких хромосом сорго. Уже в трехклеточном состоянии зародыши имели только 21 пшеничную хромосому, что указывает на быструю элиминацию хромосом сорго (Laurie, Bennet, 1988b). Однако при скрещивании пшеницы и сорго проявляется сильно выраженная генотипическая зависимость, частота сформировавшихся зародышей зависела от генотипа пшеницы (Inagaki, Mujeeb-Kazi, 1995).

Проводится поиск других видов-опылителей, повышающих эффективность получения гаплоидных растений пшеницы. Дикорастущий вид Императа цилиндрическая

(*Imperata cylindrica* (L.) Raeusch.) с успехом используется для массового получения полигаплоидов пшеницы и тритикале (Pratap et al., 2005; Kishore et al., 2011; Rather, 2012; Tayeng et al., 2012; Chaudhary et al., 2013, 2014, 2016). Использование этого вида в качестве опылителя имеет ряд преимуществ по сравнению с кукурузой – длительность цветения, отсутствие необходимости ежегодного посева опылителя, нечувствительность к действию генов-ингибиторов скрещиваемости пшеницы (Kishore et al., 2011). Хромосомы этого опылителя обнаружены только в зиготе, они элиминируют из ядра уже во время первого клеточного деления. Возможная причина их элиминации – несовместимость материнского и отцовского родителя. Отсутствие активности кинетохора обусловлено неспособностью чужеродных хромосом выстраиваться в экваториальной плоскости. Цитологические исследования выявили нарушения формирования эндосперма в таких скрещиваниях. Применение молекулярно-цитогенетического анализа (GISH) показало, что сформировавшиеся зародыши были гибридного, но не апомиктичного происхождения (Komeda et al., 2007).

Успешность получения гаплоидов зависит как от генотипов материнской формы, так и опылителя. Подбор «отзывчивых» генотипов пшеницы и генетическое разнообразие *I. cylindrica* позволили существенно повысить эффективность гаплопродукции пшеницы (Chaudhary et al., 2013; Rather et al., 2014). Для идентификации роли отдельных хромосом, влияющих на успех гаплопродукции в скрещиваниях с *I. cylindrica*, в качестве материнских форм привлекали представителей различных видов: мягкую пшеницу (AABBDD), *Aegilops tauschii* Coss. (DD), линии твердой пшеницы (AABB), линии твердой пшеницы с замещениями на хромосомы D-генома, линии тритикале с замещениями AABB/DR/R, ячмень (*Hordeum vulgare*, HH) и рожь (*Secale cereale* L., RR). Результаты скрещиваний показали, что гаплоидные растения были получены только у мягкой пшеницы, *Aegilops tauschii* и линий тритикале, содержащих хромосомы D-генома. Характерно, что наибольшая частота формирования гаплоидных зародышей была обнаружена у линий с замещениями по 7D хромосоме. Авторы заключают, что ключевую роль в индукции гаплоидных растений в скрещиваниях с *Imperata cylindrica* играет геномная и генотипическая специфичность. Пусковым механизмом селективной элиминации хромосом и формирования гаплоидных зародышей служит D-геном, а некоторые его хромосомы (главным образом, 7D) могут улучшать скрещиваемость с *I. cylindrica* (Mukai et al., 2015).

Получение гаплоидов тритикале

Для получения гаплоидов тритикале успешно применяется метод культуры пыльников (Ignatova, 2011; Дья-

etchouk et al., 2012; Krzewska et al., 2012; Wedzony et al., 2015) и изолированных микроспор (Oleszezuk et al., 2004; Eudes, Chugs, 2009; Lantos et al., 2014). Существенным ограничением для практического использования этого метода является высокая частота альбинизма среди регенерантов. Кроме того, в потомствах андрогенных растений тритикале были идентифицированы анеуплоиды (в основном нуллисомики), а также генотипы с другими aberrациями, включая транслокации. Изучение митозов в кончиках корней растений-регенерантов показал, что в соматических клетках этих растений геном ржи более часто вовлекается в хромосомные преобразования, чем геном пшеницы (Charmet et al., 1986; Oleszezuk et al., 2011). Изменения уровня метилирования ДНК являются дополнительным фактором, влияющим на фенотипическую нестабильность ДН-линий. Выявлено, что уровень метилирования ДНК у ДН-линий, полученных у сорта тритикале Bogo, был ниже, чем у донорного растения. Тем не менее, после нескольких половых поколений уровень метилирования ДНК восстанавливался до исходного (Machezynska et al., 2014).

Альтернативным методом получения гаплоидов тритикале является отдаленная гибридизация. Так, гибридизация с луковичным ячменем оказалась малоэффективной для большинства генотипов (Lehmann, Krollov, 1991). Скрещивания тритикале × кукуруза приводят к селективной элиминации хромосом кукурузы и получению гаплоидных растений тритикале (Rogalska et al., 1996; Wedzony, 1998; Pratap et al., 2005). Эффективность получения гаплоидов в этом скрещивании оказалась ниже, по сравнению с культурой пыльников, и зависела от генотипа. Тем не менее этот метод рекомендуется использовать в селекционных программах для получения гаплоидов у генотипов, слабо отзывчивых в культуре пыльников (Wedzony et al., 2001; Pratap et al., 2006).

Высокая эффективность метода селективной элиминации хромосом по сравнению с методом культуры пыльников выявлена в скрещивании с кукурузой сорта Madgran local с двумя типами гибридов: тритикале × пшеница и тритикале × тритикале (Pratap et al., 2006). При скрещивании с кукурузой частота формирования гаплоидных зародышей была выше как для гибридов тритикале × пшеница (20,4%), так и гибридов тритикале × тритикале (17%). Индукция каллусов в культуре пыльников для этих гибридов составила всего 1,6% и 1,4% соответственно. Существенно, что четыре гибрида F_1 (тритикале × пшеница) и три гибрида (тритикале × тритикале) не формировали эмбрионов в культуре пыльников. В то же время, при скрещивании с кукурузой у всех гибридов формировались гаплоидные зародыши, а среди регенерантов были только зеленые растения. Как и при получении гаплоидов пшеницы, выявлена эффективность применения в качестве опылителя *I. cylindrica* по показателям частоты формирования зародышей и регенерации растений (Kishore et al., 2011).

Возможности оптимизации метода получения гаплоидных растений

Для повышения эффективности получения гаплоидов злаков методом селективной элиминации хромосом используются различные подходы. Применение *in vivo* колхицина (0,02%) положительно влияло на частоту сформированных зародышей и выход гаплоидных растений у мягкой пшеницы (Tayeng et al., 2012).

При получении гаплоидов мягкой пшеницы в скрещиваниях с кукурузой определена эффективность применения различных обработок растений регуляторами роста. Так, применение раствора 2,4-Д в концентрации 100 мг/л в течение трех суток после опыления (один раз в сутки) позволило увеличить частоту гаплоидных зародышей. Генотип кукурузы, используемый в качестве опылителя, не повлиял на этот показатель (Lei, 1996).

В опытах Д. А. Лаури и М. Д. Беннетт завязи пшеницы были помещены на питательную среду МС с добавлением 6% сахарозы и 0,1 мг/л 2,4-Д через два дня после опыления. Зародыши вычленили через три недели культивирования, их выживаемость составила 26,9% в сравнении с 0,17% при их формировании *in vivo* (Laurie, Bennet, 1988a).

При культивировании срезанных побегов в контролируемых условиях выявлена высокая эффективность формирования гаплоидных эмбрионов мягкой пшеницы. Побегов с опыленными колосьями культивировали при оптимальной температуре (22°C–23°C днем и 16°C–17°C в ночное время) и влажности воздуха 70%. Питательный раствор содержал 40 г/л сахарозы, 10 мг/л нитрата серебра, 3 г/л фосфата кальция и 8 мл/л сернистой кислоты. Зародыши помещали на питательную среду через 14 дней культивирования побегов. Выход гаплоидных зародышей составлял 31,6% по сравнению с 9,6% в контроле (выращивание интактных растений в неконтролируемых полевых условиях). По мнению авторов, в этих условиях фосфат кальция способствует усилению транспорта питательных веществ из листьев и стебля к завязям и улучшает питание зародышей. Разработанная технология успешно используется для получения ДН-линий пшеницы в массовых количествах (Jian et al., 2008).

Высокая эффективность метода получения гаплоидов ячменя была достигнута при использовании культуры опыленных цветков и побегов на модифицированной среде N6, содержащей 0,5 мг/л кинетина и 1,2 мг/л 2,4-Д. Эффективность гаплопродукции составила 41,6% в культуре изолированных цветков и 13,5% для культуры побегов (Chen, Hays, 1989).

Большой вклад в разработку практических и теоретических основ метода сделан отечественными исследователями.

Проведены обширные исследования по улучшению условий опыления и формирования зерновок. Так, обработка пролином кастрированных колосьев обыкновенного ячменя позволяет не только повысить процент завязываемости зерновок, но и выход гаплоидных растений. После опыления рекомендовано обрабатывать цветки смесью гибберелловой кислоты (ГК) в концентрации 75 мг/л и 15 мг/л борной кислоты и пролином (200 мг/л) (Ignatova, 2011). Холодовая обработка зародышей *in vivo* перед эксплантацией на питательную среду спустя 8–10 дней после опыления ускоряет дифференциацию зародышей и улучшает их способность к прорастанию (Chistyakova, 2000).

Для упрощения процедуры получения гаплоидов пшеницы и снижения затрат изучены различные способы кастрации и опыления колосьев и их влияние на частоту оплодотворения: а) цветочные чешуи кастрированных цветков оставляли неповрежденными, б) цветочные чешуи подрезали на уровне рылец, в) цветки с неповрежденными цветочными чешуями обрабатывали раствором гиббереллина (75 мг/л) через два часа после опыления, г) цветки с подрезанными цветочными чешуями обрабатывали раствором гиббереллина (75 мг/л) через два часа после опыления. Оплодотворение происходило во всех четырех вариантах, при этом 20,2% семян имели только зародыш, 2,5% – только эндосперм и 9% – как зародыш, так и эндосперм. Наибольшая частота оплодотворения была обнаружена в цветках с неповрежденными цветочными чешуями (Laurie, 1989a).

Применение пыльцы, хранящейся при ультранизких температурах, позволяет проводить работу по получению гаплоидов мягкой пшеницы при отсутствии свежесобранной пыльцы. Пыльца африканского проса сохраняла свою жизнеспособность более стабильно по сравнению с кукурузой, а выход зародышей не отличался от такового при опылении свежей пыльцой (Inagaki et al., 1997). Использование хранившейся при различных режимах пыльцы *I. cylindrica* обеспечило успешность получения гаплоидных растений в тех местах, где этот опылитель не произрастает в природных условиях. Среди применяемых режимов (–80°C, –20°C и +4°C) наибольший положительный эффект обеспечило хранение пыльцы при –20°C. Хранившаяся при таком режиме пыльца могла быть использована для опыления пшеницы в течение месяца (Rather, 2012).

Проведен сравнительный анализ эффективности получения гаплоидов пшеницы при использовании различных опылителей (кукуруза и африканское просо), различных способов кастрации колосьев (вручную на растении, вручную на срезанных побегах, стерилизация пыльцы горячей водой). В скрещивании с кукурузой при использовании свежесобранной пыльцы частота формирования зародышей составила 18,9–20,4%, с просом – 19,7–35,6% (Inagaki et al., 1997). При опылении хранившейся пыльцой этот показатель резко снижался при использо-

вании пыльцы кукурузы (до 2,8–8,5%) и не изменялся при использовании пыльцы африканского проса, которая более устойчива к длительному хранению, и ее использование не снижает выход гаплоидных зародышей. Важно отметить, что замена процедуры кастрации цветков на стерилизацию собственной пыльцы пшеницы горячей водой не снизила выход гаплоидных зародышей. При применении такой методики затрачивается лишь несколько минут на стерилизацию пыльцы большой партии колосьев, тогда как обычная кастрация требует 3–5 минут на один колос. Такие технологии позволили усовершенствовать способ массового получения гаплоидных растений в отдаленных скрещиваниях (Inagaki et al., 1997).

Заключение

Массовое получение гаплоидных растений у экономически значимых зерновых культур основано на трех основных методах – культуре пыльников, культуре изолированных микроспор и отдаленной гибридизации с последующей селективной элиминацией хромосом вида-опылителя. Совершенствование метода селективной элиминации хромосом позволило создать многочисленные сорта зерновых культур в Европе, Австралии, Канаде, США, Китае, Индии и других странах (обзор Srivastava, Singh, 2018). Ячмень луковичный *Hordeum bulbosum* успешно используют для получения гаплоидов ячменя. У других видов (мягкой и твердой пшеницы, тритикале) его применение ограничено чувствительностью пыльцы к генам-ингибиторам скрещиваемости. Для мягкой пшеницы и тритикале в качестве опылителей успешно используются кукуруза и дикорастущий вид *Imperata cylindrica*. Поиск других видов-опылителей, нечувствительных к генам-ингибиторам скрещиваемости и эффективных по частоте формирования зародышей и регенерации растений, может привести к созданию генотип-независимых гаплоидных технологий и их практическому использованию.

№ Государственного задания 520-2019-0001.

References/Литература

- Ahmad J, Chowdhry MA (2005) Effects of different ploidy level in wheat (hexaploids and tetraploids) on seed and embryo formation and haploid production in wheat × maize crosses. *J. Biol. Sci.* 8: 1758–1761.
- Barclay IR (1975) High frequencies of haploid production in wheat (*Triticum aestivum* L.) by chromosome elimination. *Nature* 256: 410–411.
- Bennet MD, Finch RA, Barclay TR (1976) The time and mechanism of chromosome elimination in *Hordeum* hybrids. *Chromosoma (Berl.)* 54: 175–200.
- Bhojwani SS, Dantu PK (2013) Zygotic embryo culture. *Plant Tissue Culture: An Introductory Text* p. 327–340. DOI: 10.1007/978-81-322-1026-9_11

- Charmet G, Bernard S, Bernard M (1986) Origin of aneuploid plants obtained by anther culture in triticale. *Canad. J. Genet. Cytol.* 28 (3): 444–452. DOI: 10.1139/g86-067
- Chaudhary HK, Singh S, Sethi GS (2002) Interactive influence of wheat and maize genotypes on haploid induction in winter × spring wheat hybrids. *J. Genet. Breed.* 56: 259–266.
- Chaudhary HK, Tayeng T, Kaila V, Rather SA (2013) Enhancing the efficiency of wide hybridization mediated chromosome engineering for high precision crop improvement with special reference to wheat × *Imperata cylindrica* system. *Nucleus* 56 (1): 7–14. DOI: 10.1007/s13237-013-0077-5
- Chaudhary HK, Kaila V, Rather SA (2014) Distant hybridization and doubled haploid breeding. In: Alien Gene Transfer in Crop Plant: Innovations, Methods and Risk Assessment. A Pratap, J Kumar (eds.) 1: 143–164. DOI: 10.1007/978-1-1614-8585-8_6
- Chaudhary HK, Kaila V, Ratner SA et al. (2016) Chromosome engineering for high precision crop improvement. In: Gene Pool Diversity and Crop Improvement. VR Rajpal et al. (eds.) p. 291–323. DOI: 10.1007/978-3-319-27096-8_10
- Chen FQ, Hays PM (1989) A comparison of *Hordeum bulbosum*-mediated haploid production efficiency in barley using in vitro floret and tiller culture. *Theor. and Appl. Genet.* 77: 701–704.
- Cherkaoui S, Lamsaouri O, Chlyah A, Chlyah H (2000) Durum wheat × maize crosses for haploid wheat production: influence of parental genotypes and various experimental factors. *Plant Breed.* 119: 31–36.
- Chistyakova VN (2000) Haploids of incomplete wheat-agropyron amphidiploids, soft wheat and barley: production and utilization. Moscow: MAKSS Press. 355 p. [In Russian] (Чистякова В.Н. Гаплоиды неполных пшенично-пырейных амфидиплоидов, мягкой пшеницы и ячменя: получение и использование. М.: МАКС Пресс, 2000. 355 с.).
- Davies DR (1974) Chromosome elimination in inter-specific hybrids. *Heredity* 32: 267–270.
- Devaux P, Pickering R (2005) Haploids in the improvement of *Poaceae*. In: Biotechnology in Agriculture and Forestry. CE Palmer, WA Keller, KJ Kasha (eds.) 56: 215–242. DOI: 10.1007/3-540-26889-8_11
- Dunwell JM (2010) Haploids in flowering plants: origins and exploitation. *Plant Biotech. J.* 8: 377–424.
- Dyatchouk TI (2003) Technological and breeding aspects of haploidy on the example of wheat and barley: dissertation of doctor biological science. Saratov: 280 p. [In Russian] (Дьячук Т.И. Технологические и селекционные аспекты гаплоидии на примере пшеницы и ячменя: дис. ... доктора биол. наук. Саратов, 2003. 280 с.).
- Dyatchouk TI, Akinina VN, Khomyakova OV, Pominov AV (2012) Haploidy in the triticale breeding. *Grain Economy of Russia* 2 (20): 25–29 [In Russian] (Дьячук Т.И., Акинина В.Н., Хомякова О.В., Поминов А.В. Гаплоидия в селекции тритикале // Зерновое хозяйство России. 2012. Т. 2. № 20. С. 25–29).
- Eudes F, Chugs A (2009) An overview of triticale doubled haploids. In: Advances in Haploid Production in Higher Plants. A Toyraev et al. (eds.) p. 87–113.
- Filippis LF (2014) Crop improvement through tissue culture. In: Improvement of Crops in the Era of Climatic Changes. P Ahmad et al. (eds.) 1: 289–346. DOI: 10.1007/978-1-4614-8830-9_12
- Gernand D, Rutten T, Pickering R, Houben A (2006) Elimination of chromosomes in *Hordeum vulgare* × *Hordeum bulbosum* crosses at mitosis and inrephase involves micronucleus formation and progressive heterochromatinization. *Cytogenet. Genome Res.* 114: 169–174.
- Gosal SS, Wani SH (2018) Cell and tissue culture approaches in relation to crop improvement. In: Biotechnologies of Crop Improvement. S.S. Gosal, S.H. Wani (eds.) 1: 1–42. DOI: 10.1007/978-3-319-78283-6_1
- Gupta SB (1969) Duration of mitotic cycle and regulation of DNA replication in *Nicotiana plumbaginifolia* and a hybrid derivative of *N. tabacum* showing chromosome instability. *Can. J. Genet. Cytol.* 11: 133–142.
- Hazarika RR, Mishra VK, Chaturved R (2013) In vitro haploid production – a fast and reliable approach for crop improvement. In: Crop Improvement Under Adverse Conditions. J Tutja, SS Gills (eds.) p. 171–211. DOI: 10.1007/978-1-46-14-4633-0_8
- Houben A, Saney M, Pickering R (2011) Barley doubled-haploid production by uniparental chromosome elimination. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 104: 321–327. DOI: 10.1007/s11240-010-9856-8
- Humphreys MB (1978) Chromosome instability in *Hordeum vulgare* × *Hordeum bulbosum* hybrids. *Chromosoma* 65: 301–307.
- Humphreys DG, Knox RE (2015) Doubled haploid breeding in cereals. In: Advances in Plant Breeding: Breeding Biotechnology and Molecular Tools. Al-Khayri et al. (eds.) p. 241–288.
- Ignatova SA (2011) Cell biotechnologies in crop production, genetic and breeding: tasks, opportunities, development of in vitro systems. Odessa: Astroprint. 224 p. [In Russian] (Игнатова С.А. Клеточные биотехнологии в растениеводстве, генетике и селекции возделываемых растений: задачи, возможности, разработки систем in vitro: монография. Одесса: Астропринт, 2011. 224 с.).
- Inagaki MN, Mujeeb-Kazi (1995) Comparison of polyhaploid production frequencies in crosses of hexaploid wheat with maize, pearl millet and sorghum. *Breed. Sci.* 45: 157–161.
- Inagaki MN, Nagamine T, Mujeeb-Kazi (1997) Use of pollen storage and detached pollen culture in wheat polyhaploid production through wide crosses. *Cereal Research Com.* 25: 7–13.
- Ishii T, Ueda T, Tanaka H, Tsujimoto H (2010) Chromosome elimination by wide hybridization between *Triticeae* or oat plant and pearl millet: pearl millet chromosome dynamics in hybrid embryo cells. *Chromosome Research* 18: 821–831.
- Jalani BP, Moss JP (1980) The site of action of the crossability genes (Kr1, Kr2) between *Triticum* and *Secale*. 1. Pollen germination, pollen tube growth and number of pollen tubes. *Euphytica* 29: 571–579.
- Jauhar PP, Xu SS, Baenziger PS (2008) Haploidy in cultivated wheats: induction and utility in basic and applied research. *Crop Sci.* 49: 737–755.
- Jensen CJ (1977) Barley monoloids and doubled monoloids. In: Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture. J Reinert, YPS Bajaj (eds.) p. 316–343.
- Jian GU, Kun LIU, Shaoxiang LI et al. (2008) Study of in vitro culture of cut plants in wheat embryo induction by wheat × maize cross. *Front Agric. China* 2 (4): 391–395. DOI: 10.1007/s11703-008-0070-y
- Jin W, Melo JR, Nagaki K et al. (2004) Maize centromeres: organization and functional adaptation in the genetic background of oat. *Plant Cell* 16: 571–581.
- Kasha KJ (2005) Chromosome doubling and recovery of doubled haploid plants. In: Haploids in Crop Improvement. D Palmer, W Keller, K Kasha (eds.) p. 123–152.
- Kasha KJ, Kao KN (1970) High frequency haploid production in barley (*H. vulgare* L.). *Nature* 225: 874–876.
- Kasha KJ, Sadasivaiah RA (1971) Genome relationships between *Hordeum vulgare* L. and *H. bulbosum* L. *Chromosoma* 35: 264–287
- Kishore N, Chaudhary K, Chahota R et al. (2011) Relative efficiency of the maize- and *Imperata cylindrica*-mediated chromosome elimination approaches for induction of haploids of wheat-rye derivatives. *Plant Breed.* 130: 192–194.
- Komeda N, Chaudhary K, Suzuki G, Mukai Y (2007) Cytological evidence for chromosome elimination in wheat × *Imperata cylindrica* hybrids. *Genes Genet. Syst.* 82: 241–248.
- Konzak CF, Randolph LE, Ensen NE (1951) Embryo culture of barley species hybrids, cytological studies of *Hordeum sativum* × *Hordeum bulbosum*. *J. Hered.* 42: 124–134.
- Krzewska M, Czyczylo-Mysza I, Dubas E et al. (2012) Quantitative trait loci associated with androgenic responsiveness in triticale (× *Triticosecale* Wittm.) anther culture. *Plant Cell Rep.* 31: 2099–2108. DOI: 10.1007/s00299-012-1320-2
- Kuckuck H (1934) Artkreuzung by Gerste. Zuchter: Berlin, 6: 270–271.
- Lange W (1971) Crosses between *Hordeum vulgare* L. and *Hordeum bulbosum* L. Production, morphology and meiosis of hybrids, haploids and dihaploids. *Euphytica* 20: 14–29.
- Lantos C, Bona L, Boda K, Pauk J (2014) Comparative analysis of in vitro anther- and isolated microspore culture in hexaploid Triticale (× *Triticosecale* Wittmack) for androgenic parameters. *Euphytica* 197: 27–37. DOI: 10.1007/s10681-013-1031-y

- Laurie DA, Bennet MD (1986) Wheat × maize hybridization. *Can. J. Genet. Cytol.* 28: 313–316.
- Laurie DA, Bennet MD (1988a) The production of haploid wheat plants from wheat × maize crosses. *Theor. Appl. Genet.* 76: 393–397.
- Laurie DA, Bennet MD (1988b) Cytological evidence for fertilization in hexaploid wheat × sorghum crosses. *Plant Breed.* 100: 73–82.
- Laurie DA, Bennet MD (1989) The timing of chromosome elimination in hexaploid wheat × maize crosses. *Genome* 32: 953–961.
- Laurie DA (1989a) Factors affecting fertilization frequency in crosses of *Triticum aestivum* cv. Highbury × *Zea mays* cv. «Seneca 60». *Plant Breed.* 103: 133–140.
- Laurie DA (1989b) The frequency of fertilization in wheat × pearl millet crosses. *Genome* 32: 1063–1067.
- Lei ZS, Zhou Y, He XC et al. (1996) Efficient wheat haploid production by wheat × maize crosses. 5th Int. Wheat Conference. June 10–14: Ankara. Turkey: p. 374.
- Lehmann C, Krolov KD (1991) Experiments on haploid production from tetraploid triticales by the *Hordeum bulbosum* system and anther culture. *Cereal Research Communications* 19: 283–290.
- Linde-Laursen I, von Bothner R (1999) Aberrant meiotic divisions of a *Hordeum lechleri* × *Hordeum vulgare* hybrids. *Hereditas* 118: 145–153.
- Liu D, Xiang H, Xiang L et al. (2014) Distant hybridization: a tool for interspecific manipulation of chromosomes. In: Alien Gene Transfer in Crop Plants. A Pratap, J Kumar (eds.) 1: 25–42. DOI: 10.1007/978-1-4614-8585-8_2
- Lulsdorf M, Ferrie A, Slater SMH, Yuan HY (2014) Methods and role of embryo rescue technique in alien gene transfer. In: Alien Gene Transfer in Crop Plants. A Pratap, J Kumar (eds.) 1: 77–103. DOI: 10.1007/978-1-4614-8585-8_4
- Machezynska J, Orlovska K, Mankowski DR et al. (2014) DNA methylation changes in triticales due to in vitro culture plant regeneration and consecutive reproduction. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 119: 289–299. DOI: 10.1007/s11240-014-0533-1
- Matzk F, Mahn A (1994) Improved techniques for haploid production in wheat using chromosome elimination. *Plant Breed.* 113: 125–129.
- Mochida K, Tsujimoto H, Sasakuma T (2004) Confocal analysis of chromosome behavior in wheat × maize zygotes. *Genome* 47: 199–205.
- Morshedi AR, Darvey NL (1995) High frequency of embryos in wheat × maize crosses. *Sabara J.* 27: 17–22.
- Mukai Y, Okamoto G, Kiryu S et al. (2015) The D-genome plays a critical role in the formation of haploid *Aegilops tauschii* through *Imperata cylindrica* mediated uniparental chromosome elimination. *Nucleus* 58 (3): 199–206.
- Oleszczuk S, Sova S, Jimmy J (2004) Direct embryogenesis and green plant regeneration from isolated microspores of hexaploid triticales (× *Triticosecale* Wittmack) cv. Bogo. *Plant Cell Reports* 22: 885–893.
- Oleszczuk S, Jimmy J, Rabiza-Swider J, Lukaszewski AJ (2011) Aneuploidy among androgenic progeny of hexaploid triticales (× *Triticosecale* Wittmack). *Plant Cell Rep.* 30: 575–586. DOI: 10.1007/s00299-010-0971-0
- Pickering RA (1983) The influence of genotype on doubled haploid barley production. *Euphytica* 32: 863–876.
- Pickering RA, Morgan PW (1985) The influence of temperature on chromosome elimination during embryo development in cross involving *Hordeum spp.*, wheat (*Triticum aestivum* L.) and rye. *Theor. Appl. Genet.* 70: 199–206.
- Pratap A, Sethi GS, Chaudhary HK (2005) Relative efficiency of different Gramineae genera for haploid induction in triticales and triticales × wheat hybrids through the chromosome elimination technique. *Plant Breed.* 124: 147–153.
- Pratap A, Sethi GS, Chaudhary HK (2006) Relative efficiency of anther culture and chromosome elimination techniques for haploid induction in triticales × wheat and triticales × triticales hybrids. *Euphytica* 15: 339–345. DOI: 10.1007/s10681-006-9120-9
- Rather SA (2012) Pollen viability of *Imperata cylindrica* under varied preservation regimes and interactive influence of the diverse genotypes on polyhaploid induction in bread wheat. *Thesis CSK Hp Agricultural University* 120 p.
- Rather SA, Chaudhary HK, Kaila V (2014) Proportional contribution and potential of maternal and paternal genotypes for polyhaploid induction in wheat × *Imperata cylindrica* chromosome elimination approach. *Cereal Res. Com.* 42 (1): 19–26 DOI: 10.1556/CRC 2013.0038
- Rogalska SM, Mikulski W, Guedes Pinto H et al. (1996) Induction of haploid in triticales (× *Triticosecale* Wittm.) by crossing it with maize (*Zea mays* L.). *Triticale: Today and Tomorrow* 5: 379–382.
- Sahijram S, Rao BM (2015) Embryo rescue in crop improvement. In: Plant Biology and Biotechnology. Bahadar et al. (eds.) 2: 363–383. DOI: 10.1007/978-810322-2283-5_18
- Sanie M, Pickering R, Kumke K et al. (2011) Loss of centromeric histone H3 (CENH3) from centromeres precedes uniparental chromosome elimination in interspecific barley hybrids. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 108: 498–505.
- Simpson E, Snape JW, Finch RA (1980) Variation between *Hordeum bulbosum* genotypes in their ability to produce haploids in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Z. Pflanzenzucht.* 85: 205–211.
- Sitch LA, Snape JW, Firman SJ (1985) Intra chromosomal mapping of crossability genes in wheat (*Triticum aestivum*). *Theor Appl Genet.* 70: 309–314
- Snape JW, Simpson E (1980) Crossability of wheat with *Hordeum bulbosum*. *Ann. Rep. Plant Breed. Inst.* 66 p.
- Snape JW, Simpson E, Parker BB (1986) Criteria for the selection and use of doubled haploid systems in plant breeding. In: Genetic Manipulation in Plant Breeding. W Horn et al. (eds.) p. 217–229.
- Sood S, Dwivedi S (2015) Doubled haploid platform: an accelerated breeding approach for crop improvement. In: Plant Biology and Biotechnology. Bahadar et al. (eds.) 2: 89–111. DOI: 10.1007/978-81-322-2283-5_5
- Srivastava P, Singh NB (2018) Acceleration wheat breeding: doubled haploids and rapid generation advance. In: Biotechnologies of Crop Improvement. SS Gosal, SH Wani (eds.) 1: 437–461. DOI: 10.1007/978-3-319-78283-6_3
- Suenaga K, Marschedi AR, Darvey NL (1997) Haploid production of Australian wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars through wheat × maize (*Zea mays* L.) crosses. *Aust. J. Agr. Res.* 48: 1207–1211.
- Surikov IM, Dunaeva SE (1989) Chromosome elimination by distant hybridization in *Poaceae* and its utilization for haploid production. *Biology Bulletin Review* 50 (2): 158–170 [In Russian] (Суриков И.М., Дунаева С.Е. Элиминация хромосом при отдаленной гибридизации в семействе злаков и ее использование для получения гаплоидов // Ж. общ. Биологии. 1989. Т. 50. № 2. С. 158–170).
- Symko S (1969) Haploid barley from crosses of *Hordeum bulbosum* (2x) by *Hordeum vulgare* (2x). *Can. J. Genet. Cytol.* 11: 602–608.
- Tayang T, Chaudhary HK, Kishore N (2012) Enhancing doubled haploid production efficiency in wheat (*Triticum aestivum* L.) by in vivo colchicines manipulation in *Imperata cylindrica* mediated chromosome elimination approach. *Plant Breed.* 131: 263–266.
- Thörn EC (1992) The influence of genotype and environment on seed and embryo development in barley (*Hordeum vulgare* L.) after crossing with *Hordeum bulbosum* L. *Euphytica* 59: 109–118.
- Wedzony M, Marcinska I, Ponitka A et al. (1998) Production of doubled haploids in triticales (× *Triticosecale* Wittm.) by means of crosses with maize (*Zea mays* L.) using picloram and dicamba. *Plant Breed.* 117: 211–215.
- Wedzony M, Góral H, Golemic E (2001) Prospects for breaking genetic barriers in triticales doubled haploid production. *Vortrage fur Pflanzenzuchtung* 16: 34–39.
- Wedzony M, Forster BP, Golemic E et al. (2009) Progress in doubled haploid technology in higher plants. In: Advances in Haploid Production in Higher Plants. A Touraev et al. (eds.) p. 1–31.
- Wedzony M, Zur I, Krzewska M et al. (2015) Doubled haploids in triticales. In: Triticales. F Eudes (ed.) p. 111–128. DOI: 10.1007/978-3-319-22551-7_6
- Weyen J (2009) Barley and wheat doubled haploids in breeding. In: Advances in Haploid Production in Higher Plants. A Touraev et al. (eds.) p. 179–186.
- Zheng XH, Luo MS, Yen C, Yang JI (1992) Chromosome location a new crossability gene in common wheat. *Wheat Inf. Serv.* 25: 36–40.
- Zenkeler M, Nitzsche W (1984) Wide hybridization experiments in cereals. *Theor. Appl. Genet.* 68: 311–315.

Научный рецензируемый журнал

БИОТЕХНОЛОГИЯ И СЕЛЕКЦИЯ РАСТЕНИЙ

Научные редакторы: д.б.н. Анисимова И. Н., д.б.н. Соколова Е. А.

Переводчик: Шувалов С. В.

Корректоры: Анисимова И. Н., Котелкина И. В.

Компьютерная верстка: Чухин Г. К.

Подписано в печать 01.08.2019 Формат бумаги 70×100 ¹/₈

Бумага офсетная. Печать офсетная

Печ. л. 6,5 Тираж 30 экз. Зак. 0209/19

Сектор редакционно-издательской деятельности ВИР
190000, Санкт-Петербург, Большая Морская ул., 42, 44

ИП Юшкевич Г.В.

Санкт-Петербург, Альпийский пер., 45

БИОТЕХНОЛОГИЯ И СЕЛЕКЦИЯ РАСТЕНИЙ

2019, 2 (2)