

**ВНУТРИКАЛЛУСНАЯ И МЕЖКАЛЛУСНАЯ МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ
УДВОЕННЫХ ГАПЛОИДОВ РИСА, ПОЛУЧЕННЫХ В АНДРОГЕНЕЗЕ *in vitro*****М.В. Илюшко**, кандидат биологических наук, **С.С. Гученко**,
М.В. Ромашова, кандидат сельскохозяйственных наукФедеральный научный центр агробιοтехнологий Дальнего Востока имени А.К. Чайки,
692539, Приморский край, п. Тимирязевский, ул. Воложенина, 30
E-mail: ilyushkoiris@mail.ru

*Изучена внутрикаллусная и межкаллусная морфологическая изменчивость удвоенных гаплоидов риса *Oryza sativa* L., полученных в андрогенезе *in vitro* на каллусных линиях с множественной регенерацией. Использовали регенеранты от гибридов второго поколения F₂; Дон 4237×(Зарваси 70×Хейлундзян) – D×3×X, растение №8; Романика×(Дарий 122×Краснодар 9167) – P×D×67, растение №15; Китаец×(ВНИИР 3223×Кензо) – K×23×K, растения №26 и №28. Семенное потомство удвоенных гаплоидов риса первого поколения R₁ высевали на вегетационной площадке в сосудах размером 1,54 м², наполненных полевой почвой. Всего проанализировано 1383 растения 144 линий удвоенных гаплоидов восьми каллусных линий. В результате дисперсионного анализа выявлены статистически значимые различия между удвоенными гаплоидами двух каллусных агрегатов одного пыльника и разных пыльников одного гибрида. Обнаружена корреляционная зависимость (p<0,05) ряда биометрических показателей от высоты растений: длина метелки (r=0,72), масса зерна главной метелки (r=0,80), масса зерна растения (r=0,59), масса 1000 зерен (r=0,74). Таким образом, высокорослые растения оказались более продуктивными, чем низко- и среднерослые. После первичной оценки линий удвоенных гаплоидов по биометрическим показателям объединили семенное потомство наиболее продуктивных растений одной каллусной линии с целью увеличения объема образца и его быстрого размножения. Это позволит скорее перейти от рассмотрения продуктивности отдельных растений к полевой оценке урожайности.*

**INTRACALLUS AND INTERCALLUS MORPHOLOGICAL VARIABILITY
OF RICE DOUBLED HAPLOIDS, GAINED *in vitro* ANDROGENESIS****Ilyushko M.V., Guchenko S.S., Romashova M.V.**Federal Scientific Centre of Agrobiotechnology of the Far East named A.K. Chaika,
692539, Primorskiy kray, p. Timiryasevskiy, ul. Volozhenina, 30
E-mail: ilyushkoiris@mail.ru

*Intracallus and intercallus morphological variability of rice doubled haploids of *Oryza sativa* L., obtained *in vitro* androgenesis on callus lines with multiple regeneration, was studied. Used regenerants gained from hybrids of the second generation F₂, next hybrid combinations: Don 4237×(Szarvasi 70×Heilunjiang) – D×S×X, plant No. 8; Romanika×(Darius 122×Krasnodar 9167) – P×D×67, plant No. 15; Kitaets×(VNIIR 3223×Kenzo) – K×23×K, plants No. 26 and No. 28. The seed progeny of doubled haploids of the first generation R₁ were sown on the vegetation site in vessels of 1.54 m² in size, filled with field soil. A total of 1383 plants were analyzed, 144 lines of doubled haploids of eight callus lines. The analysis of variance revealed statistically significant differences (p<0.05) between doubled haploids of two callus aggregates of same anther and different anthers of one hybrid. A correlation dependence (p<0.05) of biometric indicators on the plant height was found: panicle length (r = 0.72), grain mass of the main panicle (r = 0.80), plant grain mass (r = 0.59), mass of 1000 grains (r = 0.74), i.e. tall plants were more productive than low and medium-sized plants. After an initial assessment of doubled haploid lines by biometric indicators, the seed progeny of the most productive plants of the same callus line were combined to increase the volume of the sample and their rapid reproduction. This will make it possible to move more quickly from considering the productivity of individual plants to a field assessment of yield.*

Ключевые слова: *Oryza sativa* L., удвоенные гаплоиды, внутрикаллусная морфологическая изменчивость, селекционный процесс**Key words:** *Oryza sativa* L., doubled haploids, intracallus morphological variability, plant breeding

Использование удвоенных гаплоидов (doubled-haploids – DH) служит эффективной технологией в селекционном процессе растений [1-3], и рис – одна из первых культур, где она была успешно применена в культуре пыльников *in vitro* [1, 4, 5]. Основные исследовательские работы в этой области на любых сельскохозяйственных культурах, как и прежде, сосредоточены в основном на оптимизации существующих методов получения удвоенных гаплоидов и связаны с изучением условий произрастания растений-доноров, предобработкой пыльников, оптимизацией питательных сред и удвоением хромосом в клетках [1, 2, 5]. Кроме этого множество трудно культивируемых *in vitro* генотипов представляет большой интерес для селекционеров, что требует изучения факторов, детерминирующих андрогенетический успех [6-9]. Некоторые известные лаборатории организовали широкомасштабное производство удвоенных гаплоидов для селекционных целей

[2]. Интерес к DH-технологиям наметился с внедрением маркер-ориентированной селекции (marker assistant selection – MAS), позволившей получить линии удвоенных гаплоидов с целевыми признаками. Например, у риса – линии с генами устойчивости к грибному возбудителю пирикулярноза *Pyricularia grisea* Sacc. [10, 11], резистентные к двум видам патогенов [12], глютинозные [13], у яровых зерновых – формы, устойчивые к грибным болезням [2].

DH-технология и MAS (отдельно и совместно) призваны ускорить селекционный процесс [2, 14]. Однако можно отметить некоторые ограничения для каждой из них. Считается, что гомозиготные линии удвоенных гаплоидов можно получить за 2-3 поколения вместо 6-9 генераций как при привычном отборе гибридных растений [5, 14]. Но даже при большой отзывчивости группы генотипов (например, различные гибридные комбинации одинаковых родителей) у некоторых из них отсут-

Средние значения морфологических признаков внутри каллусной линии, рассчитанные по усредненным значениям линий удвоенных гаплоидов

Гибридное растение	Каллусная линия	Объем выборки	Высота растений, см	Длина метелки, см	Кущение, шт.	Число зерен главной метелки, шт.	Масса зерна главной метелки, г	Масса зерна растения, г	Масса 1000 шт. зерен	Соотношение зерно:солома	Прочность соломины
Д×3×Х(8)	88.2.1	16	87,5	18,1	3,1	85,8	2,4	5,7	27,9	1,28	0,18
	97.1.1	7	85,1	18,9	2,7	89,1	2,4	5,3	28,6	1,56	0,16
	125.1.1	6	74,8	16,6	3,0	93,6	2,5	5,4	25,9	1,35	0,18
	p**	–	0,07	0,17	0,61	0,69	0,97	0,88	0,05	0,22	0,05
Р×Д×67(15)	54.2.1	15	77,0	14,6	1,1	60,3	1,5	3,4	24,9	1,21	0,14
	55.1.1	18	80,2	15,5	0,8	67,5	1,6	4,5	24,6	1,04	0,15
	62.2.2	19	90,1	15,6	0,8	65,3	1,6	4,6	24,5	0,99	0,16
	62.2.4	14	82,3	15,7	1,4	61,2	1,5	4,5	23,8	0,95	0,16
	p*	–	0,02	0,80	0,48	0,08	0,16	0,64	0,29	0,33	0,94
	p**	–	0,000003	0,007	0,002	0,003	0,12	0,002	0,26	0,0002	0,004
К×В×К(26)	80.2.1	16	94,8	16,9	1,5	76,3	2,2	4,7	28,9	1,10	0,16
	80.2.2	12	106,8	20,1	1,7	91,2	2,7	5,7	30,2	1,24	0,16
	p*	–	0,00005	0,00002	0,55	0,004	0,006	0,03	0,03	0,29	0,95
К×В×К(28)	126.1.1	21	93,0	19,3	3,1	60,9	2,2	5,8	32,4	1,91	0,17

Примечание. p* – уровень достоверности различий между удвоенными гаплоидами двух каллусных агрегатов единой каллусной линии по результатам дисперсионного анализа; p** – уровень достоверности различий между удвоенными гаплоидами разных каллусных линий одного гибридного растения по результатам дисперсионного анализа.

ствуется каллусообразование или регенерация [15, 16]. В этом случае используют гибриды второго поколения, которые более отзывчивы на культуру пыльников *in vitro* и обеспечивают больший выход зеленых регенерантов [5, 17]. Для неподдающихся генотипов необходим подбор особых условий культивирования *in vitro* [6-9], что требует дополнительных временных и материальных затрат. Ситуация усугубляется тем, что отдельные гены, ответственные за хозяйственно полезные признаки, негативно влияют на андрогенетический ответ растений [18], а целевые гены MAS часто сцеплены с показателями продуктивности растений и ведут к негативному отбору [19], или отсутствует фенотипическое проявление признаков, по которым вели молекулярно-генетический отбор [12]. После создания исходного материала необходимо оценить агрономически важные признаки полученных линий удвоенных гаплоидов, их урожайность, что занимает еще минимум шесть лет [2].

Потенциал увеличения урожайности за счет создания новых сортов основных сельскохозяйственных культур традиционными методами в основном исчерпан. Поэтому во всем мире стремятся вывести суперсорта и супергибриды, которые преодолели бы барьер повышения продуктивности культур [4]. Для этого уже недостаточно просто гибридизации, создания соматоклональных регенерантов, удвоенных гаплоидов или отобранных по одному признаку с помощью MAS селекционных линий. Современные селекционные схемы усложняются различными комбинациями прежних методик: предложены схема обогатительно-восстано-

вительной селекции (один цикл – 7 лет), основанной на применении дигаплоидных линий, для сбора в гомозиготной линии благоприятных аллелей, отвечающих за гетерозис [20]; пирамидирование генов гибридизацией с применением MAS [14, 21, 22]; закрепление гетерозиса гибридов комбинацией ДН-технологии и молекулярно-генетического сопровождения (6 лет) [4]; насыщение гермоплазмы лучших сортов целевыми генами с молекулярно-генетическим контролем (10 лет) [23]. Эти методы работы, безусловно, результативны, но при этом еще больше возрастает срок создания новых сортов.

Интенсификация селекционного процесса необходима не только на этапе создания исходного материала, но и на последующих этапах оценки и размножения. Для быстрого, точного и массового описания растений разработано автоматическое фенотипирование растений [14]. Ускорить размножение возможно формированием популяции растений с одинаковой комбинацией целевых генов (10-35 линий) [22], то есть проведением массового отбора. Среди линий удвоенных гаплоидов принято проводить индивидуальный отбор [4, 15, 24]. Считается, что для эффективного отбора достаточно 100-150 линий одного образца [Zongxiu, Chengzhang, 1992, по: 5]. В этом случае не обсуждается вопрос принадлежности линий удвоенных гаплоидов одному пыльнику или разным пыльникам или микроспорам. Между тем на одной каллусной линии, полученной с одного пыльника, может образоваться более сотни удвоенных гаплоидов [25], многие из которых морфо-

растений (при $p=0,02$); у гибрида $K \times 23 \times K(26)$ по шести признакам между каллусами 80.2.1 и 80.2.2 при $p < 0,03$ (таблица). Вероятно, каллусные агрегаты одного пыльника развились из разных пыльцевых зерен, что выразилось в различиях удвоенных гаплоидов одного пыльника. Далее разные каллусные агрегаты рассматривали как различные пыльники одного гибридного растения.

Анализ различий между удвоенными гаплоидами разных пыльников показал достоверные различия по дисперсиям у двух представленных гибридов (таблица): по двум признакам у растений $D \times 3 \times X(8)$ при $p=0,05$ и по семи признакам у растений $P \times D \times 67(15)$ при $p < 0,007$. Удвоенные гаплоиды разных пыльников и различных каллусных агрегатов гетерогенны и не могут быть объединены в один образец без предварительного анализа биометрических показателей.

Сравнили внутрикаллусный и межкаллусный уровень изменчивости (С) удвоенных гаплоидов двух гибридных растений $D \times 3 \times X(8)$ и $P \times D \times 67(15)$. Во многих случаях внутрикаллусный коэффициент вариации превышал межкаллусный или оставался таким же (рисунки). Это означает, что существует внутрикаллусная дифференциация удвоенных гаплоидов, поэтому целесообразно вести индивидуальный отбор регенерантов первого поколения.

Выявлена корреляционная зависимость ($p < 0,05$) ряда биометрических показателей от высоты растений: длина метелки ($r=0,72$), масса зерна главной метелки ($r=0,80$), масса зерна растения ($r=0,59$), масса 1000 зерен ($r=0,74$). Таким образом, высокорослые растения в нашем эксперименте оказались более продуктивными, чем низко- и среднерослые. Все эти удвоенные гаплоиды были получены с гибридных растений одной комбинации $K \times 23 \times K$. В отечественной литературе среди специалистов по зерновым культурам продолжается обсуждение актуальности генов зеленой революции (гены полукарликовости), которые позволили с середины 60-х годов на очень высоком минеральном питании значительно повысить урожайность пшеницы и риса за счет отсутствия полегаемости [27-29]. Между тем, китайскими и японскими учеными выявлены природные источники с генами *IPM1* [30] и *SCM2* [31, 32], которые ответственны за толстую прочную соломинку риса. Это высокорослые, устойчивые к полеганию растения, которые при значительных дозах удобрений обладают более высокой зерновой продуктивностью, чем полукарликовые формы. Отдельные селекционные линии рассматривают как перспективные, и некоторые их недостатки пытаются откорректировать с помощью методов геномного редактирования [33]. Вероятно, можно говорить о наметившейся смене парадигмы в селекции риса на такие показатели как высота растений и устойчивость к полеганию.

Для дальнейшей селекционной работы мы выделили линии удвоенных гаплоидов с высокими значениями продуктивности растения, индекса прочности соломины и массой 1000 зерен 30,0 г и более: с каллусной линии 88.2.1 – семенное потомство двух растений (75 г, $I_c=0,16$), линии 97.1.1 – потомство одного растения (60 г, $I_c=0,18$) – гибридное растение $D \times 3 \times X(8)$; удвоенные гаплоиды гибридного растения $P \times D \times 67(15)$ сформировали мелкие семена – около 25 г, поэтому отбракованы; с каллусного агрегата 80.2.1 – семенное потомство пяти растений и с каллусного агрегата 80.2.2 – четырех растений, объединенных в два отдельных селекционных образца (246 г, $I_c=0,17$ и 256 г, $I_c=0,17$ соответственно) – гибридное растение $K \times 23 \times K(26)$.

Самый большой образец из девяти растений отобран с каллусной линии 126.1.1 (531 г, $I_c=0,17$) – гибридное растение $K \times 23 \times K(28)$. Ранее аналогичный анализ мы провели с применением молекулярных маркеров [11]. Семена удвоенных гаплоидов одной каллусной линии с идентифицированными генами устойчивости риса к пирикулярриозу *Pi-ta2*, после предварительной морфологической оценки были объединены и переданы для полевых испытаний.

Таким образом, считаем возможным после первичной оценки линий удвоенных гаплоидов по биометрическим показателям объединение семенного потомства наиболее продуктивных растений одной каллусной линии с целью увеличения объема образца и его быстрого размножения. Это позволит скорее перейти от рассмотрения продуктивности отдельных растений к полевой оценке урожайности.

Литература.

1. Mishra R., Rao G.J.N. *In-vitro androgenesis in rice: advantages, constraints and future prospects // Rice Science.* – 2016. – V. 23. – № 2. – P. 57-68.
2. Dwivedi S., Britt A., Tripathi L., Sharma S., Upadhyaya H.D., Ortiz R. *Haploids: constraints and opportunities in plant breeding.* – 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.07.001>.
3. Germana M. *Anther culture for haploid and doubled haploid production // Plant Cell Tiss. Organ. Cult.* – 2011. – V. 104. – P. 283-300.
4. Гончарова Ю.К., Харитонов Е.М. *Генетические основы повышения продуктивности риса.* – Краснодар: ФГБНУ ВНИИ риса, Просвещение-Юг, 2015. – 314 с.
5. Sarao N.K., Gosal S.S. *In vitro androgenesis for accelerated breeding in rice // Biotechnologies of crop improvement / S.S. Gosal, S.H. Wani (eds.). – Springer International Publishing AG, Switzerland, 2018. – V. 1. – P. 407-435.*
6. Tripathy S.K., Swain D., Mohapatra P.M., Prusti A.P., Sahoo B., Panda S., Dash M., Chakma B., Behera S.K. *Exploring factors affecting anther culture in rice (Oryza sativa L.) // Journal of Applied Biology and Biotechnology.* – 2019. – V. 7. – № 2. – P. 87-92.
7. Maharani A., Fanata W.I.D., Laeli F.N.L., Kim K.-M., Handoyo T. *Callus induction and regeneration from anther cultures of Indonesian indica black rice culture // J. Crop. Sci. Biotech.* – 2020. – V. 23. – № 1. – P. 21-28.
8. Esteves P., Belzile F. *TDZ in cereal gametic embryogenesis // Thidiazuron: from urea deviation to plant growth regulator / N. Ahmad, M. Faisal (eds.). – Springer Nature Singapore Pte Ltd., 2018. – P. 160-174.*
9. Гончарова Ю.К., Харитонов Е.М., Бушман Н.Ю., Верецагина С.А. *Сравнительный анализ эффективности питательных сред для индукции каллусообразования у гибридов риса // Доклады Российской академии сельскохозяйственных наук.* – 2013. – № 6. – С. 6-9.
10. Windarsih G., Utami D.W., Widyastuti U. *Molecular markers application for blast resistance selection on the double haploid rice population // Makara J. Sci.* – 2014. – V. 18. – № 2. – P. 31-41.
11. Илюшко М.В., Ромашова М. В., Zhang J.-M., Deng L.-W., Liu D.-J., Zhang R., Гученко С.С. *Внутрикаллусная изменчивость удвоенных гаплоидов риса, полученных в андрогенезе in vitro // Сельскохозяйственная биология.* – 2020. – Т. 55. – № 3. – С. 533-543.
12. Yi G., Lee H.-S., Kim K.-M. *Improved marker-assisted*

- selection efficiency of multi-resistance in doubled haploid rice plants // *Euphytica*. – 2015. – V. 203. – P. 421-428.
13. Сартбаева И.А., Усенбеков Б.Н., Рысбекова А.Б., Мухина Ж.М., Казкеев Д.Т., Жамбакин К.Ж., Жанбырбаев Е.А., Беркимбай Х.А., Ахметова Д.Ш., Мелдебекова А.А. Получение дигаплоидных линий для селекции глютинозного риса // *Биотехнология*. – 2018. – Т. 34. – № 2. – С. 26-36.
 14. Колчанов Н.А., Кочетова А.В., Салина Е.А., Першина Л.А., Хлесткина Е.К., Шумный В.К. Состояние и перспективы использования маркер-ориентированной и геномной селекции растений // *Вестник Российской академии наук*. – 2017. – Т. 87. – № 4. – С. 348-354.
 15. Гончарова Ю.К. Использование метода культуры пыльников в селекции риса. – Краснодар: ВНИИ риса, 2012. – 91 с.
 16. Илюшко М.В., Ромашова М.В. Создание регенерантных линий методом культуры пыльников *in vitro* для селекции риса на российском Дальнем Востоке // *Дальневосточный аграрный вестник*. – 2017. – № 4(44). – С. 37-45.
 17. Bishnoi U.S., Jain R.K., Gupta K.R., Chowdhury V.K., Chowdhury J.B. High frequency androgenesis in indica × Basmati rice hybrids using liquid culture media // *Plant Cell Tiss. Organ. Cult.* – 2000. – Vol. 61. – P. 153-159.
 18. Сибикеева Ю.Е., Сибикеев С.Н. Влияние комбинаций чужеродных транслокаций на андрогенез *in vitro* у почти изогенных линий яровой мягкой пшеницы // *Генетика*. – 2014. – Т. 50. – № 7. – С. 831-839.
 19. Костылев П.И., Кудашкина Е.Б., Краснова Е.В., Возжжова Н.Н. Селекция риса на солеустойчивость // *Зерновое хозяйство России*. – 2019. – № 1. – С. 22-27.
 20. Михайлов М.Э. О новой возможности использования дигаплоидных линий: схема обогатительно-восстановительной селекции // *Генетика*. – 2010. – Т. 46. – № 6. – С. 853-860.
 21. Orasen G., Greco R., Puja E., Pozzi C. Blast resistance R genes pyramiding in temperate japonica rice // *Euphytica*. – 2010. – V. 216. – P. 40-49.
 22. Wu Y., Xiao N., Chen Y., Yu L., Pan C., Li Y., Zhang X., Huang N., Ji H., Dai Z., Chen X., Li A. Comprehensive evaluation of resistance effects of pyramiding lines with different broad-spectrum resistance genes against *Magnaporthe oryzae* in rice (*Oryza sativa* L.) // *Rice*. – 2019. – V. 12. – P. 11-24.
 23. Satoh T., Tezuka K., Kawamoto T., Matsumoto S., Satoh-Nagasawa N., Ueda K., Sakurai K., Watanabe A., Takahashi H., Akagi H. Identification of QTLs controlling low-temperature germination of the East European rice (*Oryza sativa* L.) variety Maratteli // *Euphytica*. – 2016. – V. 207. – P. 245-254.
 24. Гученко С.С. Оценка дигаплоидных линий риса первого и второго поколений по хозяйственно ценным признакам // *Аграрная Россия*. – 2018. – № 5. – С. 18-21.
 25. Илюшко М.В. Регенерационный максимум в андрогенных каллусных линиях риса *Oryza sativa* L. *in vitro* // *Рисоводство*. – 2019. – № 2. – С. 29-32.
 26. Ilyushko M.V., Romashova M.V. Formation of rice tetraploids in *in vitro* androgenesis // *Russian Agricultural Sciences*. – 2020. – V. 46. – № 4. – P. 332-336.
 27. Крупрейшвили Н.Т., Возжжова Н.Н., Марченко Д.М., Ионова Е.В. Выявление гена короткостебельности *Rht-b1* в образцах озимой мягкой пшеницы // *Зерновое хозяйство России*. – 2019. – № 6 (66). – С. 55-59.
 28. Костылев П.И., Краснова Е.В., Аксенова А.В. Наследование ряда количественных признаков у гибридов риса Карлик1×LK // *Зерновое хозяйство России*. – 2018. – № 3 (57). – С. 43-47.
 29. Nagano H., Onishi K., Ogasawara M., Horiuchi Y., Sano Y. Genealogy of the «Green revolution» gene in rice // *Genes Genet. Syst.* – 2005. – V. 80. – P. 351-356.
 30. Jiao Y., Wang Y., Xue D., Wang J., Yan M., Liu G., Dong G., Zeng D., Lu Z., Zhu X., Qian Q., Li J. Regulation of *OsSPL14* by *OsmiR156* defines ideal plant architecture in rice // *Natural Genetics*. – 2010. – V. 42. – № 6. – P. 541-545.
 31. Ookawa T., Hobo T., Yano M., Murata K., Ando T., Miura H., Asano K., Ochiai Y., Ikeda M., Nishitani R., Ebitani T., Ozaki H., Angeles E., Hirasawa T., Matsuoka M. New approach for rice improvement using a pleiotropic QTL gene for lodging resistance and yield // *Nature communications*. – 2010. – Doi:10.1038/ncomms1132.
 32. Merugumala G.R., Satyanarayana P.V., Narne C., Ravikumar B., Rao R., Pavani L., Deepika V. Molecular breeding of «Swarna», a mega rice variety for lodging resistance // *Mol. Breeding*. – 2019. – V. 39. – P. 55-69.
 33. Короткова А.М., Герасимова С.В., Шумный В.К., Хлесткина Е.К. Гены сельскохозяйственных растений, модифицированные с помощью системы CRISPR/Cas // *Вавиловский журнал генетики и селекции*. – 2017. – Т. 21. – № 2. – С. 250-258.

Поступила в редакцию 22.08.20
Принята к публикации 20.09.20