

Чистые линии озимой твердой пшеницы: спидбридинг или удвоенные гаплоиды?

Д.О. Бизякина^{1*}, В.С. Рубец¹, С. Радзениец¹, В.М. Нагамова¹, А.О. Блинков¹, А.С. Яновский², М.Г. Дивашук¹

¹ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, Москва, Россия

² Национальный центр зерна им. П.П. Лукьяненко, Краснодар, Россия

* dasha.biz@mail.ru

Цель: сравнить эффективность пяти методов получения чистых линий: 1. спидбридинг (speed breeding); 2. селективная элиминация хромосом; 3. метод изолированных пыльников; 4. метод изолированных завязей; 5. флотирующая культура пыльников.

Материалы и методы: В исследовании использовали три генотипа озимой твердой пшеницы (*Triticum durum* Desf): Цель, Кордон, 3596h56 селекции НЦЗ им. П.П. Лукьяненко. Используемые генотипы являлись гибридами поздних поколений.

В работе были использованы пять различных методов получения чистых линий:

- 1) Спидбридинг (яровизация при фотопериоде 10 ч день / 14 ч ночь, 5 °С, вегетация при 22 ч день / 2 ч ночь, температура 22 °С днем / 17 °С ночью, удаление побегов кушения и использование эмбриокультуры).
- 2) Селективная элиминация хромосом (опыление пшеницы гаплопродюссером, введение зародышей в культуру *in vitro* на 18 сутки с момента опыления, выращивание зародышей на питательной среде MS с добавлением 0,5 мг/л НУК и 0,5 мг/л кинетина);
- 3) Изолированные пыльники (стрессовая предобработка колосьев 14 суток при 4 °С, культивирование на среде МС-17, дополненной 2 мг/л 2,4-Д и 0,5 мг/л кинетина; в каждую чашку помимо пыльников добавляли 6–7 завязей);
- 4) Изолированные завязи (стрессовая предобработка колосьев 14 суток при 4 °С, культивирование на питательной среде Ind M);
- 5) Флотирующая культура (стрессовая предобработка при 4 °С в течение 7 суток с использованием 0,1 М маннитола, культивирование на питательной среде МС-17 с добавлением 100 г/л фикола, 1 мг/л 2,4 Д и 1 мг/л 6-БАП и 3 завязей на одну чашку Петри, регенерация на питательной среде 190-2 с добавлением 30 г/л сахарозы, 0,5 мг/л НУК и 0,5 мг/л кинетина).

Результаты: Среди протестированных методов получения чистых линий наименьшей эффективностью отличался метод изолированных завязей, при использовании которого не было получено ни одного растения. Сравнимую эффективность продемонстрировал метод культивирования изолированных пыльников: суммарно по генотипам на твердые питательные среды было высажено 6350 пыльников, из которых было получено 103 каллуса, давшие начало одному растению – альбиносу. Флотирующая культура оказалась эффективнее культур изолированных пыльников и завязей: суммарно по трем генотипам было высажено 9250 пыльников, из которых получены 754 каллуса, давших начало 126 альбиносам и 2 зеленым гаплоидным растениям генотипа 3596h56. Такие проблемы, как высокая генотипзависимость и низкая частота формирования зеленых растений также описаны и другими авторами для данной культуры. Наибольшую эффективность среди методов клеточной биотехнологии продемонстрировал метод селективной элиминации хромосом. После опыления 1000 цветков удалось получить 400 зерновок, среди которых только 40 имели хорошо сформировавшиеся зародыши. В конечном счете были получены 11 растений генотипа Цель и одно растение генотипа 3596h56. Все формирующиеся растения являлись гаплоидными. Регенерация альбинозных растений отсутствовала. Продолжительность создания зеленых гаплоидных растений при использовании флотирующей культуры или селективной элиминации хромосом (от посева донорных растений до уборки семян от самоопыления удвоенных гаплоидов) составляла примерно один год.

При использовании спидбридинга полная вегетация от посева до уборки на одно поколение составляла от 91 до 121 дня в зависимости от генотипа. Это позволяет получать в год от 3 до 4 поколений озимой твердой пшеницы. Для достижения генетической однородности необходимо проводить шесть последовательных посевов, используя односемянный метод отбора. То есть за 2 года, используя спидбридинг, возможно создавать спектр чистых линий озимой твердой пшеницы.

Выводы: Среди пяти протестированных методов для твердой пшеницы наибольшую эффективность по возможному количеству создаваемых чистых линий имеет спидбридинг. С его помощью чистые линии можно создавать за 2 года. Флотирующая культура пыльников и селективная элиминация хромосом позволяют получать единичные зеленые растения за один год. Культура изолированных пыльников и культура изолированных завязей для твердой пшеницы являются крайне неэффективными.

Финансирование: Исследование поддержано Российским научным фондом № 24-16-00274, <https://rscf.ru/project/24-16-00274/>.