

## ГЕТЕРОЗИГОТНЫЙ УДВОЕННЫЙ ГАПЛОИД РИСА *ORYZA SATIVA* L., ПОЛУЧЕННЫЙ В АНДРОГЕНЕЗЕ *IN VITRO*

**Илюшко Марина Владиславовна**, канд. биол. н., вед. научн. сотр. лаборатории сельскохозяйственной биотехнологии, ФГБНУ «ФНЦ агrobiотехнологий Дальнего Востока им. А.К. Чайки», e-mail: ilyushkoiris@mail.ru

**Ромашова Марина Викторовна**, канд. с.-х. н., ст. научн. сотр. лаборатории сельскохозяйственной биотехнологии, ФГБНУ «ФНЦ агrobiотехнологий Дальнего Востока им. А.К. Чайки», e-mail: romashova\_1969@mail.ru

**Аннотация:** Проведен молекулярно-генетический анализ гена *Pi-b* андрогенных удвоенных гаплоидов  $DH_0$  риса *Oryza sativa* L. Из 372 растений одно оказалось гетерозиготным. В семенном потомстве (11 удвоенных гаплоидов  $DH_1$ ) выявлен исключительно аллель устойчивости гена *Pi-b*. Обсуждается причина возникновения ложной гетерозиготности. По аналогии с миксоплоидией, предлагается объяснение явлением миксогении соматических тканей.

**Ключевые слова:** андрогенез *in vitro*, удвоенные гаплоиды, гетерозиготность, миксогения, *Oryza sativa*

**Введение.** Основная идея гаплоидной селекции состоит в создании гомозиготных константных по признакам удвоенных гаплоидов (DHs). Андрогенез *in vitro* – ведущий метод массового получения DHs у множества видов культурных растений [1]. Встречаются расщепляющиеся продуктивные регенеранты, полученные в андрогенезе *in vitro*, что подтверждается тестированием морфологических признаков и с помощью молекулярно-генетических маркеров. Считается, что в этом случае в культуре *in vitro* участвовали стенки пыльника. Однако у риса *Oryza sativa* L. убедительно доказана инициация каллусообразования исключительно микроспорами. Стенки пыльника остаются безучастными [2]. Таким образом, теоретически удвоенные гаплоиды риса могут быть только гомозиготными.

В ходе маркер-ориентированной селекции на наличие генов устойчивости к пирикуляриозу, выявлен андрогенный удвоенный гаплоид с аллелем устойчивости и аллелем восприимчивости гена *Pi-b* в тканях листа.

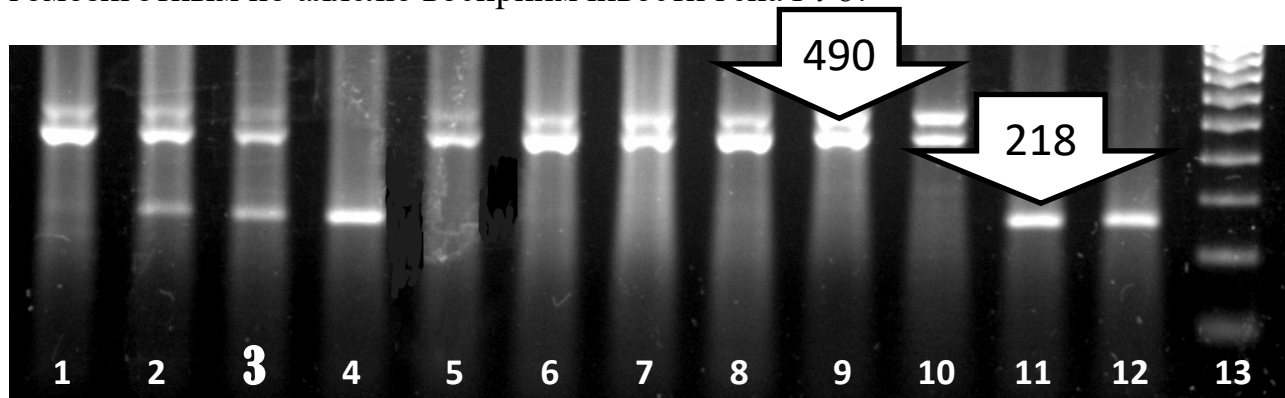
**Цель.** Оценить расщепление потомства андрогенного гетерозиготного удвоенного гаплоида риса *O. sativa* по гену *Pi-b* с помощью молекулярного маркера.

**Материалы и методы.** Удвоенные гаплоиды получены в культуре пыльников *in vitro* гибрида риса F<sub>1</sub> Рассвет × Оху 2х. Методика идентификации гена *Pi-b* приводится в работе [3]. Для молекулярно-генетического анализа гибрида и  $DH_0$  использовали листья созревающих растений. Семена

гетерозиготного удвоенного гаплоида  $DH_1$  каллусной линии №130 и гомозиготного  $DH_1$  каллусной линии №152 (контроль) выращивали в горшечной культуре до образования 3-4 листьев.

**Результаты и их обсуждение.** В культуре пыльников образовалась 21 каллусная линия (числу пыльников соответствует число каллусных линий). На одной каллусной линии сформировалось от 3 до 64 шт. удвоенных гаплоидов. На девяти линиях идентифицированы  $DHs$  только с аллелем восприимчивости гена *Pi-b*, на семи – только с аллелем устойчивости, на пяти каллусных линиях образовались оба типа удвоенных гаплоидов в различных пропорциях. Всего проанализировано 372 шт.  $DHs$ .

На полиморфной каллусной линии №130 выявлен гетерозиготный удвоенный гаплоид (рисунок). Анализ семенного потомства гетерозиготного растения  $DH_0$  подтвердил наличие исключительно аллеля устойчивости у 11 удвоенных гаплоидов  $DH_1$ . Потомство  $DH_0$  линии №152 осталось гомозиготным по аллелю восприимчивости гена *Pi-b*.



**Рисунок.** Электрофоретическое разделение ПЦР-продуктов, полученных при выявлении гена устойчивости к пирикулярриозу *Pi-b* в растениях риса *Oryza sativa* L.: 1 – сорт Оху 2х, 2 – гибрид  $F_1$  Рассвет×Окси 2х, 3, 5-7 – удвоенные гаплоиды  $DH_0$  каллусной линии №130, 4 – удвоенный гаплоид  $DH_0$  каллусной линии №152, 8-10 – удвоенные гаплоиды  $DH_1$  каллусной линии №130, 11-12 – удвоенные гаплоиды  $DH_1$  каллусной линии №152, 13 – маркер молекулярной массы, 218 п.н. – аллель устойчивости, 490 п.н. – аллель восприимчивости.

Figure. Electrophoretic identification of amplicons characteristic of blast resistance gene *Pi-b* in rice (*Oryza sativa* L.) plants: 1 – variety Oxy 2x, 2 – hybrid  $F_1$  Rassvet x Oxy 2x, 3, 5-7 –  $DH_0$  on callus line N130, 4 –  $DH_0$  on callus line N152, 8-10 –  $DH_1$  on callus line N130, 11-12 –  $DH_1$  on callus line N152, 13 – molecular-weight size marker. 218 bp – susceptibility allele of blast resistance genes, 490 bp – resistance allele.

Анализ потомства гетерозиготного  $DH_0$  позволил заключить, что оба аллеля одновременно встречаются только в соматических тканях растения. В формировании генеративных органов растения участвовали клетки с аллелем устойчивости к пирикулярриозу. Таким образом, обнаруженный в андрогенезе *in vitro* продуктивный регенерант риса с обеими аллелями гена *Pi-b* можно назвать лишь условно «гетерозиготным».

Причина появления такого растения, вероятно, лежит в мозаичности клеток соматических тканей растений, культивируемых *in vitro*. В андрогенезе *in vitro* риса такое явление так же встречается и проявляется в частности, как и

у других видов, в миксоплоидии [4]. Данное исследование подтвердило наличие клеток разного типа в листьях удвоенных гаплоидов не только с разным числом хромосом, но и генотипически различных.

Природа формирования регенерантов в андрогенезе *in vitro* остается дискуссионной. Морфолого-гистологический подход изучения морфогенных структур в культуре *in vitro* пыльников пшеницы позволил заключить, что развитие эмбриоидов происходит из отдельных групп клеток каллуса [5]. Поскольку каллусная линия может образоваться микроспорами с разными аллелями гена, то и отдельная группа клеток в некоторых случаях гетерогенна. Выявленную «гетерозиготность» в тканях листа удвоенного гаплоида рассматриваем как миксогенную по аналогии с миксоплоидией. Надо признать, что клетки разного уровня пloidности, вероятно, могут обладать одинаковым генотипом. Пройдя митотические деления из одной микроспоры и оказавшись на разных стадиях увеличения числа хромосом в каллусе, образовать миксоплоидный регенерант. В случае ложной гетерозиготности происходит инициация каллуса из двух или более микроспор. Эмбриогенная отдельная группа клеток результируется в «гетерозиготный» удвоенный гаплоид  $DH_0$ . Частота внутрикаллусного полиморфизма у риса составляет 26%, поэтому доля миксогенных регенерантов низкая (один из 372 шт.).

**Заключение.** В результате анализа растений риса *O. sativa* в андрогенезе *in vitro*, выявлен удвоенный гаплоид с ложной гетерозиготностью по гену устойчивости к пирикуляриозу *Pi-b* в тканях листьев. Потомство такого растения оказалось полностью гомозиготным по аллелю устойчивости данного гена. Таким образом, можно заключить о существовании миксогенности соматических тканей андрогенных удвоенных гаплоидов.

#### Библиографический список

1. Niazian M., Shariatpanahi M.E. In vitro-based doubled haploid production: recent improvements // *Euphytica*. – 2020. – Vol. 216. Doi: 10.1007/s10681-020-02609-7.
2. Савенко Е.Г., Власов В.Г., Мухина Ж.М., Глазырина В.А., Шундрин Л.А. Определение инициальных клеток пыльника риса в культуре *in vitro* с использованием цито-гистологических методов / Современные решения в развитии сельскохозяйственной науки и производства. Мат. саммита мол. ученых (26-30 июня), 2016. – 172-175 с.
3. Dubina E.V., Kostylev P.I., Garkusha S.V., Ruban M.G. Development of blast-resistant rice varieties based on application of DNA technologies // *Euphytica*. – 2020. – Vol. 216. Doi: 10.1007/s10681-020-02698-4.
4. Илюшко М.В., Скапцов М.В., Ромашова М.В. Содержание ядерной ДНК у регенерантов риса (*Oryza sativa* L.), полученных в культуре пыльников *in vitro* // С.-х. биология. – 2018. – Т. 53, № 3. – С. 531-538. Doi: 10.15389/agrobiology.2018.3.531eng.
5. Сельдимирова О.А., Титова Г.Е., Круглова Н.Н. Комплексный морфолого-гистологический подход к изучению морфогенных структур в культуре *in vitro* пыльников пшеницы // Известия РАН. Серия биологическая. – 2016. – Т. 2. – С. 155-161. Doi: 10.7868/S0002332916020089

## ***HETEROZYGOUS ORYZA SATIVA L. DOUBLED HAPLOID GENERATED THROUGH IN VITRO ANDROGENESIS***

***Ilyushko M.V., PhD in Biology, Romashova M.V., PhD in Agricultural Sciences***  
Chaika Federal Research Center of Agricultural Biotechnology of the Far East  
692539, Russia, Ussuriysk, Timiryazevskii stl., Vologenina str., 30

***Abstract:*** In the course of marker-assisted selection for the blast resistance gene *Pi-b*, among 372 rice *Oryza sativa* L. doubled haploids DH<sub>0</sub> heterozygous plant was identified. In the offspring (11 doubled haploids DH<sub>1</sub>), only *Pi-b* resistance allele was revealed. The reason for the appearance of false heterozygosity is discussed. By analogy with mixoploidy, an explanation is proposed for the phenomenon of somatic tissues mixogeny.

***Key words:*** androgenesis *in vitro*, heterozygous doubled haploid, *Oryza sativa* L., homozygous offspring, mixogeny