

УДК:633 // 324: 578.0

¹К.Р. Уразалиев, ²Х.М. Орсини, ¹А.М. Абекова, ¹Т.А. Базылова, ¹А.К. Даниярова¹Казахский научно-исследовательский институт земледелия и растениеводства, Казахстан, п. Алмалыбак²Saaten-Union Biotec GmbH, Germany, Hovedisser S

E-mail: kairatu@mail.ru

Ускорение селекции пшеницы с использованием дигаплоидов, полученных методом культуры микроспор

В результате цитологического контроля было установлено, что на основе морфологических наблюдений одноядерная стадия развития микроспор соответствует фазе, когда влагалище второго листа от флагового находится посередине колоса (пыльник темно-зеленого цвета). Лучший вариант стерилизации № 8, который обеспечивал наиболее высокий процент чистых микроспор – 4,8% в чашке Петри. Наиболее оптимальной для культивирования микроспор озимой пшеницы является жидкая среда W14 mf с добавлением фикола и мальтозы. Совместно в лабораториях биотехнологии Saaten Union Biotec Германии и Казахстане получено 1325 растений-регенерантов, из них 1153 зеленых растений 5 сортов озимой пшеницы в лаборатории биотехнологии Saaten Union Biotec и 172 растений в лаборатории биотехнологии КазНИИЗР

Ключевые слова: гаплоидная технология, культура изолированных микроспор, озимая пшеница, питательная среда.

К.Р.Уразалиев, Х.М. Орсини, А.М. Абекова, Т.А. Базылова, А.К. Даниярова

Микроспора культуралары әдісімен алынған дигаплоидтарды пайдаланып бидай селекциясын жылдамдату

Бірінші жапырақтан екінші жапырақтың қынапы масақтың ортасында болған кезде (тозаң қою жасыл түсті), морфологиялық бақылау негізінде микроспораның бір ядролы даму кезеңіне сәйкес келетіні цитологиялық бақылау нәтижесінде анықталды. Залалсыздандырудың ең тиімді әдісін №8, 4,8% таза микроспорамен қамтамасыз етті. Күздік бидай микроспораларын өсірудің ең тиімді әдісін W14 өзгертілген сұйық қоректік ортасына фикол мен мальтозаны қосқанда көрсетті. Германиядағы Saaten Union Biotec биотехнология зертханасы мен Қазақстан бірігіп 1325 регенерант өсімдік алынды, соның ішінде күздік бидайдың 5 сортынан 1153 жасыл өсімдік Saaten Union Biotec биотехнология зертханасында және 172 өсімдік ҚазЕжәнеӨШҒЗИ биотехнология зертханасында алынды.

Түйін сөздер: гапллоидты технология, микроспораның оқшауланған мәдениеті, күздік бидай, қоректік орта.

K.R.Urazaliev, J.M. Orsini, A.M. Abekova, T.A. Bazylova, A.K. Daniayrova

Creating dihaploids winter wheat microspore culture method

As a result of cytological monitoring it was found that on the basis of morphological observations mononuclear microspore developmental stage corresponds to the phase when the second leaf sheath be in the middle ear (anther dark green). The best option sterilization number 8, which provided the highest percentage of net microspores - 4.8% in the petri dish. The most optimal for the cultivation of winter wheat microspore is liquid W14 mf medium with the addition of Ficoll and maltose. Together in biotechnology laboratories Saaten Union Biotec Germany and Kazakhstan produced 1,325 regenerated plants, of which 1,153 green plants are 5 varieties of winter wheat in the laboratory of biotechnology Saaten Union Biotec and 172 plants in the laboratory of biotechnology KazNIIZR.

Keywords: haploid technology, isolated microspore culture, winter wheat, culture medium

Нами были использованы 5 сортов озимой пшеницы для применения культуры пыльников и микроспор. Донорные растения собирали в мае 2013 года, когда пыльники находились в начальной и средней одноядерной стадии микроспор. Тридцать-сорок донорных растений каждого генотипа собирали и помещали в колбу Эрленмейера, содержащую 200 мл водопроводной воды. Собранные растения были покрыты полиэтиленовыми пакетами для предотвращения побегов от высыхания. Донорные растения прошли предварительную холодовую обработку в течение 10-14 дней при 2-4°C [1]. Затем применялись 10 типов стерилизации: 1) спирт 70% - 7 минут + 3 раза по 3 мин. H₂O (авток.); 2) протираем колосья в листовой обертке 90% спиртом; 3) 70% спирт 5 мин.+ 30гр/л хлорка - 5 мин.+1 гр/л (нистатина + 0,5 гр/л цефазолина - 5 мин. + 3-кратная промывка стерильной водой по 3 мин.; 4) Хлорная известь 15,0% - 5 мин + 3-х кратная промывка H₂O (авток.) по 3 мин.; 5) хлорная известь (0,2%) + 50 мл. H₂O (авток.) + 1 капля TWIN – 30 мин; промывка 3 раза по 3 мин. H₂O (авток.); 6) хлорка 30 гр/л. + 1 гр нистатина + 0,5 гр/л цефазолина – 10 мин.; + 3-кратная промывка H₂O (авток.) по 3 мин.; 7) сулема 2% на 3 мин. + промывка H₂O (авток.) 3 раза по 3 мин.; 8) нистатин (1гр/0,5л) + цефазолин (0,5гр/ 0,5л) - 5 минут + 70% спирт - 7 минут + 3 раза промывали по 3 мин. H₂O (авток.); 9) нистатин 1гр/л + 0,5 гр/л цефазолин - 10 мин; промывка 2 раза H₂O (авток.); + сулема 2% - 4 мин. Промывка 3 раза по 3 мин H₂O (авток.); 10) колоски стерилизуют в 300 мл 2% раствор NaOCl с каплей Твин-80 в течение 20 минут на шейкере, а затем трижды промывают стерильной дистиллированной водой в ламинар-боксе [2] (рисунок 1).

Процент заражения варьировал от 4,8 до 69,6. Самым лучшим вариантом стерилизации был № 8, который обеспечивал наиболее высо-

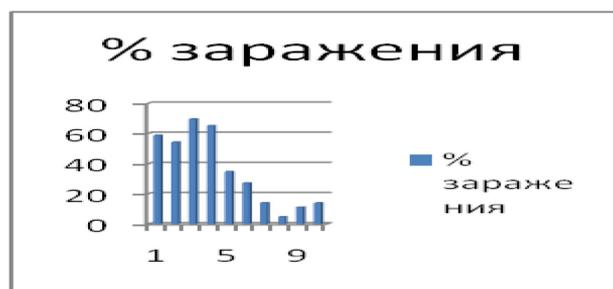
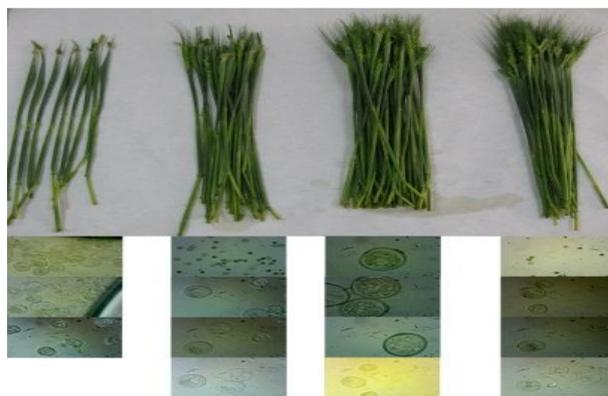


Рисунок 1 - Стерилизация исходного материала

кий процент чистых микроспор – 4,8% в чашке Петри (рисунок 1).

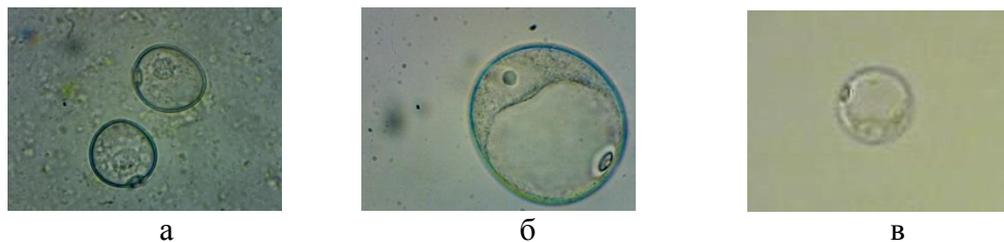
Была изучена зависимость стадии развития микроспор в пыльнике: фазы развития растений и состояния колоса. Колосья озимой пшеницы были срезаны на разных стадиях развития микроспор [3]. Стадии развития микроспор контролировались с помощью Микроскопа Meiji Techno серии MT4000 (Япония) – рисунок 2. Собранные растения были разделены на 4 группы.

В результате цитологического контроля было установлено, что на основе морфологических наблюдений одноядерная стадия развития микроспор соответствует фазе, когда влагалище второго листа от флагового находится посередине колоса (пыльник темно-зеленого цвета). В культуре изолированных пыльников и микроспор *in vitro* некоторая часть микроспор отклоняется от гаметофитного пути и переключается на спорофитный путь развития [4]. До настоящего времени вопрос о путях развития микроспор *in vitro*, приводящих к формированию эмбриоподобных структур, остается открытым [5]. Осмотическая предобработка изолированных пыльников пяти номеров озимой пшеницы: Стекловидная 24, Жетысу, Алмалы, Наз, Аруана, была использована для синхронизации микроспор пшеницы в поздней одно- и ранней двуядерной стадиях развития. Из стерилизованных соцветий были выделены пыльники в 55 мм диаметром пластиковые чашки Петри, содержащие 5 мл 0,3 М раствора маннита и 200 мг/л антибиотик (цефа-



1 – микроспоры пшеницы в фазе трубования; 2 – выход из трубки (ранняя) стадия; 3- выход из трубки (средняя) стадия; 4- выход из трубки (поздняя) стадия

Рисунок 2- Колосья пшеницы на разных стадиях развития



а – ранняя и средняя одноядерная стадия; б - поздняя одноядерная стадия; в- ранняя двухядерная стадия

Рисунок 3 – Стадии развития микроспор озимой пшеницы.
Микроскоп MeijiTechno серии МТ4000, увеличение 100 и 40 раз



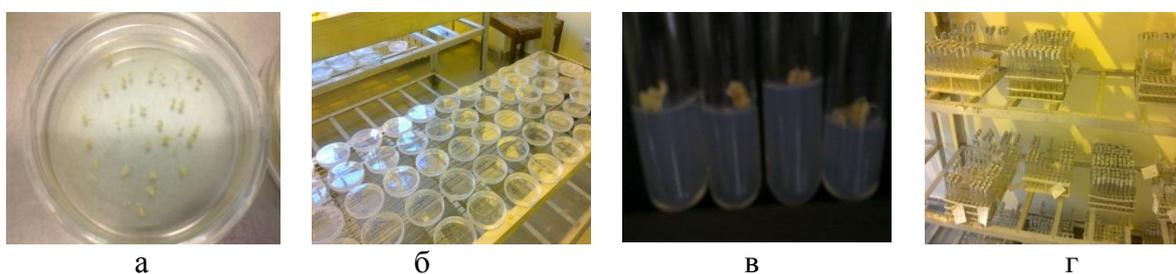
а – микроспоры после выделения и очистки на 100 и 40 мкн; б – разделение на жизнеспособных и нежизнеспособные микроспоры; в – эмбриогенные жизнеспособные микроспоры; г – подсчет в камере Горяева

Рисунок 4 – Фотографии микроспор пшеницы с микроскопа MeijiTechno серии МТ4000, увеличение 100х и 40х



а, б – Пыльники, посаженные на жидкую среду; в, г – каллусо- и эмбриогенез

Рисунок 5 – Каллусо- и эмбриогенез пшеницы на среде W14



а, б, в, г – Каллусы, эмбриониды, глобулы пшеницы в *in vitro* 4-8 недель

Рисунок 6 – Эмбриогенез пшеницы из микроспор на среде W14

золин). 150 пыльников были выделены в чашки, а затем в течение трех дней инкубации в 32°C в темноте [6, 7].

Выделение микроспор. После 3-дневной осмотической предобработки пыльников пшеницы в растворе 0,3М маннита при 32°C, прекультивированные пыльники были разбиты стеклянной палочкой на сите с размером пор (200-400 мкм) и фильтрат снова фильтруют два раза с использованием 100 и 40 мкм нейлоновые сита. Фильтрат суспензии тканей и микроспор центрифугировали при 80 г в течение 5 минут и повторно суспендируют в 2-3 мл раствора маннита. Жизнеспособные микроспоры из суспензии были собраны после центрифугирования в градиенте маннита/мальтоза с использованием 0,3 М маннита и 21% мальтозы (SIGMA). Выделили и посадили микроспоры на питательные среды: W14, СНВ-3, MS. Фотографии микроспор на различных стадиях, рисунок 3 (а, б, в).

Отделяли, очищали микроспоры, промывали в 0,3 М растворе маннита и снова центрифугируют при 60 г в течение 5 мин. Собранные в центрифужные пробирки микроспоры были вновь ресуспендированы в культуральной среде. Жизнеспособные микроспоры были подсчитаны использованием камеры Горяева. Для культуры микроспор плотность изолированных микроспор доводят до 30-50 тысяч микроспор/мл [7]. При выделении микроспор после гомогенизации фильтровали через сито 100 мкм.

На рисунке 4(а) показаны микроспоры сразу после выделения и фильтрации через сита 100 мкм. На рисунках 4(б, в) после дифференциального центрифугирования в градиенте плотности, видно разделение на жизнеспособные (эмбриогенные) и нежизнеспособные. На рисунке 4 (г) – расчет плотности микроспор на миллилитр среды в камере Горяева [8].

На рисунке 5(а) показаны пыльники на первый день после посадки в жидкую среду, 5(б) просачивание микроспор из пыльников в среду на 3-й день, 5(в, г) через 4-6 недель образование ELS (эмбриоподобные структуры), рисунок 5(в) в лаборатории биотехнологии КазНИИЗР; рисунок 5(г) в лаборатории биотехнологии Saaten Union Biotec, Германия.

Нами проведено исследование на оптимизацию питательной среды W14 для увеличения выхода морфогенных структур.

Регенерация растений. После 4 недель культивирования первые эмбриоподобные структуры (ЭС), полученные из микроспор стали ви-

димыми в жидкой среде. Структуры, размером 1-2 мм 5 сортов: Стекловидная 24 – 239 чашек Петри, Жетысу – 185 чашек Петри, Алмалы – 213 чашки Петри, Наз – 134 чашек Петри, Аруана – 76 чашек Петри были пересажены в 90-мм пластиковые чашки Петри и пробирки, содержащие питательную среду R-9 для регенерации [9] и культивировали при $t = 24^{\circ}\text{C}$, и непрерывном освещении, рисунок 6 (а, б, в).

Регенерированные зеленые проростки 20-30 мм длинной листьев переносили в стеклянные пробирки или пластиковые контейнеры, содержащие ту же среду регенерации (одно растение на одну пробирку), в то время как альбиносные проростки подсчитывались и отбрасывались, рисунок 7 (а, б, в, г).

Развитие проростков было проверено через неделю и через 3 недели. Развившиеся зеленые проростки на стадии трех листьев с хорошо развитыми корнями были выбраны и высажены в вегетационные сосуды, наполненные мелким керамзитом, прикрывали стаканами для поддержания влажности, рисунок 8. В течение трех недель проростки подкармливали жидкой средой Гамборга В5, наполовину разбавленной водой [10].

Необходимые условия: температура воздуха $t = +15+18^{\circ}\text{C}$, освещенность – 10-15 тыс. люкс, влажность – 70-75%.

В таблице 1 даны результаты по степени регенерации растений из микроспор озимой пшеницы в условиях Казахстана и Германии.

Как видно из таблицы №2, полученные зеленые растения варьировали от 9 шт. до 451 шт. Наибольшее количество зеленых растений было получено сорта Жетысу – 451шт., наименьшее у сорта Аруана – 23 шт. Альбиносных растений – от 1 до 21 шт. – они отбраковываются.

Всего в Германии и Казахстане получено 1325 растений-регенерантов, из них 1153 зеленых растений 5 сортов озимой пшеницы в лаборатории биотехнологии SaatenUnionBiotec и 172 растений в лаборатории биотехнологии КазНИИЗР.

Основное селекционное преимущество использования гаплоидов исходит из возможности одноэтапного получения гомозигот, что позволяет быстро фиксировать морфофизиологические параметры адаптивности и сокращать сроки создания приспособленных к суровым условиям Казахстана засухоустойчивых сортов и устойчивости к болезням, способных стабильно формировать высокие урожаи зерна и отвечающих всем потребностям современного рынка.



а, б – растения-регенеранты лаборатории биотехнологии SaatenUnionBiotec;
в, г – растения регенеранты пшеницы в *in vitro* лаборатории биотехнологии КазНИИЗР
Рисунок 7 – Регенеранты пшеницы на среде регенерации R9



а, б, в – растения-регенеранты озимой пшеницы
Рисунок 8 – Адаптация регенерантов к почвенному грунту после переноса из пробирки

Таблица 1 – Данные по регенерации дигаллоидов озимой пшеницы

N	Генотип	Колосья	Зеленые растения	Альбиносы	Среднее растения/колосья
Лаборатории биотехнологии Saaten Union Biotec, Германия					
1	Стекловидная 24	39	148	10	3,8
2	Жегысу	36	451	18	12,5
3	Аруана	43	23	17	0,6
4	Алмалы	35	366	12	11,1
5	Наз	30	165	1	5,9
Лаборатория биотехнологии КазНИИЗР					
N	Генотип	Колосья	Зеленые растения	Альбиносы	Среднее растения/колосья
1	Стекловидная 24	70	37	20	0,5
2	Жегысу	70	53	19	0,7
3	Аруана	70	9	10	0,1
4	Алмалы	70	41	21	0,5
5	Наз	70	32	15	0,4
	Итого	350	172	85	0,4

Литература

1 Weyen J. Barley and wheat doubled haploids in breeding. In A. Touraev, B.P. Foster, E.M. Jain. // Advances in haploid production in higher plants, 2009, p. 123-135.

2 Калинин Ф.Л. и др. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. - Киев: Наукова думка, 1980.- 235с.

3 Lantos C, Weyen J, Orsinis J., Gnad H., Schlieter B., Lein V., Kontowski S., Jacobi A., Mihaly R., Broughton S., Pauk J. Efficient application of in vitro anther culture for different European winter wheat (*Triticum aestivum* L.) breeding programmes // *Plant Breeding*. 2013. V. 132. P. 149-154.

4 Barkley A. and G. Chumley Doubled Haploid Laboratory for Kansas Wheat Breeding: An Economic Analysis of Biotechnology Adoption // *International Food and Agribusiness Management Review*. V.1, 5, Issue 2, 2012, e-mail: barkley@ksu.edu

5 Rubtsova M., Gnad H., Melzer ., Weyen J., Gils M. The auxins centrophenoxine and 2,4-D differ in their effects on non-directly induced chromosome doubling in anther culture of wheat (*T. aestivum* L.). *Plant Biotechnol Rep.* 7 (2013) 247-255. dx.doi.org/10.1007/s11816-012-0256-x

6 Lantos C, Jancsó M, Pauk. Microspore culture of small grain cereals // *Acta physiologiae plantarum*. 2005. V. 27(48). - P. 631-639.

7 Lantos C., Páricsi S., Zofajova A., Weyen J., Pauk J. Isolated microspore culture of wheat (*Triticum aestivum* L.) with Hungarian cultivars // *Acta Biologica Szegediensis* 50.- № 1-2. - 2006. - P.31-35.

8 Межгосударственный стандарт. Семена сельскохозяйственных культур. Гост 12044-93, дата введения 1995-01-01 ил, 199 с.

9 M. Baum, S. Tawkaz. Doubled haploid production in bread wheat and barley using anther culture technique, 1999. - 45 p.

Б10 еккужина С.С. // Гаплоидные технологии в ускоренном создании исходных форм и линий, устойчивых к засухе и к *Septoria nodorum* Berk.: дисс.д. б.н., 2011. - 273 с.

References

1 Weyen J. Barley and wheat doubled haploids in breeding. In A. Touraev, B.P. Foster, E.M. Jain. // *Advances in haploid production in higher plants*, 2009, r. 123-135.

2 Kalinin F.L. i dr. *Metody kul'tury tkanej v fiziologii i biohimii rastenij*. - Kiev: Naukova dumka, 1980, 235s.

3 Lantos C, Weyen J, Orsinis J., Gnad H., Schlieter B., Lein V., Kontowski S., Jacobi A., Mihaly R., Broughton S., Pauk J. Efficient application of in vitro anther culture for different European winter wheat (*Triticum aestivum* L.) breeding programmes // *Plant Breeding*. 2013. V. 132. P. 149-154.

4 Barkley A. and G. Chumley Doubled Haploid Laboratory for Kansas Wheat Breeding: An Economic Analysis of Biotechnology Adoption // *International Food and Agribusiness Management Review*. V.1, 5, Issue 2, 2012, e-mail: barkley@ksu.edu

5 Rubtsova M., Gnad H., Melzer ., Weyen J., Gils M. The auxins centrophenoxine and 2,4-D differ in their effects on non-directly induced chromosome doubling in anther culture of wheat (*T. aestivum* L.). *Plant Biotechnol Rep.* 7 (2013) 247-255. dx.doi.org/10.1007/s11816-012-0256-x

6 Lantos C, Jancsó M, Pauk. Microspore culture of small grain cereals // *Acta physiologiae plantarum*. 2005. V. 27(48). P. 631-639.

7 Lantos C., Páricsi S., Zofajova A., Weyen J., Pauk J. Isolated microspore culture of wheat (*Triticum aestivum* L.) with Hungarian cultivars. *Acta Biologica Szegediensis* 50, № 1-2 2006, R.31-35.

8 Mezhgosudarstvennyj standart. Semena sel'skhozajstvennyh kul'tur. Gost 12044-93, data vvedenija 1995-01-01 il, 199 s.

9 M. Baum, S. Tawkaz. Doubled haploid production in bread wheat and barley using anther culture technique, 1999, 45 r.

10 Bekkuzhina S.S. // Гаплоидные технологии в ускоренном создании исходных форм и линий, устойчивых к засухе и к *Septoria nodorum* Berk., diss.d. б.н., 2011, 273 с.