

## NEWS

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN  
SERIES OF AGRICULTURAL SCIENCES

ISSN 2224-526X

Volume 2, Number 38 (2017), 171 – 175

Aqarahim Wasim<sup>1</sup>, R. S. Yerzhebayeva<sup>2</sup>, I. A. Nurpeisov<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Kazakh national agrarian university, Almaty, Kazakhstan,

<sup>2</sup>Kazakh Scientific Research Institute of Crop Farming and Production, Almaty village, Kazakhstan

## TRANSFERRING OF HYBRID F<sub>1</sub> OF SPRING WHEAT INTO DIHAPLOID BASIS USING ANDROGENS TECHNOLOGIES

**Abstract.** Anther culture is the most technologically advanced method of obtaining doubled haploids. Dihaploid lines are necessary to speed up the breeding process. 15 dihaploid lines were obtained by anther culture among 7 hybrids of first generation (F<sub>1</sub>) of spring wheat. An average of 23.7 embryo-like structures was obtained on 150 anthers. Percentage of plant regeneration was 49.1%, including 39.9% albino plants and 9.1% green plants. The percentage of spontaneous chromosome doubling among obtained green plants was 35.7.

**Keywords:** androgenesis, anther culture, hybrid generation F<sub>1</sub>, spring wheat, embryogenesis, regeneration, spontaneous chromosome doubling.

УДК 633.11:631.3

Агарахим Васим<sup>1</sup>, Р. С. Ержебаева<sup>2</sup>, И. А. Нурпеисов<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Казахский национальный аграрный университет, Алматы, Казахстан,

<sup>2</sup>Казахский НИИ земледелия и растениеводства, п. Алмалыбак, Казахстан

## ПЕРЕВОД ГИБРИДОВ F<sub>1</sub> ЯРОВОЙ ПШЕНИЦЫ НА ДИГАПЛОИДНУЮ ОСНОВУ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ АНДРОГЕННОЙ ТЕХНОЛОГИИ

**Аннотация.** Метод культуры пыльников является наиболее технологичным методом получения удвоенных гаплоидов. Дигаплоидные линии необходимы для ускорения селекционного процесса. Из 7 гибридов первого поколения (F<sub>1</sub>) яровой мягкой пшеницы методом культуры пыльников были получены 15 дигаплоидных линий. Выход эмбрионидных структур на 150 пыльников в среднем составил 23,7 шт. Процент регенерации растений составил 49,1%, из них альбиносных растений 39,9% и зеленых растений 9,1%. Процент спонтанного удвоения хромосом среди полученных зеленых растений составил 35,7.

**Ключевые слова:** андрогенез, культура пыльников, гибридное поколение F<sub>1</sub>, яровая пшеница, эмбриогенез, регенерация, спонтанное удвоение хромосом.

**Введение.** Гаплоидия – один из наиболее востребованных методов культуры тканей в селекции растений. Этот метод обеспечивает быстрое и эффективное достижение гомозиготности растений. Основное селекционное преимущество использования гаплоидов исходит из возможности одноэтапного получения гомозигот, что позволяет быстро фиксировать морфофизиологические параметры адаптивности и сократить сроки создания сортов, приспособленных к суровым условиям Казахстана и многочисленным болезням, способных стабильно формировать высокие урожаи зерна и отвечающих всем потребностям современного рынка.

У гаплоидов каждый ген представлен единственным аллелем и рецессивные аллели одних генов проявляются наряду с доминантными аллелями других. Генетическое расщепление при использовании гаплоидов менее сложно (фактически оно не превышает числа классов гамет) и для выделения определенной комбинации генов нужна сравнительно малочисленная популяция [1].

Для получения гаплоидов пшеницы в массовых количествах используются методы отдаленной гибридизации с последующей селективной элиминацией хромосом вида-опылителя и методы андрогенеза. Культуры пыльников и изолированных микроспор являются самыми технологичными методами андрогенеза на сегодняшний день. Это надежные и эффективные методы получения удвоенных гаплоидов.

В данной работе применен метод культуры пыльников для получения дигаплоидных гомозиготных линий пшеницы из гибридного поколения F<sub>1</sub> с целью ускорения селекционного процесса.

**Материал и методы исследований.** Материалом исследований служили 7 гибридов первого поколения (F<sub>1</sub>) яровой мягкой пшеницы, полученные лабораторией биотехнологии Казахского НИИ земледелия и растениеводства (КазНИИЗиР) при консультации селекционеров.

Методы исследований. Донорные растения для андрогенной технологии пшеницы были выращены на полевом стационаре отдела зерновых культур КазНИИЗиР.

Незрелые соцветия отбирались с донорных растений пшеницы, в фазе флагового листа, не вышедшего из листового влагалища, с микроспорами, находящимися на средней и поздней одноядерной стадиях развития. До необходимой фазы флагового листа растения яровой пшеницы первого срока посева подошли 2-4 июня 2016 года.

Оценка стадии развития микроспор определялась по общепринятой методике временных давленных препаратов [2].

Для увеличения частоты выхода каллусови спонтанного удвоения хромосом колосья донорных растений подверглись холодовому стрессу в холодильной установке при температуре +2 - +3° в течение 14 дней [3].

Колосья пшеницы, прошедшие холодовую обработку, стерилизовали 20% раствором NaOCl с каплей Твин-80 в течение 10 минут на шейкере, а затем трижды промывали стерильной дистиллированной водой в ламинарном боксе по 3 минуты.

Культивирование пыльников осуществлялось по Rubtsova et al., 2012 [4] Пыльники выделяли из колоса в асептических условиях и помещали в пластиковые чашки Петри диаметром 60 мм (100-150 пыльников/чашка Петри), которая содержала 6 мл жидкой питательной среды для индукции. Пыльники инкубировали в темноте при 32°C в течение первых 3 дней, а затем переносили в термостат с температурой 28°C до появления новообразований.

На протяжении процесса выделения и после переноса в культуральную среду проводились наблюдения за состоянием микроспор на микроскопе Meiji Techno серии MT4000.

Определение пloidности проводили методом давленных препаратов на корешках 2-3 дневных проростков [2].

Для индукции эмбриогенеза использовалась среда АП, разработанная в рамках казахстанско-австралийского проекта, (Ismagul A. et al., 2013) с добавлением 50 г фикола 400 [5].

Для регенерации использовалась стандартная среда MS с добавлением кинетина 2 мг/л, зеатина 3 мг/л, 30 г/л сахарозы и 3 г/л Phytogel<sup>TM</sup>.

Для корнеобразования стандартная среда MS с добавлением 0,5 г/л казеина гидролизата, 20 г/л сахарозы, 2 мг/л ИУК, 4 г/л Phytogel<sup>TM</sup>.

Все зеленые растения на стадии трех листьев пересаживались в горшочки с почвой. Для почвы были взяты торф, вермикулит и песок (1:1:1).

Высаженные растения помещались в климатические камеры, где были созданы условия для их адаптации – поддерживались температурный режим 23-24 °С, освещение 8-10 тыс. люкс и 80% влажности. В течение первых двух недель (период адаптации) растения-регенеранты опрыскивали раствором фитогормонов.

**Результаты.** После введения пыльников в культуру *in vitro* на жидкую питательную среду в течение 4 недель проводились цитологические наблюдения, учеты за делением микроспор и развитием каллусов и эмбриоструктур. Результаты наблюдений показали, что спонтанный выход микроспор из пыльцевого мешка в питательную среду протекал очень быстро и составил 75-85%. Цитологические наблюдения за состоянием микроспор показали высокий процент жизнеспособности микроспор (70-80%) в первые и вторые сутки. В дальнейшем (7 сутки) процент жизнеспособности микроспор уменьшался до 27-35%.

Выход эмбриоподобных структур (ЭС) варьировал от 2 до 110 ЭС/150 пыльников с одной чашки Петри рисунок 1.



Рисунок 1 – Эмбриогенез в культуре пыльников гибрида F<sub>1</sub> Майра х Байтерек<sub>1</sub> на среде для индукции (АП с фиколат)

Результаты оценки эмбриогенеза в культуре пыльников пшеницы 7 гибридов первого поколения представлены в таблице. Наиболее высокий уровень формирования эмбрионидных структур среди изученных гибридов пшеницы зафиксирован у гибрида F<sub>1</sub> Майра х Байтерек, где сформировалось 186 ЭС, что составило в среднем на одну чашку Петри - 46,5 ЭС. Высокую отзывчивость на культуру пыльников показала так же гибридная комбинация Майра х Челябинс<sub>2</sub>, у которой зафиксировано образование ЭС 42,5/чашка Петри.

Результаты оценки эмбриогенеза и регенерации растений гибридов первого поколения пшеницы в культуре пыльников

Наименование	Количество посаженных пыльников, шт	Общее количество образовавшихся ЭС/ среднее количество на 150 пыльников, шт	Количество пересаженных ЭС, шт	Регенерация растений, шт	
				альбиносные	зеленые
Южная 12 х Карабалыкская 92	600	6/3	0	0	0
Терция х Байтерек	400	0	0	0	0
Майра х Челябинс <sub>2</sub>	600	170/42,5	151	45	17
Майра х Байтерек	600	186/46,5	124	64	12
Симбирская 17 х Акмола 2	600	58/29	29	12	0
Симбирская 17 х МИС	600	93/23,5	81	21	7
Иртыш 97 х TR <sub>1</sub>	600	80/20	73	41	6
Итого:		595/23,7	458	183	42

У гибрида F<sub>1</sub> Терция х Байтерек не было зафиксировано образование ЭС. Низкую отзывчивость на технологию культуры пыльников показал гибрид Южная 12 х Карабалыкская 92, у которого из микроспор в результате деления образовалось в среднем от 0 до 6 ЭС с одной чашки Петри.

Эмбриоструктуры, достигшие 2-2,5 мм, пересаживались на среду для регенерации в чашки Петри 90 мм диаметром в количестве 18-20 ЭС. Более мелкие ЭС оставляли в среде для дальнейшего роста. В общем, по опыту было пересажено на твердую среду для регенерации 458 ЭС.

Оценка регенерации гибридов первого поколения показала, что общий выход альбиносных растений (безхлорофильных проростков) составил 183 шт, что составляет 39,9%. Наблюдения и анализ за выходом зеленых растений показали, что по всему опыту в настоящее время получено 42 зеленых растений, что составляет 9,1%. Все зеленые растения – регенеранты были пересажены на среду для корнеобразования (рисунок 2). Альбиносные растения были отбракованы.



Рисунок 2 – Регенерация зеленых растений пшеницы

Полученные зеленые растения (42) были подвергнуты определению плоидности. Перед высадкой в грунт у растений были отщеплены корешки и методом давленых препаратов определена плоидность [2]. Определение плоидности у полученных 42 растений-регенерантов яровой пшеницы показало, что спонтанное удвоение зафиксировано у 15 растений, что составляет 35,7%. 27 зеленых растений являются гаплоидными.

Дигаплоидные растения помещались в климатические камеры, где были созданы условия для их адаптации – поддерживались температурный режим 23-24 °С, освещение 8-10 тыс. люкс и 80% влажности. В течение первых двух недель (период адаптации) растения-регенеранты опрыскивали раствором фитогормонов.

Уровень адаптации был высокий. К грунту адаптировались все 15 дигаплоидных растений.

**Выводы.** По результатам индукции эмбриогенеза 7 гибридов первого поколения (F<sub>1</sub>) яровой мягкой пшеницы в культуре пыльников было получено 595 эмбриоструктур. При этом выход эмбрионидных структур на 150 пыльников в среднем составил 23,7.

Процент регенерации растений пшеницы из каллусов и эмбрионидных структур составил 49,1%. Из пересаженных 458 ЭС получено 183 альбиносных растений (39,9%) и 42 зеленых растений (9,1%).

Анализ по определению плоидности у полученных 42 зеленых растений-регенерантов яровой пшеницы показал, что спонтанное удвоение зафиксировано у 15 растений, что составляет 35,7%. 27 зеленых растений были гаплоидными.

#### ЛИТЕРАТУРА

- [1] Zheng M.Y. Microspore culture in wheat (*Triticum aestivum*) – double dhaploid production via induced embryogenesis // *Plant Cell Tiss Org Cult.* – 2003. – Vol. 73. – P. 213-230.
- [2] Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. – М.: Агропромиздат, 1988. – Вып. 4. – С. 58-100.
- [3] Lantos, C., Weyen, J., Orsini, J. M., Gnad, H., Schlieter, B., Lein, V., Pauk, J. (2013). Efficient application of in vitro anther culture for different European winter wheat (*Triticum aestivum* L.) breeding programmes // *Plant Breeding.* – Vol. 132(2). – P. 149-154. doi:10.1111/pbr.12032
- [4] Rubtsova, M., Gnad, H., Melzer, M., Weyen, J., & Gils, M. (2013). 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.* – Vol. 7. – P. 247-255. doi:10.1007/s11816-012-0256-x
- [5] Исмагул А., Башабаева Б.М., Исакова Г., Абугалиева А.И., Елибай С., Кененбаев С.Б. Культура изолированных микроспор пшеницы. Методическое пособие. – Алматы, 2013. – 19 с.

#### REFERENCES

- [1] Zheng M.Y. Microspore culture in wheat (*Triticum aestivum*) – doubled haploid production via induced embryogenesis // *Plant Cell Tiss Org Cult.* 2003. Vol. 73. P. 213-230.
- [2] Pausheva Z.P. Praktikum po citologii rastenij. M.: Agropromizdat, 1988. Vyp. 4. P. 58-100.

[3] Lantos, C., Weyen, J., Orsini, J. M., Gnad, H., Schlieter, B., Lein, V., Pauk, J. (2013). Efficient application of in vitro anther culture for different European winter wheat (*Triticum aestivum* L.) breeding programmes// *Plant Breeding*. Vol. 132(2). P. 149-154. doi:10.1111/pbr.12032

[4] Rubtsova, M., Gnad, H., Melzer, M., Weyen, J., & Gils, M. (2013). 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*. Vol. 7. P. 247-255. doi:10.1007/s11816-012-0256-x

[5] Ismagul A., Bashabaeva B.M., Iskakova G., Abugalieva A.I., Elibaj S., Kenenbaev S.B. *Kul'tura izolirovannyh mikrospor pshenicy. Metodicheskoe posobie*. Almaty, 2013. 19 p.

**Агарахим Васим<sup>1</sup>, Р. С. Ергебаева<sup>2</sup>, И. А. Нурпеисов<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Қазақ ұлттық аграрлық университеті, Алматы, Қазақстан,

<sup>2</sup>Қазақ егіншілік және өсімдік шаруашылығы ғылыми-зерттеу институты,  
Алматы облысы, Алмалыбақ, Қазақстан

### **АНДРОГЕНДІ ТЕХНОЛОГИЯНЫ ҚОЛДАНЫП ЖАЗДЫҚ БИДАЙДЫҢ F<sub>1</sub> ГИБРИДТЕРІН ДИГАПЛОИДТЫҚ НЕГІЗГЕ АУДАРУ**

**Аннотация.** Екі еселенген гаплоидтарды алуда тозаң дақылы айтарлықтай технологиялық әдіс болып табылады. Дигаплоидты линиялар селекциялық кезеңдерді жылдамдатуға қажет. Тозаң дақылының әдісімен жаздық жұмсақ бидайдың бірінші ұрпағының (F<sub>1</sub>) 7 гибридінен 15 дигаплоидты линиялар алынды. 150 тозаңнан эмбриодтық құрылымның шығуы орта есеппен 23,7 құрады. Өсімдік регенерациясы 49,1% пайызды құрады, оның ішінде 39,9% альбинос өсімдіктер, 9,2% жасыл өсімдіктер. Алынған жасыл өсімдіктердің ішінен 35,7 пайызы хромосомалардың өздігінен екі еселенуін құрады.

**Түйін сөздер:** андрогенез, тозаң дақылы, F<sub>1</sub> гибридті ұрпақ, жаздық бидай, эмбриогенез, регенерация, хромосомалардың өздігінен екі еселенуі.