

NEWS

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

SERIES OF AGRICULTURAL SCIENCES

ISSN 2224-526X

Volume 3, Number 39 (2017), 66 – 71

T. A. Bazylova¹, A. M. Abekova², R. S. Erzhebaeva², K. A. Myrzabek¹

¹NJSC "Kazakh national agrarian university", Almaty, Kazakhstan,

²CWLL "Kazakh scientific research institute of agriculture and plant", Almaty, Kazakhstan.

E-mail: t.bazylova@mail.ru, aabekova@mail.ru, raushan_2008@mail.ru, myrzabek_karima@yandex.kz

**EMBRYOGENESIS AND THE REGENERATION
IN ANTHR CULTURE OF THE FIRST GENERATION
F₁ HYBRIDS OF WINTER TRITICALE**

Abstract. Triticale is one of the most important forage crops in Kazakhstan Studied the induction of embryogenesis and the regeneration in 7 triticale genotypes of F₁ hybrid generation. On average, the first generation hybrids formed 36.9 AS / petri dish. As a result of the induction of embryogenesis of F₁ hybrids microspore obtained 1091 androgenic structures. The percentage of regeneration was 27.9%. As a result of regeneration received 68 green and 234 albino plants. Spontaneous doubling in the obtained plants - regenerants was 41.2%. 28 digaploid triticale lines of F₁ hybrids were obtained.

Keywords: triticale, hybrid, haploid technology, anther culture, embryogenesis, androgens structure.

УДК 578:633.19

Т. А. Базылова¹, А. М. Абекова², Р. С. Ержебаева², К. А. Мырзабек¹

¹НАО «Казахский национальный аграрный университет», Алматы, Казахстан,

²ТОО «Казахский научно-исследовательский институт земледелия и растениеводства», Алматы, Казахстан

**ЭМБРИОГЕНЕЗ И РЕГЕНЕРАЦИЯ
В КУЛЬТУРЕ ПЫЛЬНИКОВ ГИБРИДОВ ПЕРВОГО ПОКОЛЕНИЯ F₁
ОЗИМОГО ТРИТИКАЛЕ**

Аннотация. Тритикале одна из важнейших кормовых культур Казахстана. Изучена индукция эмбриогенеза и регенерации у 7 генотипов тритикале гибридного поколения F₁. В среднем гибриды первого поколения формировали 36,9 АС/ чашка Петри. По результатам индукции эмбриогенеза из микроспор гибридов F₁ получено 1091 андрогенных структур. Процент регенерации составил 27,9%. По результатам регенерации получено 68 зеленых и 234 альбиносных растений. Спонтанное удвоение у полученных растений – регенерантов составило 41,2%. Получено 28 дигаплоидных линий тритикале из гибридов F₁.

Ключевые слова: тритикале, гибриды, гаплоидная технология, культура пыльников, эмбриогенез, андрогенная структура.

Введение. Тритикале одна из важнейших кормовых культур Казахстана. Посевы тритикале в Казахстане к настоящему времени составляют более 100 тысяч гектаров. Одной из причин недостаточных площадей под такой кормовой культурой как тритикале является отсутствие адаптированных к определенным условиям возделывания сортов. Сортовой генофонд тритикале отечественной селекции крайне ограничен. Для решения этой проблемы необходимо подробное изучение генофонда, а также применение биотехнологических методов для ускорения селекционного процесса. Гаплоидия является важным методом современной селекции растений. Технология удвоен-

ных гаплоидов (дигаплоидов) имеет потенциал, для существенного ускорения селекции растений, в связи с тем, что гомозиготные линии доступны для отбора в гибридах первого поколения (F_1). Роль гаплоидной технологии в селекции велика. Применение ее позволяет быстрее найти нужную комбинацию, сокращает время создания сорта [1-3].

Материалы и методы исследований. Материалом исследований служили 7 гибридов первого поколения (F_1) озимого тритикале, полученные лабораторией биотехнологии Казахского НИИ земледелия и растениеводства (КазНИИЗиР) при консультации селекционеров.

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

Незрелые соцветия отбирались с растений тритикале, в фазе флагового листа, не вышедшего из листового влагалища. Микроспоры, которых находятся на средней и поздней одноядерной стадиях развития.

Оценка стадии развития микроспор определялась по общепринятой методике временных давленных препаратов [4].

Для увеличения частоты выхода каллусов и спонтанного удвоения хромосом колосья донорных растений тритикале подверглись холодному стрессу в холодильной установке при температуре $+2 - +3^\circ$ в течение 14 дней [5].

Колосья тритикале, прошедшие холодную 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 [6]. Пыльники выделяли из колоса тритикале 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 перенесли 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 [4].

Для индукции эмбриогенеза использовалась среда Мурасиге и Скуга (МС) [7] с добавлением: 90 г/л мальтозы; 2 мг/л фитогормона 2,4 Д и 0,5 мг/л кинетина; 50 г/л фиколл 400.

Для регенерации использовалась стандартная среда MS с добавлением кинетина 2 мг/л, зеатина 3 мг/л, 30 г/л сахарозы и 3 г/л PhytoGelTM.

Для корнеобразования стандартная среда MS с добавлением 0,5 г/л казеина гидролизата, 20 г/л сахарозы, 2 мг/л ИУК, 4 г/л PhytoGelTM.

Все зеленые растения тритикале 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 $23-24^\circ\text{C}$, освещение 8-10 тыс. люкс и 80% влажности. В течение первых двух недель (период адаптации) растения-регенеранты опрыскивали раствором фитогормонов.

Результаты и обсуждение. После холодной обработки в течение 14 дней пыльники гибридов F_1 тритикале введены в культуру пыльников *in vitro* на жидкую питательную среду MS для индукции эмбриогенеза. Количество изолированных и посаженных пыльников было разным, в связи с ограниченным количеством колосьев гибридов F_1 .

После обработки высокой температурой, чашки Петри с пыльниками в питательных средах перенесли в термостат с температурой 25°C до появления новообразований (Rubtsova et al., 2012) [6]. Каждую неделю проводились цитологические наблюдения, учеты за делением микроспор и развитием каллусов и эмбриоструктур.

Результаты наблюдений показали, что выход микроспор из пыльцевого мешка в питательную среду протекал очень быстро и составил 80-90%. Цитологические наблюдения за состоянием микроспор показали высокий процент жизнеспособности микроспор (75-85%) в первые и вторые сутки (рисунок 1).

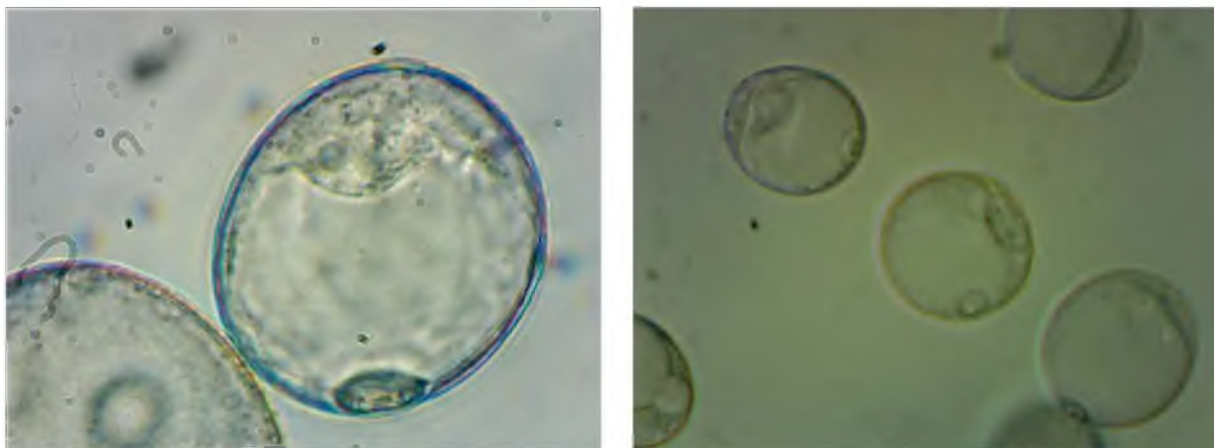


Рисунок 1 – Микроспоры тритикале на питательной среде на 1 сутки культивирования (увеличение микроскопа x1000 и на x400)

После 4 суток культивирования жизнеспособность снижалась в среднем на всех питательных средах до 56%. Наиболее высокая жизнеспособность микроспор (до 63%) на 5-ые сутки наблюдалась у генотипа Таза x 25/4351

В течение 1-2 недели микроспоры проходили через серию митотических делений и формировали предшественники эмбриоидов. После 2-ой недели культивирования наблюдались первые проэмбриониды, полученные из микроспор. Большая часть проэмбриоидов развивалась в глобулярные эмбриоподобные структуры, затем в эмбриониды посредством прямого эмбриогенеза и могли расти как нормальные зиготические эмбриониды с различными формами и размерами [8]. Наблюдалось и формирование каллусов (рисунок 2).

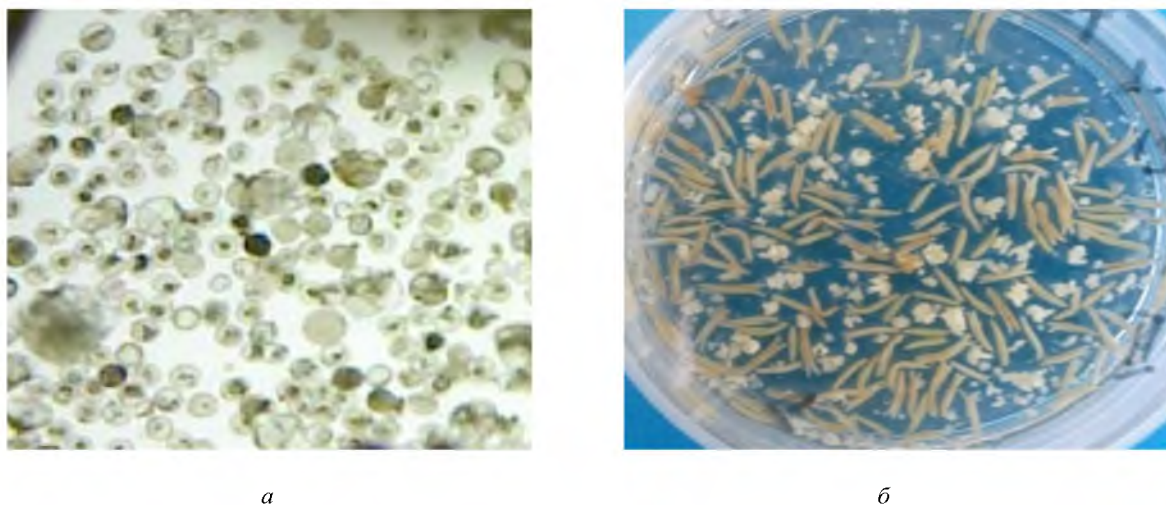


Рисунок 2 – Эмбриогенез в культуре пыльников тритикале:
а – деление микроспор; б – образование андрогенных структур и эмбриоидов

Результаты эмбриогенеза и регенерации в культуре пыльников тритикале 7 гибридов F₁ представлены в таблице.

Уровень образования андрогенных структур (АС) был разным и колебался в пределах 8-60 АС/чашка Петри. В среднем гибриды первого поколения формировали 36,9 АС/ чашка Петри. У линий Т-968 x 25/4351 и Таза x 25/4351 формировалось наибольшее количество андрогенных структур – 60 АС/чашка Петри. По результатам индукции эмбриогенеза из микроспор гибридов F₁ получено 1091 андрогенных структур.

Результаты эмбриогенеза и регенерации в культуре пыльников тритикале гибридов F₁

Происхождение гибридов	Количество посаженных пыльников, шт	Количество андрогенных структур, шт	Количество андрогенных структур / чашка Петри	Количество пересаженных андрогенных структур, шт	Количество растений, шт	
					альбиносных	зеленых
Т -968 х 25/4351	500	300	60	238	67	18
Зерно кормовое 5 х 25/4351	500	185	46,2	167	46	10
Зерно кормовое 5 х 11/Т-49	400	90	22,5	65	25	8
Т-42 х Т – 49	100	8	8	5	0	6
Таза х 25/4351	500	300	60	285	53	8
Т – 968 х 14/409	300	120	40	90	27	8
Т-42 х Т-45	400	88	22	82	16	10
Итого:	2700	1091	36,9	932	234	68

Андрогенные структуры, достигшие 2-2,5 мм, пересаживались на питательную среду для регенерации в чашки Петри 90 мм диаметром в количестве 18-20 ЭС. Более мелкие АС оставляли в среде для дальнейшего роста. В общей сложности пересажено было 932 АС на среду для регенерации.

Материал, пересаженный на питательную среду для регенерации растений, инкубировался при 16 часовом фотопериоде, освещении 10 тыс. люкс и температуре 24 -26° С [9, 10]. Андрогенные структуры регенерировали в альбиносные и зеленые растения [11]. Процент регенерации составил 32,4%. По результатам регенерации получено 68 зеленых растений (7,2%) и 234 альбиносных растений (25,1%).

Все растения после регенерации имели побеги и корни, но были пересажены на питательную среду для корнеобразования с целью получения более мощной корневой системы (рисунок 3).



а



б

Рисунок 3 – Адаптация растений-регенерантов на питательной среде и в тепличных условиях в горшках с почвой: а – растения-регенеранты в климатической камере; б – дигиплоидные линии в тепличных условиях

Адаптация к грунту является критической точкой гаплоидной технологии. Пробирочные растения должны перестроиться на автотрофный тип питания. Среди полученных зеленых растений были отобраны зеленые проростки на стадии трех листьев, с хорошо развитой корневой системой для высадки в горшочки с почвой.

Для почвы были взяты торф, вермикулит (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 и поливали раствором воды, содержащим макро- и микросоли, хелат железа по прописи Мурасиге и Скуга. Все альбиносные растения были выбракованы.

Полученные зеленые растения (68) были подвергнуты определению плоидности методом давленных препаратов [4]. Определение плоидности у полученных 68 растений -регенерантов тритикале показало, что спонтанное удвоение зафиксировано у 28 растений (Т-42хТ-49 (6), Т-42 хТ-45 (7), Зернокормовое 5 x 25/4351 (7), Зернокормовое 5 x 11/Т-49(8), что составляет 41,2%. 40 зеленых растений являются гаплоидными.

Выводы. Изучена индукция эмбриогенеза и регенерации у 7 генотипов тритикале гибридного поколения F₁. В среднем гибриды первого поколения формировали 36,9 АС/ чашка Петри. По результатам индукции эмбриогенеза из микроспор гибридов F₁ получено 1091 андрогенных структур. Процент регенерации составил 32,4% из них регенерация зеленых растений 7,2%. Спонтанное удвоение у полученных растений – регенерантов составило 41,2%. Получено 28 дигаплоидных линий тритикале из гибридов F₁.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Wedzony M., Foster B.P., Zur I., Golemic E., Szechynska-Hebda M., Dubas E., Gotebiowska G. Progress in doubled haploid technology in higher plants // On book: Advanced in haploid production in higher plants / edited by: Touraev B.P. Foster, E.M. Jain. – Springer Science + BusinessMedia B.V., 2009. – P. 1-35.
- [2] Germana M.A. Anther culture for haploid and doubled haploid production // Plant Cell Tiss Org Cult. – 2011. – Vol. 104. – P. 283-300.
- [3] Weyen J. Barley and wheat doubled haploids in breeding // On book: Advanced in haploid production in higher plants / Edited by: A.Touraev, B.P. Foster, E.M. Jain. – SpringerScience + BusinessMedia B.V., 2009. – P. 179-189.
- [4] Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. – М.: Агропромиздат, 1988. – 271 с.
- [5] Schumann G. Investigations into albinism in anther cultures of triticale // Archiv fur Zuchtungsforshung. – 1988. – Vol. 18. – P. 115-122.
- [6] Rubtsova M., Gnad H., Melzer M., 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. – 2012. – Vol. 7. – P. 247-255.
- [7] Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assay with Tobacco cultures // Physiol Plantarum. – 1962. – Vol. 15. – P. 473-475.
- [8] Liu W., Zheng M.Y., Konzak C.F. Improving green plant production via isolated microspore culture in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) // Plant Cell Rep. – 2002. – Vol. 20. – P. 821-824.
- [9] Arzani A., Darvey N.L. Androgenetic response of heterozygous triticale populations using a greenhouse hydroponic system // Euphytica. – 2002. – Vol. 127. – P.53-60.
- [10] Eudes F., Amundsen E. Isolated microspore culture of Canadian 6x triticale cultivars // Plant Cell Tissue and Organ Culture. – 2005. – Vol. 82. – P. 233-241.
- [11] Ponitka A., Slusarkiewicz Jarzina A. The effect of liquid and solid medium on production of winter triticale (x *Tritico-secale* Wittm.) anther-derived embryos and plants // Cereal Research Communications. – 2007. – Vol. 35. – P. 15-22.

REFERENCES

- [1] Wedzony M., Foster B.P., Zur I., Golemic E., Szechynska-Hebda M., Dubas E., Gotebiowska G. Progress in doubled haploid technology in higher plants // On book: Advanced in haploid production in higher plants / Edited by: Touraev, B.P. Foster, E.M. Jain. Springer Science + BusinessMedia B.V., 2009. P. 1-35.
- [2] Germana M.A. Anther culture for haploid and doubled haploid production // Plant Cell Tiss Org Cult. 2011. Vol. 104. P. 283-300.
- [3] Weyen J. Barley and wheat doubled haploids in breeding // On book: Advanced in haploid production in higher plants / Edited by: A.Touraev, B.P. Foster, E.M. Jain. SpringerScience + BusinessMedia B.V., 2009. P. 179-189.
- [4] Pausheva Z.P. Praktikum po citologii rastenij. M.: Agropromizdat, 1988. 271 p.
- [5] Schumann G. Investigations into albinism in anther cultures of triticale // Archiv fur Zuchtungsforshung. 1988. Vol. 18. P. 115-122.
- [6] Rubtsova M., Gnad H., Melzer M., 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. 2012. Vol. 7. P. 247-255.
- [7] Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assay with Tobacco cultures // Physiol Plantarum. 1962. Vol. 15. P. 473-475.
- [8] Liu W., Zheng M.Y., Konzak C.F. Improving green plant production via isolated microspore culture in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) // Plant Cell Rep. 2002. Vol. 20. P. 821-824.
- [9] Arzani A., Darvey N.L. Androgenetic response of heterozygous triticale populations using a greenhouse hydroponic system // Euphytica. 2002. Vol. 127. P. 53-60.

[10] Eudes F., Amundsen E. Isolated microspore culture of Canadian 6x triticale cultivars // Plant Cell Tissue and Organ Culture. 2005. Vol. 82. P. 233-241.

[11] Ponitka A., Slusarkiewicz Jarzina A. The effect of liquid and solid medium on production of winter triticale (x Triticosecale Wittm.) anther-derived embryos and plants // Cereal Research Communications. 2007. Vol. 35. P. 15-22.

Т. А. Базылова¹, А. М. Абекова², Р. С. Ержебаева², К. А. Мырзабек¹

¹«Қазақ егіншілік және өсімдік шаруашылығы ғылыми-зерттеу институты» ЖШС, Алматы, Қазақстан,

²«Қазақ ұлттық аграрлық университеті» КЕАҚ, Алматы, Қазақстан

ҚЫСҚЫ ТРИТИКАЛЕНІҢ F1 БІРІНШІ ҰРПАҚ БУДАНДАРЫ ТОЗАҢ ДАҚЫЛЫНДАГЫ ЭМБРИОГЕНЕЗ ЖӘНЕ РЕГЕНЕРАЦИЯ

Аннотация. Тритикале Қазақстандағы ең маңызды мал азықтық дақылдардың бірі болып табылады. Нәтижесінде тритикаленің 7 генотипінің F1 ұрпағының эмбриогенез индукциясы мен регенерациясы зерттелді. Орта есеппен бірінші ұрпақ гибридтерінде чашка Петриде 36,9 андрогенді құрылым қалыптасты. Эмбриогенез индукциясының нәтижесінде F1 будандарының микроспораларынан 1091 андрогенді құрылым алынды. Регенерация 27,9% пайызды құрады. Регенерация нәтижесі бойынша 68 жасыл және 234 альбинос өсімдіктер алынды. Алынған өсімдік-регенеранттарда кездейсоқ екі еселену 41,2% -ды құрады. F1 гибрид тритикаленің 28 дигаплоид линиясы алынды.

Түйін сөздер: тритикале, гибридтер, гаплоидтық технология, тозаң дақылы, эмбриогенез, андрогенді құрылымдар.