

## 2-бөлім

## 2 раздел

## Section 2

**Биотехнология,  
биохимия,  
өсімдік  
физиологиясы**

**Биотехнология,  
биохимия,  
физиология  
растений**

**Biotechnology,  
biochemistry,  
plant  
physiology**

УДК 575:633.11 «321»

А. Исмагул<sup>1\*</sup>, Г. Исакова<sup>1</sup>, С.С. Елибай<sup>1</sup>, Б. Башабаева<sup>2</sup>, А.И. Абугалиева<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Австралийский Центр Функциональной Геномики Растений (АЦФГР), Аделаида, Австралия

<sup>2</sup>КазНИИ земледелия и растениеводства, АО Казагроинновация МСХ РК, Казахстан

\*E-mail: farming\_center\_kiz@rambler.ru

**Анализ методов гомозиготизации растений в селекции  
и разработка протоколов культуры изолированных микроспор  
Казахстанских сортов пшеницы**

**Аннотация.** В настоящей работе представлен анализ эффективности методов гомозиготизации селекционного материала пшеницы и отработан первичный протокол культуры микроспор на австралийском коммерческом сорте Гладиус. На основе данного протокола введены в культуру микроспоры, выделенные из казахстанских сортов Казахстанская 19, Казахстанская раннеспелая, Карабалыкская 90, Эритроспермум 841 и Целинная 3С. Для всех этих сортов показано деление микроспор, а для сортов Казахстанская 19 и Казахстанская раннеспелая получены эмбриоподобные структуры в культуре in vitro.

**Ключевые слова:** гомозиготизация растений, культура изолированных микроспор пшеницы, деление микроспор в культуре in vitro.

В настоящей работе представлен анализ эффективности методов гомозиготизации селекционного материала пшеницы и отработан первичный протокол культуры микроспор на австралийском коммерческом сорте Гладиус. На основе данного протокола введены в культуру микроспоры, выделенные из казахстанских сортов Казахстанская 19, Казахстанская раннеспелая, Карабалыкская 90, Эритроспермум 841 и Целинная 3С. Для всех этих сортов показано деление микроспор, а для сортов Казахстанская 19 и Казахстанская раннеспелая получены эмбриоподобные структуры в культуре in vitro.

Пшеница является стратегической зерновой культурой Казахстана. Поэтому создание новых сортов, устойчивых к неблагоприятным климатическим условиям, представляется первоочередной научной и важнейшей экономической за-

дачей. К числу наиболее важных абиотических стрессов в Республике Казахстан относятся засуха и засоление почв. Более 50% сельскохозяйственных угодий, занятых посевами пшеницы, подвержены засухе и засолению.

Введение удвоенных гаплоидов (дигаплоидов) позволяет значительно ускорить, и сократить до 3-5 лет, долгосрочный процесс создания и внедрения новых сортов. Вместо инбридинга на протяжении нескольких поколений (обычно шести), этот метод быстро приводит к настоящим гомозиготным растениям (т.е. с идентичными аллелями) в одном поколении. Это гарантирует стабильную наследуемость генетических признаков внутри сорта, дополнительно к ускорению сортового выхода.

Цель настоящего исследования заключалась в оптимизации параметров ведения культуры

микроспор и регенерации растений *in vitro* для мягкой пшеницы сортов Казахстанская 19, Казахстанская раннеспелая, Карабалыкская 90, Эритроспермум 841 и Целинная 3С, характеризующихся максимально стабильной массой 1000 зерен по годам и репродукциям. Эти сорта были выделены по срокам созревания, и по сочетанию соле- и засухоустойчивости с высоким значением длины последнего подколоскового междоузлия и развитием первичных корней.

Наиболее важным и сложным этапом культуры микроспор, является регенерация растений

*in vitro*, после переноса выросших эмбриодоподобных структур на твердую регенерационную среду для получения гаплоидных или удвоенно-гаплоидных растений регенерантов пшеницы, в т.ч. в исследованиях по казахстанскому материалу, (таблица 1). Результаты наших экспериментов показывают необходимость создания и усовершенствования новых протоколов для гомозиготизации генетического материала и определения критических этапов развития культуры *in vitro* для увеличения выхода гаплоидных растений казахстанских сортов пшеницы.

**Таблица 1** - Регенерационная способность генотипов пшеницы и ячменя в экспериментах, проведенных в Казахстане за 2001-2010 гг. [1-9]

Автор	Виды пшениц, генотип	Регенерация, %
1	2	3
[1]	яровая мягкая	11,62 ± 0,09
	озимая мягкая	14,35 ± 0,13
	яровая твердая	не получена
	озимая твердая	6,67 ± 0,67
пшеница		
[2]	Казахстанская 30	39,2 ± 0,3
	Казахстанская 17	28,0 ± 0,2
	Казахстанская 10	61,1 ± 0,3
	Акмола 2	45,4 ± 0,3
	Ишимская 92	35,5 ± 0,3
	Пиротрикс 28	19,2 ± 0,2
[3]	Целинная 3С	40,0 ± 0,3
	Целиноградка	40,9 ± 1,7
	Целинная юбилейная	41,5 ± 1,7
	Пиротрикс 28	40,3 ± 0,9
	Эритроспермум 841	34,3 ± 1,7
	Целинная 60	30,2 ± 2,3
	Саратовская 29	33,9 ± 1,5
	Иртышанка 10	29,6 ± 1,2
	Омская 17	22,0 ± 1,7
	Акмолинка 1	32,1 ± 1,6
Жана-Кызыл	22,4 ± 0,9	
ячмень		
[4]	Днепровский 435	12,8 ± 0,05
	Одесский 100	4,3 ± 0,09
	93/80-1	6,0 ± 0,03
	93/80-3	6,0 ± 0,03
	30/83-4	17,4 ± 0,06
[9]	БГ 1-3/98	26,09 ± 0,93
	БГ 1-4/98	38,80 ± 1,40
	БГ 357	36,36 ± 1,52
	БГ 367	50,0 ± 2,80
	БГ 204/98	50,0 ± 5,0
	БГ-Л3	42,70 ± 2,0
	БГ-Л9	37,30 ± 1,70
	БГ 7-2/97	15,01 ± 0,08
	БГ 6-7/97	22,22 ± 0,15
БГ 6-8/97	12,0 ± 0,07	

Продолжение таблицы 1

1	2	3
пшеница		
[5]	Каз.10 х Т.timopheevi	26,0
	Каз.раннесп. х Т.timopheevi	28,0
	Каз.10 х Т.militinae	26,0
	Каз.раннесп. х Т.militinae	21,0
[6]	Каз. раннеспелая	29,6
	Казахстанская 10	40,9
	Актюбе 92	32,1
	Альбидум 97	40,3
[8]	Алма-Атинская полукарлик.	60,0
	Алма-Атинская высокоросл.	50,0
	Южная 12	52,0
	Алмалы	49,0
	Безостая 1	51,0
	Береке	-
	Прогресс	70,0
Карлыгаш	61,0	
твердая пшеница		
[6]	Каргала 3	40,3
	Каргала 9	30,2
[7]	Алтайка	13,0
	Оренбургская 2	6
	Казах.янтарная	23
	№16470	19
	№16253	18

В наших исследованиях наибольший выход регенерантов был получен для сорта Казахстанская 10 –  $61,1 \pm 0,3\%$  [2]; БГ 367  $50,0 \pm 2,80\%$ , БГ 204/98  $50,0 \pm 5,0\%$  [9]. Отмечены сорта, такие, как – Оренбургская 2, которые характеризовались низким выходом растений-регенерантов [7].

Использование методов дигаплоидизации (ДГ) является наиболее эффективным для ускорения селекционного процесса и получения новых гомозиготных форм. ДГ-методы – это культивирование репродуктивных органов растений с целью получения гаплоидных растений. Использование гаплоидных технологий расширяет генетическую основу селекции пшеницы, т.к. они позволяют увеличить частоту новых генных комбинаций. Однако следует отметить, что при крайней привлекательности, сама методика получения гаплоидных, а затем и дигаплоидных линий сопряжена со значительными трудностями теоретического и методологического характера. Наиболее успешно, особенно для злаков, применяется методика культивирования пыльников. Именно эта технология стала основной при получении большинства дигаплоидных линий в Казахстане.

Однако многие проблемы экспериментальной гаплоидии остаются открытыми, и это является сдерживающим фактором для практического использования дигаплоидных форм в селекционных

программах и их регламентации по этапам селекционного процесса (таблица 2).

Одним из приоритетных направлений биотехнологии растений является экспериментальная гаплоидия. Эта технология позволяет за короткое время получать в культуре изолированных пыльников и микроспор гомозиготные линии, использование которых в селекционных программах значительно сокращает время выведения новых высокопродуктивных сортов. Использование гаплоидии ограничивают такие факторы, как низкая частота эмбриогенеза и регенерации растений, высокий процент альбиносов среди получаемых регенерантов, а также потеря каллусом морфогенетической потенции при длительном культивировании. Метод дигаплоидизации с использованием пыльников пригоден в целом, но не удовлетворяет по масштабности и выходу, так как его эффективность составляет в среднем 25-30%, а максимально 40% по сравнению с культурой микроспор.

Решение проблем экспериментальной гаплоидии непосредственно связано с изучением цитоэмбриологических, физиологических и биохимических закономерностей процессов морфогенеза и регенерации растений в культуре репродуктивных клеток зерновых злаков. В ряде работ по результатам цитоэмбриологических исследований

Таблица 4 - Использование дигаплоидов злаковых культур в селекции

Гибриды первого и второго поколения	В старших звеньях селекционного процесса	На уровне сортов	Использование в генетике
<p>Максимальный эффект при культивировании пыльников и микроспор ячменя и пшеницы отмечен для гибридных форм и для повышения эффективности получения гаплоидов предлагается использование техники дигаплоидов не из F1, а из F2, хотя при этом наблюдается некоторый проигрыш во времени, но повышается вероятность отбора лучших рекомбинантов. Максимальный выход андрогенных структур при культивировании пыльников и микроспор у ячменя и пшеницы наблюдается на поздней одноядерной или ранней двуядерной стадии развития микроспор. При этом существенное значение имеет плотность посадки пыльников на питательные среды. К повышению частоты андрогенеза приводит культивирование пыльников и микроспор пшеницы и ячменя в жидкой питательной среде с различными органическими добавками и оптимальным сочетанием фитогормонов. Для ячменя характерна высокая индукция андрогенных структур, но низкая регенерационная способность и высокий процент альбиносов среди полученных регенерантов.</p>	<p>Наиболее предпочтительно для селекции. Среди гаплоидных регенерантов из F6 и F7 немало разнообразного и ценного материала (т.к. при этом повышается частота возникновения рекомбинантных генотипов). Нет необходимости получать большое количество дигаплоидных линий.</p>	<p>Дигаплоиды представляют собой константные, нерасщепляющиеся формы, пригодные для использования в качестве сортов или как исходный материал для дальнейшей работы.</p>	<p>Гаплоидные растения позволяют легко обнаружить рецессивные генные мутации, поскольку они не маскируются доминантными аллелями. Это резко ускоряет селекционный процесс, т.к. облегчает отбор полезных генов. При этом вероятность получения желаемой генной комбинации у гаплоидов выше, чем у диплоидов. Из гаплоидных растений путем колхицинирования получают удвоенные гаплоидные линии или дигаплоиды (doubled haploid, DH). Для анализа изменений в геномах дигаплоидных линий используются различные молекулярные методы, в том числе и RAPD метод (RAPD, Random Amplified Polymorphis DNA), основанные на анализе полиморфизма длины фрагментов ДНК, амплифицируемых с помощью случайных праймеров.</p>

описаны основные морфологические пути, приводящие к регенерации растений в культуре изолированных пыльников и микроспор у злаков. Однако нет единого мнения о возможных путях деления микроспор, эмбриоидогенеза, о фазах (этапах) андрогенеза, на которых возможна регенерация зеленых гаплоидных или дигаплоидных проростков. Также до конца не выяснен вопрос о возникновении регенерантов-альбиносов и принципиальной возможности восстановления у них фотосинтетического аппарата до или после колхицинирования. Остается открытым вопрос о генетической детерминации микроспор по реализации спорофитной программы *in vitro*.

В настоящее время существует необходимость разработки протоколов на базе других прогрессивных методологий, таких, как культуры микроспор, по которым есть мировые результаты на других злаках, прежде всего на ячмене, и от-

дельные положительные результаты отмечены на австралийской и германской гермоплазме пшеницы.

Использование этих технологий в Казахстане усложняется тем, что казахстанские сорта пшеницы генотипически отличны от австралийских и европейских, поэтому разработка протоколов культуры изолированных микроспор казахстанских сортов пшеницы весьма актуальна для развития селекции в нашей стране.

Производство гаплоидных растений через культуру изолированных микроспор является очень важным орудием для ускорения селекции растений [10, 11]. Растения-гаплоиды, полученные из микроспор обеспечивают самый быстрый способ получения гомозиготных и гомогенных линий важных сельскохозяйственных культур. Эта технология позволяет также выделение рецессивных мутантных линий в гаплоидных ми-

кроспорных эксплантах для их изучения в гомозиготных растениях. Культура изолированных микроспор является, кроме того, и отличной системой для изучения механизмов микроспорной индукции и процессов эмбриогенеза, обеспечивая платформу для постоянно расширяющегося спектра молекулярных исследований.

Культура изолированных микроспор, на сегодняшний день, представляет собой самый надежный и эффективный метод получения удвоенных гаплоидов. В отличие от культуры пыльников, в которых присутствие стенок пыльников может привести к развитию диплоидных соматических каллусов и растений, культура микроспор производит только гаплоидные или дигаплоидные линии. В то же время, пока не существует универсальных и отработанных протоколов, которые позволяли бы использовать этот метод для широкомасштабного производства удвоенных гаплоидов пшеницы. В связи с этим данный совместный проект по созданию протоколов культуры микроспор для казахстанских сортов пшеницы весьма актуален и для австралийских ученых.

Разработка протокола культуры изолированных микроспор для получения удвоенных гаплоидов казахстанской пшеницы базируется на отработке процедур стрессовой предобработки пыльников, изолирования и очищения микроспор, индукции деления и регенерации гаплоидных и дигаплоидных растений для казахстанских сортов пшеницы.

Согласно литературным данным, для того, чтобы «заставить» микроспоры делиться и впоследствии получить гаплоидные и дигаплоидные

растения, необходимо создать определенные условия их культивирования. Во-первых, было показано, что микроспоры должны быть в стадии поздней одноядерной или ранней двуядерной стадии развития. Во-вторых, для индукции деления микроспор и дальнейшего формирования колоний и зародышеобразных структур, которые способны регенерировать в растения, культуры необходимо подвергнуть стрессу. Именно под воздействием экстремальных стрессовых условий, таких, как холодовая обработка пыльников, «голодание», термальный шок можно добиться изменения генетической программы микроспор, как половых клеток и «превратить» их в соматические клетки, способные делиться и производить впоследствии фертильные гаплоидные / гомозиготные растения [12].

Хотя протоколы для изолирования и культивирования микроспор злаковых различаются от лаборатории к лаборатории, основные этапы выращивания растений доноров, как подготовка цветочных органов, выделение микроспор, культивирование делящихся микроспор, регенерация эмбрионов, так и удвоение хромосом, остаются неизменными.

Первичная отработка протокола культуры микроспор проводилась на австралийском коммерческом сорте Гладиус, который выращивается в теплицах АЦФГР в течение всего года. Были протестированы условия предобработки, изолирования и очищения микроспор в градиенте мальтозы. Культура изолированных микроспор проводилась в жидких питательных средах А и В с нашими модификациями.

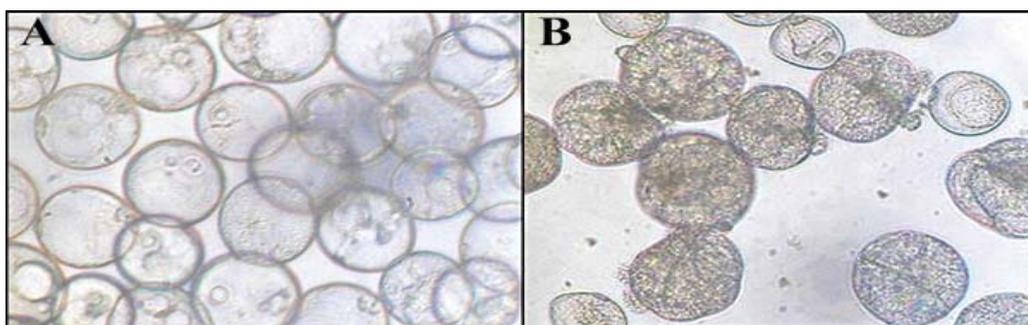
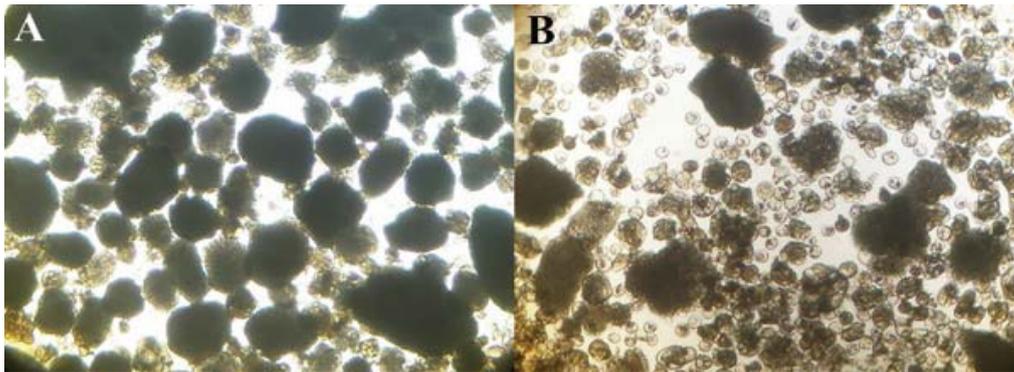


Рисунок 1 – Свежевыделенные (А) и делящиеся (В) микроспоры пшеницы



**Рисунок 2** – Делящиеся колонии и эмбриоподобные структуры, полученные в культуре изолированных микроспор казахстанской пшеницы сортов Казахстанская 19 (А) и Казахстанская Раннеспелая (В)

Показано, что использованный протокол позволяет получить высокоочищенные культуры микроспор, которые делятся и развиваются в среде А (рисунок 1).

Данный протокол был апробирован на казахстанских сортах Казахстанская раннеспелая, Карабалыкская 90, Казахстанская-19, Целинная-3С и Эритроспермум-841.

Незрелые соцветия с микроспорами, находящимися в стадии поздней одноядерной или ранней двуядерной стадии развития, срезали с донорских растений и помещали в колбу с водопроводной водой и ставили в холодильник с дневным освещением. Температура колебалась в пределах от -2 до +5°C. Сравнивали различное время холодной обработки: от 7 до 28 дней (согласно различным литературным источникам).

После холодной обработки соцветий проводили выделение пыльников уже в стерильных условиях. Изолированные пыльники помещали в 30 или 60 мм пластиковые чашки Петри (в зависимости количества пыльников) со средой В.

Далее материал подвергался термальной обработке – чашки с пыльниками ставили в темный термостат на +33°C на 4 полных дня. Параллельно, также асептически, выделяли несколько завязей (от 10 до 20 штук в зависимости от количества материала, используемого в том или ином эксперименте). Выделенные завязи культивировали в среде А при +25°C также в темноте.

После термального шока проводилось выделение микроспор. Вся процедура осуществлялась в стерильных условиях. Пыльники гомогенизировали, затем осаждали микроспоры центрифугированием и далее интактные клетки флотировали в градиенте 20% мальтозы.

Было также найдено, что для успешного эксперимента необходимо получить и культивировать

не менее 100 000 живых микроспор на 1 мл среды. Для этого рекомендуется брать не менее 10-12 здоровых соцветий.

Предварительно нами были протестированы несколько вариантов протокола по оптимизации времени и условий по предварительной обработке микроспор и определены подходящие параметры, которые проверены на двух казахстанских сортах – Казахстанская 19 и Казахстанская Раннеспелая. Получены делящиеся колонии и эмбриоподобные структуры (рисунок 2). Выделены микроспоры и введены в стерильную культуру с первичным делением микроспор сорта Карабалыкская 90, Целинная-3С и Эритроспермум-841.

Следующим, наиболее важным и сложным этапом является регенерация растений *in vitro*, после переноса выросших эмбриоподобных структур на твердую регенерационную среду для получения гаплоидных или удвоенно-гаплоидных растений регенерантов пшеницы. В наших первых экспериментах мы протестировали 10 вариантов сред с различными комбинациями фитогормонов и питательных добавок. Показано, что для регенерации растений важна стадия развития эмбриоподобных и каллусных структур, а также и баланс в среде фитогормонов, таких, как зеатин и гибберелловая кислота. Разработка эффективной системы регенерации казахстанских сортов, в настоящее время, находится в стадии отработки.

Очень важным моментом является удвоение хромосом в микроспорах. Показано, на примере ячменя, что до 70% микроспор могут, в процессе культивирования, спонтанно удваивать число хромосом. Для пшеницы процент спонтанного удвоения хромосом ниже. В наших экспериментах удвоение произошло в 64% растений регенерантов. Анализ плоидности производился с использованием давленных препаратов из кончиков корней (рисунок 3).

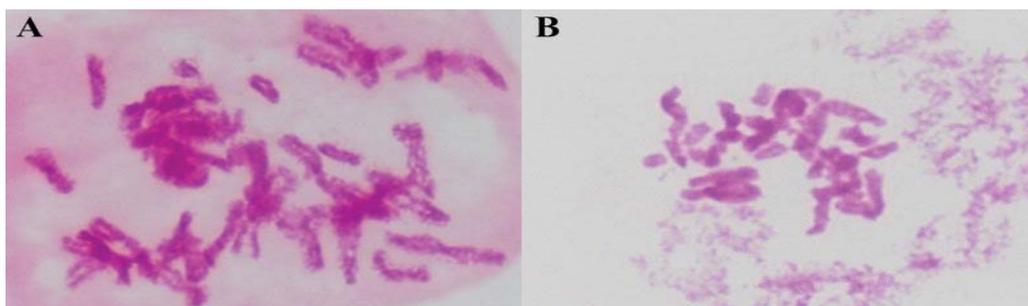


Рисунок 3 – Оценка плоидности растений регенерантов. А-диплоид, Б-гаплоид

Таким образом, оптимизированы условия культивирования микроспор и регенерации растений *in vitro* для сортов мягкой пшеницы Казахстанская 19, Казахстанская раннеспелая, Карабалыкская 90, Эритроспермум 841 и Целинная 3С, районированных в различных посевных зонах Республики Казахстан.

На основе проведенных работ разработан первичный протокол получения гаплоидов пшеницы из культуры изолированных микроспор.

### Литература

- 1 Жамбакин К.Ж. Гаплоидная технология селекции пшеницы Казахстанских агроэкоципов: дис. ... канд. биол. наук: 03.00.07. - Алматы, 1992.
- 2 Годовой отчет отдела биотехнологии ТОО «КазНИИЗиР»: рук. Аbugалиева А.И. - Алматы, 2000. - № ГР 0107РК00421
- 3 Какимжанова А.А. Создание исходных форм яровой мягкой пшеницы устойчивых к стрессовым факторам: автореф. ... канд. биол. наук: 03.00.12. - Алматы, 2000. - 26 с.
- 4 Терлецкая Н.В. Получение исходного материала ячменя для селекции на засухоустойчивость: автореф. ... канд. биол. наук: 03.00.12. - Алматы, 1996. - 25 с.
- 5 Абекова А.М. Создание исходного материала для селекции пшеницы методом эмбриокультуры. – дис. ... канд. с.-х. наук: 06.02.01 / КазНИИЗиР. - Алматы, 2005. – 124 с.
- 6 Башабаева Б.М. Совершенствование регламентов клеточной селекции для создания перспективных соматоклональных линий пшеницы: автореф. ... канд. биол. наук: 03.00.10. - Алматы, 2006. – 22 с.
- 7 Каниев Б.К. Генетические аспекты селекции пшеницы в культуре *in vitro*: автореф. ... канд. биол. наук: 03.00.10. - Алматы, 2001. – 26 с.
- 8 Карабаев М. Культивируемые клетки пшеницы и кукурузы: физиологические и биотехнологические аспекты: автореф. ... канд. биол. наук: 03.00.10. - Душанбе, 1994. – 49 с.
- 9 Турашева С.К. Совершенствование биотехнологических методов создания андрогенных дигаплоидов мягкой пшеницы: автореф. ... канд. биол. наук: 03.00.10. - Астана, 2003. – 28 с.
- 10 Patel M., Darvey N.L., Marshall D.R., Berry J.O. Optimization of culture conditions for improved plant regeneration efficiency from wheat microspore culture // *Euphytica*. - 2004. – V. 140. – P. 197–204.
- 11 Ferrie A.M.R., Caswell K.L. Isolated microspore culture techniques and recent progress for haploid and doubled haploid plant production // *Plant Cell Tiss.Organ.Cult.* – 2011. – V. 104. – P. 301–309.
- 12 Touraev A., Vicente O., Heberle-Bors E.. Initiation of microspore embryogenesis by stress // *Trends Plant Sci.* - 1997. – V. 2. – P. 297-302.

А. Исмагул, Г. Исакова, С.С. Елибай, Б. Башабаева, А.И. Аbugалиева

### Қазақстандық бидай сорттарының жекеленген микроспора мәдениетінің хатамасын өңдеу және селекцияда өсімдіктерді гомозиготизациялау әдістерді талдау

Австралиялық Гладиус коммерциялық сорттарының микроспорына алғашқы рет хаттама жасалды. Соның негізінде Қазақстан сорттарынан Казахстанская 19, Казахстанская раннеспелая, Карабалыкская 90, Эритроспермум 841, Целинная 3С жасанды микроспоралар енгізілді. Барлық бес сорттан микроспоралар алынды, Казахстанская 19, Казахстанская раннеспелая сорттан эмбрио-ұқсайтын бөлшектер пайда болды.

**Түйін сөздер:** өсімдіктерді гомозиготизациялау, бидай жекеленген микроспора мәдениеті, *in vitro* жағдайында микроспоралардың бөлінуі.

A. Ismagul, G. Iskakova, S.S. Elibay, B. Bashabaeva, A.I. Abugalieva

**Analysis of plants homozygosity methods in breeding and developmen of microspore culture protocols for Kazakhstan wheat breedes**

In the current work analysis of methods of inducing homozygosity in plants as well as the primary protocol of microspore culture for the Australian commercial wheat cv. Gladius are presented. Microspore cultures of the Kazakh cultivars Kazakhstanskaya 19, Kazakhstanskaya rannespelaya, Karabalykskaya 90, Erytrospermum 841, Celinnaya 3C were established based on the new protocol. Microspore divisions could be induced for all tested wheat cultivars. Embryo-like structures were obtained for cvs Kazakhstanskaya 19 and Kazakhstanskaya rannespelaya.

**Keywords:** homozygosity of plants, isolated microspore culture, in vitro microspore division.