МРНТИ 62.33.29

Р.С. Ержебаева

ТОО «Казахский научно-исследовательский институт земледелия и растениеводства», Алмалыбак, Алматинская область, Казахстан
(E-mail: raushan_2008@mail.ru)

Технология культуры изолированных микроспор тритикале (× *Triticosecale* Wittmack)

Аннотация: Тритикале (× *Triticosecale* Wittm.) является синтетическим гибридом пшеницы (*Triticum*) и ржи (*Secale*) и сочетает в себе ценные черты обоих родительских видов: высокая кормовая ценность и низкие требования к возделыванию. Для развития и ускорения селекции данной кормовой культуры в Казахстане актуальным является использование такого битехнологического метода как андрогенез. Растения-дигаплоиды, полученные из микроспор обеспечивают самый быстрый способ получения гомозиготных линий. Культура изолированных микроспор (КИМ) – более трудоемкая технология по сравнению с культурой пыльников и требует оптимизации всех факторов и условий на каждом этапе процедуры. Для внедрения технологии КИМ в отечественные селекционные программы необходимо применение уже имеющихся протоколов и отработка критических точек непосредственно на селекционном материале тритикале. Целью данного исследования является оптимизация всех этапов современного метода гаплоидной технологии культуры изолированных микроспор на сортах и линиях тритикале отечественной селекции и получение дигаплоидных линий. Технология культуры изолированных микроспор была апробирована на 6 образцах тритикале (Т-434-2, Т-968, Т-45, Зернокормовое 5, ЯТХ-18-11, ЯТХ-327-11). Отработаны критические точки протокола. Подобрана питательная среда для индукции эмбриогенеза (mW14) при использовании которой получено до 233 АС и 12,2 шт. зеленых растений на 100 пыльников. Процесс спонтанного удвоения составил 23,1%. Комбинированное применение (спонтанное удвоение, колхицинирование) позволило повысить производство дигаплоидных линий до 50,6%. Данный процентный выход позволяет обеспечить селекционеров достаточным количеством дигаплоидных линий из одной гибридной комбинации или линии.

Ключевые слова: тритикале, культура изолированных микроспор, андрогенные структуры, регенерация, плоидность, дигаплоидное растение.

DOI: https://doi.org/10.32523/2616-7034-2019-128-3-24-33

Введение. Тритикале (× *Triticosecale* Wittm.) является одним из наиболее важных зерновых культур в Европе и некоторых других регионах мира. Будучи синтетическим гибридом пшеницы (*Triticum*) и ржи (*Secale*), он сочетает в себе ценные черты обоих родительских видов: высокая кормовая ценность и низкие требования к возделыванию. Как и для других сельскохозяйственных культур, использование и расширение площадей тритикале зависит от селекционных программ и обеспечения новыми, высокоурожайными сортами с улучшенной полезностью или высокой адаптивностью к условиям окружающей среды. Традиционные программы селекции относительно трудоемки, поскольку они основаны на нескольких этапах скрещивания, инбридинга и отбора в гибридных популяциях. Для тритикале этот процесс длится от 10 до 12 лет. Регистрация нового сорта занимает еще несколько лет. Изменчивость на генетическом уровне может быть исправлена за короткое время с использованием технологии гаплоидии, путем получения полностью гомозиготных линий из гетерозиготного исходного материала. Сегодня этот метод считается незаменимым инструментом в селекционных программах тритикале Европы [1]. Применение данной технологии актуально и для Казахстана, так как селекция этой перспективной культуры только развивается. Однако успешное использование гаплоидной технологии зависит от производства большого количества гаплоидных растений и эффективного удвоения хромосом.

В настоящее время культура изолированных микроспор является наиболее прогрессивным методом андрогенеза. Микроспоры могут быть выделены в больших количествах, обеспечивая

множество потенциально эмбриогенных одиночных гаплоидных клеток. Исключается возможность образования каллусов и эмбриоидов из стенок пыльника и их дальнейшая регенерация.

По данным исследователей эффективность основных методов андрогенной технологии тритикале зависит от таких факторов как генотип, условия выращивания, время сбора донорных растений, использование предварительной обработки (холод, тепло, голодание) [2-6] и состав питательной среды [2,3,6,7,8]. Наиболее успешными и рекомендуемыми питательными средами для КИМ тритикале являются модифицированные среды: W14mi [9], m190 -2 [2,5], CHB-3 [3] и C17[1].

КИМ – более трудоемкая технология по сравнению с культурой пыльников и требует оптимизации всех факторов и условий на каждом этапе процедуры. Для внедрения технологии КИМ в селекционных программах необходимо применение уже имеющихся протоколов и отработка критических точек непосредственно на селекционном материале казахстанской селекции тритикале.

Цель данного исследования – оптимизация всех этапов современного метода гаплоидной технологии культуры изолированных микроспор на сортах и линиях тритикале отечественной селекции и получение дигаплоидных линий.

Материал и методика исследований. В качестве материала исследований были использованы селекционные линии питомника конкурсного сортоиспытания и сорта озимой (Т-968, Т-45, Т-434, Зернокормовое 5) тритикале селекции Казахского НИИ земледелия и растениеводства (КазНИИЗиР) и яровой тритикале совместной селекции КазНИИЗиР с Институтом растениеводства им. Юрьева (г.Харьков) – ЯТХ-327-11 и ЯТХ-18-11.

Донорные растения были выращены в полевых условиях на научном полевом стационаре отдела зерновых культур КазНИИЗиР. Незрелые соцветия отбирались с донорных растений тритикале в фазе флагового листа, не вышедшего из листового влагалища, с микроспорами находящимися на средней и поздней одноядерной стадиях развития. Оценка стадии развития микроспор определялась по общепринятой методике временных давленых препаратов на микроскопе Meiji Techno серии MT4000.

Предварительная холодовая обработка проводилась в течение 14 дней в климатической камере BINDER KBWF 720 при температуре +4 ° C [9].

Стерилизация колосьев. Колосья полевых растений после холодовой обработки стерилизовали тремя способами: 1 способ – 2 % раствор гипохлорида натрия с каплей Твин 80 в течение 20 мин [2,9]; 2 способ – 70% раствором этанола в течение 1 мин и 10% гипохлоридом натрия [10]; 3 способ - 0,1% раствора дихлорида ртути в течение 6 минут на шейкере [11]. После воздействия стерилизующего агента экспланты трижды промывали стерильной дистиллированной водой в ламинарном боксе по 3 минуты. *Культивирование изолированных микроспор* осуществлялось по протоколу для пшеницы описанной C. Lantos [8]. Из стерилизованных соцветий острым пинцетом (ISOLAB, длина 105 мм) были выделены пыльники и перенесены в пластиковые чашки Петри (диаметром в 55 мм), содержащие 5 мл 0,3 М раствора маннита и 200 мг/л антибиотик (цефотаксим). В каждую чашку Петри введено по 100 пыльников, которые в течение трех дней инкубировались при температуре 32 ° C в темноте. Стерилизация пинцетов проводилась каждые 2 мин. электрическим стерилизатором SteriMax (температура стерилизации 900-950 ° C).

После инкубации проведена очистка и изоляция микроспор согласно протоколу [8] с небольшими модификациями описанными в разделе результаты.

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

Для индукции эмбриогенеза было использовано 3 вида модифицированных питательных сред:

- mW14 [12] + 1000 мг/л глутамин+ 90 г/л мальтозы [13], 2 мг/л 2,4-Д + 0,4 мг зеатин +50 г/л фиколл 400 + 2 мг/л аскорбиновой кислоты, pH – 6,2

- mCHB [14] + 0,5 мг/л 2,4-Д + 0,4 мг зеатин + 90 г/л мальтозы +500 мг/л Phytagel ™ (SIGMA) + 2 мг/л аскорбиновой кислоты, pH – 6,2

- mMS [15] + 2 мг/л 2,4Д, + 0,5 мг/л кинетин + 90 г/л мальтозы +50 г/л фиколл + 4 мг/л аскорбиновой кислоты, pH – 6,4 [11]

Для регенерации была использована стандартная среда Мурасиге и Скуга (MS) с добавлением зеатин 3 мг/л, 30 г/л сахарозы и 3 г/л Phytogel ^{TM}.

Для корнеобразования стандартная среда MS с добавлением 0,5 г/л казеина гидролизата, 20 г/л сахарозы, 2 мг/л ИУК, 4 г/л Phytagel ^{TM} [11].

Определение плоидности проводили на анализаторе плоидности Cy Flow Ploidy Analyser (Sysmex). Плоидность определяли перед переносом растений-регенерантов в почву. Подготовку проб растений для анализа проводили с использованием набора CyStain®UV Precise P.

Адаптацию растений-регенерантов к почве проводили в климатической камере BINDER KBWF 720, где поддерживались температурный режим 23-24 ^{0}C, освещение 8-10 тыс. люкс и 80% влажности. В течение первых двух недель (период адаптации) растения-регенеранты опрыскивали раствором фитогормонов (0,5 мг/л кинетин, 2 мг/л гиббереллиновая кислота, 3 мг/л никотинамид) и поливали раствором воды, содержащим макро- и микро- соли, хелат железа по прописи Мурасиге и Скуга.

Обработка колхицином. Для удвоения хромосом корни гаплоидных растений были погружены в 0,05% водный раствор колхицина с добавлением 2% ДМСО и 10 мг/л гиббереллиновой кислоты в течение 5 ч при освещении. После обработки корни были промыты проточной водой и растения высажены в почву.

Статистическая обработка данных выполнена с использованием программы *Statistica 10 (Портативная версия).* Проведен дисперсионный анализ *ANOVA* (*Analysis of variation*).

Результаты исследований.

Технология культуры изолированных микроспор на первоначальном этапе была апробирована на 6 образцах тритикале (Т-434-2, Т-968, Т-45, Зернокормовая 5, ЯТХ-18-11, ЯТХ-327-11). Были отмечены 3 критические точки протокола: 1) высокая контаминация (до 40%) при культивировании пыльников на растворе маннита и при изоляции микроспор; 2) трудоемкий процесс изоляции микроспор; 2) низкий уровень регенерации зеленых растений. *Стерилизация эксплантов.* Отработана первая критическая точка протокола по стерилизации эксплантов, изолированию пыльников и введению в культуру *in vitro.* Использование колосьев тритикале, выращенных и собранных в полевых условиях, приводили к высокому уровню заражения раствора D-маннита (до 40-45%). Эксперимент с тремя способами стерилизации показал, что при стерилизации 2% раствором гипохлорита натрия зафиксировано грибковое и бактериальное заражение в 40% чашек Петри с пыльниками в растворе D-маннита (таблица 1).

Таблица 1 – Отработка процесса стерилизации донорных колосьев тритикале

Наименование	Количество посаженных чашек Петри на каждый способ/%	Количество чашек Петри с контаминацией /%		
		1 способ	2 способ	3 способ
Т-434-2	20/100	6/30	7/35	1/5
Т-968	20/100	8/40	4/20	2/10
Т-45	20/100	9/45	8/40	1/5
Зернокормовое 5	20/100	8/40	7/35	2/10
ЯТХ-18-11	20/100	10/52	6/30	2/10
ЯТХ-327-11	20/100	7/35	5/25	1/5
Итого:	***120/100***	***48/40***	***37/30,8***	***9/7,5***

Второй способ стерилизации обеспечивал до 69,2% стерильности. Использование 0,1% раствора дихлорида ртути и добавление в раствор маннитола антибиотика цефотаксим исключило процесс контаминации и позволило получить 92,5% чистоту опыта.

Проведенный дисперсионный анализ, показал значимые (F = 45,3) и достоверные (P =0,000) различия между средними значениями трех способов стерилизации колосьев тритикале, таблица 2.

Таблица 2 – Дисперсионный анализ различных способов стерилизации эксплантов *ANOVA (Analysis of variation)*

Эффект	Средний квадрат (*MS эффект)*	F - критерий	P - уровень
Intercept	490,88	329,7	0,0000
Способ стерилизации	67,3	45,3	0,0000
Ошибка	1,4		

Отработан второй важный этап данной технологии – изолирование микроспор. Осуществлен переход от измельчения пыльников на гомогенизаторе на гомогенизацию с использованием стеклянной палочки и стерильного металлического сита (диаметр внутренней окружности 4,5 см) с диаметром пор 1 мм (рисунок 1б). Полученный гомогенат отфильтровывали через нейлоновый фильтр с размером поры 100 мкм (Tokyo Screen Co, LTD, Japan) для удаления крупных частиц. Фильтрат суспензии тканей и микроспор центрифугировали (центрифуга CM-6M, Sky Line) при скорости 100 g в течение 3 минут. После удаления супернатанта к осадку добавляли 21% раствор мальтозы (SIGMA) и 0,3 М маннита D для создания градиента плотности. После центрифугирования в течение 5 минут при скорости 100 g жизнеспособные микроспоры собираются на границе маннит/мальтоза, образуя «кольцо» (рисунок 1в). Интактные микроспоры собирали стерильной пипеткой Пастера и переносили в чашки Петри диаметром 3 см с добавлением питательной среды для индукции эмбриогенеза объемом 1,5 мл. Плотность микроспор доводилась до $1{,}5x10^4$–$2x10^4$ на 1 миллилитр питательной среды. В чашку с микроспорами добавляли завязи (8-10 шт/чашка Петри, которые культивировались отдельно в той же питательной среде без термальной обработки и антибиотик цефотаксим в концентрации 200 мг/л.

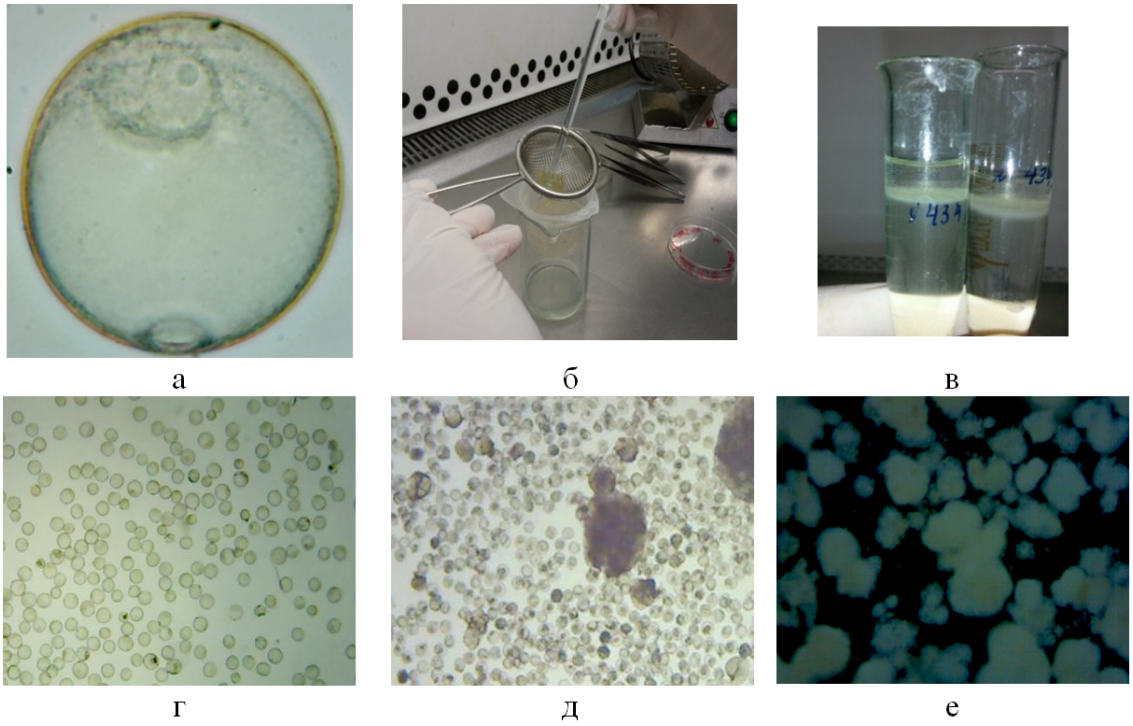

Рисунок 1 – **Очистка и культивирование микроспор в КИМ**
а - микроспора (увеличение х1000) после содержания в манните, б – гомогенизация пыльников на металлическом сите; в - «кольцо» живых микроспор в градиенте манит/мальтоза, г – живые микроспоры из образованного «кольца» (увеличение х40); д, е – формирование андрогенных структур (увеличение х40)

Отработана третья критическая точка протокола. Питательные среды, подобранные для индукции эмбриогенеза в культуре пыльников тритикале были применены в культуре изолированных микроспор. Наиболее высокий уровень образования андрогенных структур был зафиксирован на питательной среде mW14 (233АС/100 пыльников), таблица 3. Из андрогенных структур пересаженных из среды mW14 на агаризованную среду для регенерации в среднем регенерировало до 12,2 зеленых растений/100 пыльников. Технология культуры изолированных микроспор на питательной среде mCHB так же показала высокие результаты (таблица 3). В среднем по разным генотипам на данной питательной среде формировалось 173,3 АС/100 пыльников и регенерировало 10,2 шт. зеленых растений (рисунок 2а). Наиболее высокая регенерация зеленых растений по всему опыту была отмечена у генотипа Т-45 – 16 зеленых растений /100 пыльников.

Таблица 3 – Эмбриогенез и регенерация зеленых растений в культуре изолированных микроспор тритикале

Наименование	Кол-во чашек Петри на каждую среду/ общее число	mW14		mCHB		mMS	
		АС/100 пыльников	зеленых растений/ 100 пыльников	АС/100 пыльников	зеленых растений/ 100 пыльников	АС/100 пыльников	зеленых растений/ 100 пыльников
Т-434-2	5/15	200±30,4	14±4,5	100±26,7	12±3,6	90±16,8	5±1,4
Т-968	5/15	250±60,5	15±3,2	200±70,5	10±4,4	100±25,3	5±0,5
Т-45	5/15	300±65,4	16±4,6	220±15,6	14±4,8	150±20,7	4±1,6
Зернокормовое 5	5/15	150±24,7	14±7,2	110±20,5	12±3,2	100±30,2	6±1,1
ЯТХ-18-11	5/15	150±32,5	6±3,8	160±40,8	8±5,7	180±22,1	2±1,8
ЯТХ-327-11	5/15	350±20,6	8±5,5	250±34,5	5±4,6	200±30,4	2,0±0,4
сред.знач	**30/90**	**233**± 74,5	**12,2**± 3,7	**173,3**± 55,3	**10,2**± 2,9	**136,7**± 42,6	**4,0**± 1,5

Проведенный дисперсионный анализ, показал значимые и достоверные различия между средними значениями образования андрогенных структур (Р= 0,059) и регенерации зеленых растений (Р=0,000) на трех различных питательных средах (таблица 4).

Таблица 4 – Дисперсионный анализ (*ANOVA) результатов* эмбриогенеза и регенерации растений

Эффект	Средний квадрат (*MS эффект)*	F - критерий	P - уровень
Эмбриогенез			
Intercept	590422,2	141,47	0,0000
Питательная среда	14288,9	3,42	0,0595
Ошибка	4173,3		
Регенерация зеленых растений			
Intercept	1386,8	137,16	0,0000
Питательная среда	108,7	10,75	0,0012
Ошибка	10,1		

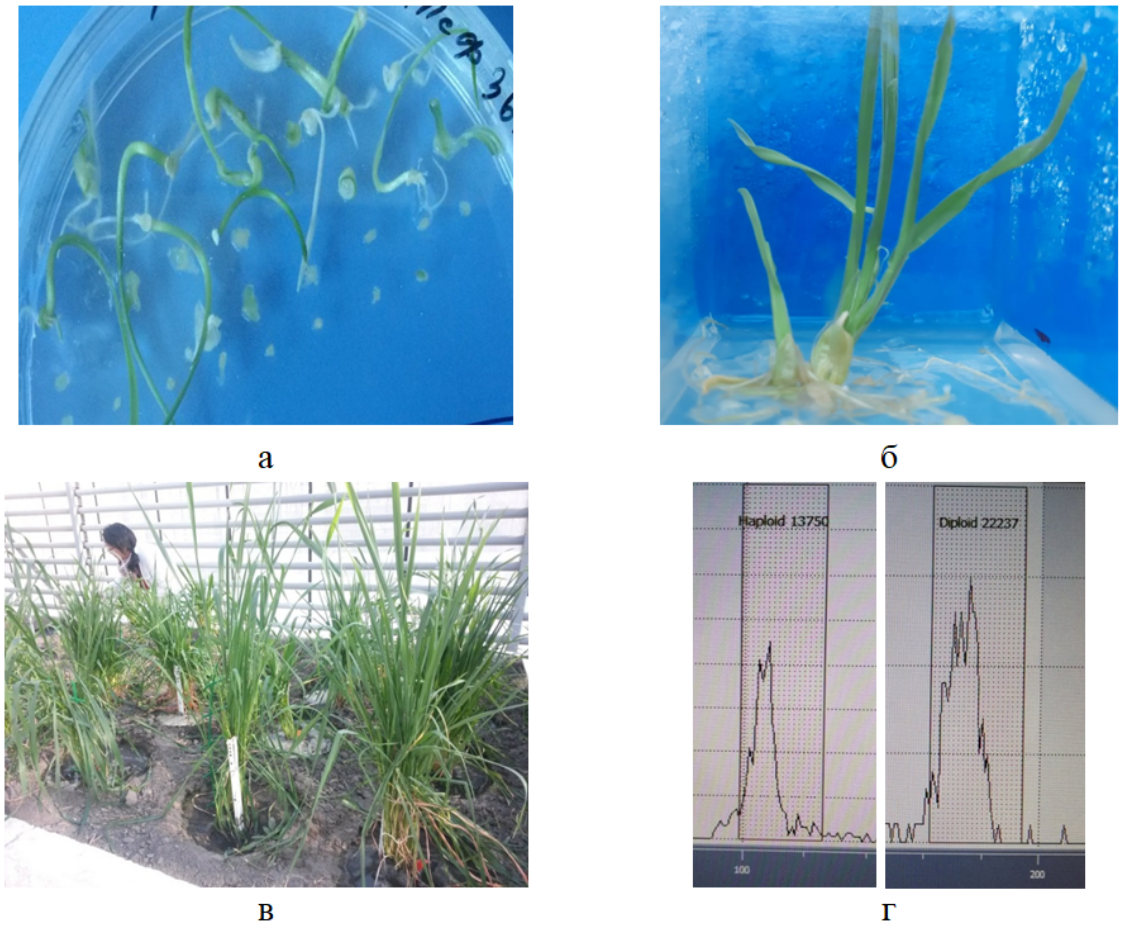

Рисунок 2 – **Этапы КИМ по проработке зеленых растений и анализу плоидности**
а – регенерация зеленых растений; б – укоренение растений; в – дигаплоидные растения тритикале в теплице; г – анализ плоидности

Хорошо укорененные растения были подвергнуты определению плоидности. Определение плоидности у 320 растений-регенерантов тритикале показало, что спонтанное удвоение зафиксировано у 74 растений, что составляет 23,1% (рисунок 2 г). 246 зеленых растений являлись гаплоидными. Все гаплоидные растения перед высадкой в грунт были обработаны раствором 0,1% колхицина для стимулирования удвоения хромосом.

74 дигаплоидные линии, полученные в результате спонтанного удвоения и растения после колхицинирования были адаптированы к грунту в условиях климатической камеры. В дальнейшем в тепличных условиях доведены до семян (рисунок 2 в). Анализ образования семян у колхицинированных растений показал только частичное формирование семян у 88 растений (3-5 зерен/колос). Гаплоидные растения были стерильными и семян не формировали. Все полученные дигаплоидные линии переданы в селекционный отдел для дальнейшей селекционной проработки.

Обсуждение. В технологии культуры изолированных микроспор очень важным фактором является соблюдение асептических условий, так как пассаж пыльников ведется в чашках Петри с достаточно большой поверхностью (диаметр 3,5 см) жидкой питательной среды. Изолирование из колоса и пассаж в одну чашку Петри 100 пыльников занимает в среднем 6-7 минут. Исследователи в большинстве случаев используют для стерилизации раствор гипохлорита натрия, гипохлорита кальция и спирт как более доступные стерилизующие агенты и спирт [1, 10, 16]. Однако при использовании в технологии КИМ полевого материала применение данных агентов показало свою среднюю эффективность. В наших экспериментах применение в качестве стерилизующего агента 0,1% дихлорида ртути и стерилизация пинцетов стерилизатором SteriMax позволили исключить процесс контаминации до 93%.

КИМ – более трудоемкая технология по сравнению с культурой пыльников и требует оптимизации всех факторов и условий на каждом этапе процедуры. Исследователями для гомогенизации используются различные виды гомогенизаторов [10, 14] с отдельной посудой и элементами гомогенизации, которые необходимо стерилизовать. После гомогенизации суспензия фильтруется через нейлоновые сита. В наших экспериментах, при использовании упрощенного элемента гомогенизации металлическое сито и нейлоновый фильтр сразу помещаются на химический стакан и гомогенат проходит фильтрацию без потерь микроспор.

Благоприятное влияние на развитие микроспор и важность правильного подбора плотности микроспор в питательной среде в виде суспензии были описаны для различных культур. У зерновых культур эти плотности варьировали от $4x10^4$ в 1 мл среды в ячмене [17] и в тритикале до $1x\ 10^5$ в тритикале [2].

Манипуляции с плотностью содержания микроспор, а также плотностью андрогенных структур, полученных из них, позволяет оптимизировать процесс регенерации растений. Группа венгерских ученых доводит концентрацию микроспор тритикале до $3–3.5\ x\ 10^4$ [9]. В нашем исследовании мы пришли к выводу, что концентрация микроспор в среде очень важна. Плотность, которую мы использовали в культуре тритикале – $1{,}5x10^4$ –$2x10^4$ микроспор на 1 миллилитр питательной среды, была наиболее эффективной.

В культурах с относительно низкой плотностью микроспор, зародышевые структуры развиваются хорошо, но эффективность низкая. Слишком высокая плотность клеток микроспор в среде приводят к высвобождению токсинов, которые ингибируют развитие микроспор в направлении эмбрионов [10]. Также, если микроспоры и полученные из микроспор многоклеточные структуры содержатся при высокой плотности, их развитие может быть замедленно из-за истощения индукционной среды.

Значительный успех достигнут в индукции эмбриогенеза в технологии КИМ тритикале несколькими группами ученых [9,10]. Эффективность их достигает до 300-400 андрогенных структур с одной чашки Петри. В наших экспериментах формирование андрогенных структур также было достаточно высоким и составило в среднем по разным генотипам на оптимизированной среде 233 АС/100 пыльников. На отдельных генотипах фиксировалось до 400 АС/100 пыльников. Все сформировавшиеся андрогенные структуры не используются для регенерации растений. Отбор проводили только из хорошо сформированных эмбриоидов. В питательную среду добавляли свежей среды и закрывали пленкой Parafilm «М» для дальнейшего формирования и их роста.

Альбинизм является серьезной проблемой в андрогенной технологии зерновых культур. Основные причины этого явления до сих пор неизвестны, хотя несколько теорий были предложены Ferri A. [18]. Высокая частота регенерации безхлорофильных растений была отмечена во многих работах [19,20]. Первая успешная регенерация тритикале с помощью изолированных микроспор дала более 50% растений безхлорофильных регенерантов [2]. Уменьшение регенерации альбиносных растений и повышение выхода зеленых растений способствуют увеличению эффективности технологии КИМ. В наших экспериментах в среднем по всем питательным средам и генотипам получено 8,8 шт/100 пыльников зеленых растений, у отдельных генотипов до 16 шт/100 пыльников, что сопоставимо с результативностью исследований по КИМ ведущих исследовательских групп Европы [2, 9].

Конечным результатом данной технологии является дигаплоидное растение. В связи с этим в отработанных протоколах по получению дигаплоидных растений осуществляют воздействие в ходе опыта температурными стрессами, способствующими спонтанному удвоению хромосом на ранних стадиях культивирования. Спонтанное удвоение позволяет исключить процесс колхицинирования, тяжело переносимый растениями–регенерантами. Многие исследователи отметили у тритикале низкий уровень спонтанного удвоения в культуре пыльников от 10 до 34% [19-20]. Опубликованы исследования по увеличению процента удвоения хромосом при добавлении колхицина в индукционную среду и среду для регенерации, на основании которых дупликация хромосом тритикале удалось повысить от 32 до 64,5% [1,21,22]. В наших опытах процесс спонтанного удвоения составил 23,1%. Комбинированное применение (спонтанное удвоение, колхицинирование) позволило повысить производство дигаплоидных линий до 50,6%.

Данный процентный выход позволяет обеспечить селекционеров достаточным количеством дигаплоидных линий из одной гибридной комбинации или линии.

Финансирование. *Работа выполнена в рамках финансирования Комитета науки МОН РК по бюджетной программе 217 «Развитие науки», подпрограмме 102 «Грантовое финансирование научных исследований» проекту ИРН № AP05132430.*

Список литературы

1 Њlusarkiewicz-Jarzina A., Pudelska H., Woцna J., Pniewsk T. Improved production of doubled haploids of winter and spring triticale hybrids via combination of colchicine treatments on anthers and regenerated plants // J Appl Genetics – 2017. - Vol.58. – P.287. DOI.10.1007/s13353-016-0387-9.

2 Pauk J., Puolimatka M., Lцkцs Tyth K., Monoston T. *In vitro* androgenesis of triticale in isolated microspore culture //*Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* – 2000. – Vol.61. – P. 221. **DOI.**10.1023/A:1006416116366

3 Eudes, F. & Amundsen, E. Isolated microspore culture of Canadian 6· triticale cultivars // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. - 2005. - Vol. 82. - P. 233–244 **DOI** 10.1007/s11240-005-0867-9.

4 Gonzalez M., Hernndez I., Jouve N. Analysis of anther culture response in hexaploid triticale // Plant Breed. – 1997. - Vol.116. - P.302–304.

5 Zur I., Dubas E., Golemic E., Szechynska-Hebda M., Janowiak F., Wedzony M. Stress-induced changes important for effective androgenic induction in isolated microspore culture of triticale (X *Triticosecale* Wittmack) // Plant Cell Tissue Organ Cult. - 2008. - Vol.94. – P.319–328. **DOI:** 10.1007/s11240-008-9360-6

6 Eudes F., Chug A. An overview of triticale doubled haploids. In: Touraev A, Forster BP, Jain SM (eds) Advances in haploid production in higher plants. – 2009. - Springer, Heidelberg, P. 87–96 **DOI** 10.1007/978-1-4020-8854-4_6.

7 Ponitka A, Slusarkiewicz Jarzina A (2007) The effect of liquid and solid medium on production of winter triticale (x *Triticosecale* Wittm.) anther-derived embryos and plants. // Cereal Research Communications. - Vol. 35. – P.15–22. **DOI:** 10.1556/CRC.35.2007.1.3

8 Lantos C., Jancso M., Pauk J. Microspore culture of small grain cereals // Acta Physiologiae Plantarum. – 2005. - Vol. 27. – P.631–639. **DOI** 10.1007/s11738-005-0067-6.

9 Lantos C., Bo L., Boda K., Pauk, J. Comparative analysis of in vitro anther- and isolated microspore culture in hexaploid Triticale (*X Triticosecale Wittmack*) for androgenic parameters, Euphytica. – 2014. -Vol.197. - P. 27–37. **DOI** 10.1007/s10681-013-1031-y

10 Oleszczuk S., Sowa S., Zimny J. Direct embryogenesis and green plant regeneration from isolated microspores of hexaploid triticale (x *Triticosecale* Wittmack) cv. Bogo // Plant Cell Reports. – 2004. – Vol.22. – P. 885–893. **DOI** 10.1007/s00299-004-0796-9.

11 Yerzhebayeva R. S., Abekova A. M., Ainebekova B. A., Urazaliyev K. R., Bazylova T. A., Daniyarova A. K., and G. Kh. Bersimbayeva Influence of Different Concentrations of Ascorbic and Gibberellic Acids and pH of Medium on Embryogenesis and Regeneration in Anther Culture of Spring Triticale // Cytology and Genetics. – 2017. – Vol.51(6). – P.448–454. **DOI:** 10.3103/S0095452717060032.

12 Jia X., Zhuang J., Hu S., Ye C., Nie D. Establishment and application of the medium of anther culture of intergeneric hybridsof Triticum aestivumx Triticum-Agropyron. // *Sci. Agri. Sinica.* - 1994. – Vol. 27. – P. 83-87.

13 Lantos C., Pбricsi S., Zofajova A., Weyen J., Pauk J. Isolated microspore culture of wheat (*Triticum aestivum* L.) with Hungarian cultivars // *Acta Biologica Szegediensis.* - 2006. – Vol.50 (1-2) – P. 31-35.

14 Chu C. C., Hill R. D., Brule-Babel A. L. 1990. High frequencyof pollen embryoid formation and plant regeneration in *Triticum aestivum* L. on monosaccharide containing media // Plant Sci. – 1990. - Vol.66. - P.255-262.

15 Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assay with Tobacco cultures // Physiol Plantarum. - 1962. - Vol. 15. - P. 473-475.

16 Lantos C., Pauk J. Anther Culture as an Effective Tool in Winter Wheat (*Triticum aestivum* L.) Breeding. *Russian Journal of Genetics.* – 2016. – Vol. 52 (8). – P. 794–801. **DOI** 10.1134/S102279541608007X.

17 Li H., Devaux P. Isolated microspore culture overperforms an ther culture for green plant regeneration in barley (*Hordeum vulgare* L.) // Acta physiologiae plantarum.. - 2005. - Vol. 27. No. 4B. 2005: 611-619. **DOI:** 10.1007/s11738-005-0065-8

18 Ferri, A. M. R., Irmen, K. I., Beattie, A. D. Rossnagel, B. G. Isolated microspore culture of oat (*Avena sativa* L.) for the production of doubled haploids: effect of pre-culture and post-culture conditions // Plant Cell Tiss Organ Cult. – 2014. - Vol.116. -P.89–96. **DOI** 10.1007/s11240-013-0385

19 Tuvesson S, von Post R, Ljungberg A Triticale anther culture. In: Maluszynski M, Kasha KJ, Forster BP, SzarejkoI (eds) Doubled haploid production in crop plants: manual book. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 2003.- P. 117–122 **DOI** 10.1007/978-94-017-1293-4

20 Warzecha R, Sowa S, Salak-Warzecha K, Oleszczuk S, Sliwinska E, Zimny J Doubled haploids in production of male sterility mainting triticale (*Triticosecale* Wittmack) lines // Acta Physiol Plant. - 2005 –Vol. 27. – P.245–250 **DOI:** 10.1007/s11738-005-0029-z

21 S ґ lusarkiewicz-Jarzina A, Ponitka, A. Efficient production of spontaneous and induced doubled haploid triticale plants derived from anther culture // Cereal Res Commun. – 2003. -Vol. 31 (3/4). - P.289–296.

22 Arzani A, Darvey N.LThe effect of colchicine on triticale anther-derived plants: microspore pre-treatment and haploid- plant treatment using a hydroponic system // Euphyticaю. – 2001. –Vol. 122. – P.235–241. **DOI.**org/10.1023/A:1012966506030

Р.С. Ержебаева

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

Тритикаленің оқшауланған микроспоралар дақылдарының технологиясы (× *Triticosecale* Wittmack)

Аңдатпа: Тритикале (× *Triticosecale* Wittm.) бидайдың (*Triticum*) және қара бидайдың (*Secale*) синтетикалық буданы болып табылады және екі ата-аналық түрлердің де бағалы қасиеттерін біріктіреді: жоғары азықтық құндылығы және өсіруге қойылатын төмен талаптар. Қазақстанда осы жемшөптік дақылдың дамуын және селекциясын жеделдету үшін андрогендік технология сияқты биотехнологиялық әдісті пайдалану өзекті болып табылады. Микроспордан алынған дигаплоид өсімдіктер гомозиготалы линияларды алудың ең жылдам тәсілін қамтамасыз етеді. Оқшауланған микроспоралар дақылдарын тозаңдық дақылдаумен салыстырғанда көп еңбекті қажет ететін технология және жұмыстың әрбір кезеңінде барлық факторлар мен жағдайларды оңтайландыруды талап етеді. Отандық селекциялық бағдарламаларға оқшауланған микроспоралар дақылдарының технологиясын енгізу үшін қолда бар хаттамаларды қолданып, селекциондық материал тритикаледе тікелей сыни нүктелерді өңдеу қажет. Бұл зерттеудің мақсаты отандық селекцияның тритикале сорттары мен линияларының оқшауланған микроспора дақылдарының гаплоидтық технологиясының барлық кезеңдерін оңтайландыру және дигаплоидтік линияларды алу болып табылады. Оқшауланған микроспоралар дақылдарының технологиясы тритикаленің 6 үлгісінде (Т-434-2, Т-968, Т-45, Зернокормовое 5, ЯТХ-18-11, ЯТХ-327-11) сынақтан өткізілді. Хаттаманың сыни нүктелері толықтырылды. Эмбриогенез индукциясы үшін қоректік орта (mW14) таңдап алынды, оны пайдалану кезінде 233 андрогендік құрылым және 12,2 дана жасыл өсімдіктерден100 тозаңға дейін алынды. Кездейсоқ екі еселену процесі 23,1% - ды құрады. Құрамдастырылған әдісті қолдану (кездейсоқ екі еселену, колхициндеу) дигаплоидті линиялардың өндірісін 50,6% - ға дейін арттыруға мүмкіндік берді. Бұл пайыздық көрсеткіш селекционерлердің бір гибридті комбинациядан немесе линиядан дигаплоидтік линиялардың жеткілікті санын алуға мүмкіндік береді.

Түйін сөздер: тритикале, оқшауланған микроспоралар дақылдары**,** андрогендік құрылымдар, регенерация, плоидтілік, дигаплоидті өсімдік

R.S. Yerzhebayeva

LLP "Kazakh Research Institute of Agriculture and Plant growing",Almalybak v., Kazakhstan

Isolated microspore culture technology of triticale (× *Triticosecale* Wittmack)

Triticale (× *Triticosecale* Wittm.) is a synthetic hybrid of wheat (*Triticum*) and rye (*Secale*), it combines valuable traits of both parental species: high feeding value with low growth requirements. To develop and accelerate the breeding of this feed crop in Kazakhstan, the use of such a biotechnological method as androgenic technology. Plants - doubled haploids, obtained from microspores provide the fastest way to obtain homozygous lines. The isolated microspores culture is a more labor-intensive technology compared to the anther culture and requires the optimization of all factors and conditions at each stage of the procedure. For the introduction of IMC technology in domestic breeding programs, it is necessary to use already available protocols and working out critical points directly on the breeding material of triticale. The purpose of this study is to optimize all stages of the modern method of haploid technology of culture of isolated microspores on the varieties and lines of triticale of domestic breeding and obtaining dihaploid lines. Isolated microspores culture technology was tested on 6 samples of triticale (T-434-2, T-968, T-45, Zernokormovoye 5, YATH-18-11, YATH-327-11). The critical points of the protocol have been worked out. Selected nutrient medium for the induction of embryogenesis (mW14) using which received up to 233 androgenic structures and 12.2 pcs. green plants on 100 anthers. The process of spontaneous doubling was 23.1%. The combined use (spontaneous doubling, colchicine treatments) allowed increasing the production of doubled haploids lines to 50.6%. This percentage yield allows breeders to provide a sufficient number of doubled haploids lines from a single hybrid combination or line.

Keywords: triticale, isolated microspores culture, androgenic structures, regeneration, ploidy, doubled haploids plant.

References

1 Slusarkiewicz-Jarzina A., Pudelska H., Wo?na J., Pniewsk T. Improved production of doubled haploids of winter and spring triticale hybrids via combination of colchicine treatments on anthers and regenerated plants, J Appl Genetics, 58, 287 (2017).DOI.10.1007/s13353-016-0387-9.

2 Pauk J., Puolimatka M., Lцkцs T?th K., Monoston T. *In vitro* androgenesis of triticale in isolated microspore culture //*Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 61, 221 (2000). DOI.10.1023/A:1006416116366.

3 Eudes, F. Amundsen, E. Isolated microspore culture of Canadian 6· triticale cultivars, Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 82, 233-244 (2005). DOI 10.1007/s11240-005-0867-9.

4 Gonzalez M., Hernndez I., Jouve N. Analysis of anther culture response in hexaploid triticale, Plant Breed, 116, 302-304 (1997).

5 Zur I., Dubas E., Golemic E., Szechynska-Hebda M., Janowiak F., Wedzony M. Stress-induced changes important for effective androgenic induction in isolated microspore culture of triticale (X Triticosecale Wittmack), Plant Cell Tissue Organ Cult, 94, 319-328 (2008). DOI: 10.1007/s11240-008-9360-6

6 Eudes F., Chug A. An overview of triticale doubled haploids. In: Touraev A, Forster BP, Jain SM (eds) Advances in haploid production in higher plants, Springer, Heidelberg, 87-96 (2009). DOI 10.1007/978-1-4020-8854-4-6.

7 Ponitka A, Slusarkiewicz Jarzina A (2007) The effect of liquid and solid medium on production of winter triticale (x Triticosecale Wittm.) anther-derived embryos and plants, Cereal Research Communications, 35, 15-22 (2007). DOI: 10.1556/CRC.35.2007.1.3
8 Lantos C., Jancso M., Pauk J. Microspore culture of small grain cereals, Acta Physiologiae Plantarum, 27, 631-639 (2005). DOI 10.1007/s11738-005-0067-6.
9 Lantos C., Bo L., Boda K., Pauk, J. Comparative analysis of in vitro anther- and isolated microspore culture in hexaploid Triticale (X Triticosecale Wittmack) for androgenic parameters, Euphytica, 197, 27-37 (2014). DOI 10.1007/s10681-013-1031-y
10 Oleszczuk S., Sowa S., Zimny J. Direct embryogenesis and green plant regeneration from isolated microspores of hexaploid triticale (x Triticosecale Wittmack) cv. Bogo, Plant Cell Reports, 22, 885-893 (2004). DOI 10.1007/s00299-004-0796-9.
11 Yerzhebayeva R. S., Abekova A. M., Ainebekova B. A., Urazaliyev K. R., Bazylova T. A., Daniyarova A. K., and G. Kh. Bersimbayeva Influence of Different Concentrations of Ascorbic and Gibberellic Acids and pH of Medium on Embryogenesis and Regeneration in Anther Culture of Spring Triticale, Cytology and Genetics, 51(6), 448-454 (2017). DOI: 10.3103/S0095452717060032.
12 Jia X., Zhuang J., Hu S., Ye C., Nie D. Establishment and application of the medium of anther culture of intergeneric hybridsof Triticum aestivumx Triticum-Agropyron, Sci. Agri. Sinica, 27, 83-87 (1994).
13 Lantos C., P?ricsi S., Zofajova A., Weyen J., Pauk J. Isolated microspore culture of wheat (Triticum aestivum L.) with Hungarian cultivars, Acta Biologica Szegediensis, 50 (1-2), 31-35 (2006).
14 Chu C. C., Hill R. D., Brule-Babel A. L. 1990. High frequencyof pollen embryoid formation and plant regeneration in Triticum aestivum L. on monosaccharide containing media, Plant Sci, 66, 255-262 (1990).
15 Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assay with Tobacco cultures, Physiol Plantarum, 15, 473-475 (1962).
16 Lantos C., Pauk J. Anther Culture as an Effective Tool in Winter Wheat (Triticum aestivum L.) Breeding, Russian Journal of Genetics, 52 (8), 794-801 (2016). DOI 10.1134/S102279541608007X.
17 Li H., Devaux P. Isolated microspore culture overperforms an ther culture for green plant regeneration in barley (Hordeum vulgare L.), Acta physiologiae plantarum, 27(4B), 611-619 (2005). DOI: 10.1007/s11738-005-0065-8.
18 Ferri, A. M. R., Irmen, K. I., Beattie, A. D. Rossnagel, B. G. Isolated microspore culture of oat (Avena sativa L.) for the production of doubled haploids: effect of pre-culture and post-culture conditions, Plant Cell Tiss Organ Cult, 116, 89-96 (2014). DOI 10.1007/s11240-013-0385.
19 Tuvesson S, von Post R, Ljungberg A Triticale anther culture. In: Maluszynski M, Kasha KJ, Forster BP, SzarejkoI (eds) Doubled haploid production in crop plants: manual book. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 117-122 (2003). DOI 10.1007/978-94-017-1293-4.
20 Warzecha R, Sowa S, Salak-Warzecha K, Oleszczuk S, Sliwinska E, Zimny J Doubled haploids in production of male sterility mainting triticale (Triticosecale Wittmack) lines, Acta Physiol Plant, 27, 245-250 (2005). DOI: 10.1007/s11738-005-0029-z
21 S.lusarkiewicz-Jarzina A, Ponitka, A. Efficient production of spontaneous and induced doubled haploid triticale plants derived from anther culture, Cereal Res Commun, 31 (3/4), 289-296 (2003).
22 Arzani A, Darvey N.LThe effect of colchicine on triticale anther-derived plants: microspore pre-treatment and haploid- plant treatment using a hydroponic system, Euphytica, 122, 235-241 (2001). DOI.org/10.1023/A:1012966506030

Сведения об авторах:

Ержебаева Р.С. - канд.биол.наук, руководитель группы биотехнологии ТОО «Казахский научно-исследовательский институт земледелия и растениеводства, п. Алмалыбак, Карасайский р-н, Алматинская обл., Казахстан.

Yerzhebayeva R.S.-PhD, Team Leader of Plant Biotechnology of LLP «Kazakh research institute of agriculture and plant growing», Almalybak v., Karasay district.,Almaty region, Kazakhstan.