

ЗЕМЛЕДЕЛИЕ, АГРОХИМИЯ, КОРМОПРОИЗВОДСТВО, АГРОЭКОЛОГИЯ, ЛЕСНОЕ ХОЗЯЙСТВО

УДК57.017.35

**Д.В. Волков, А.К. Затыбеков, Д.Л. Дауров, А.К. Даурова,
М.Х. Шамекова, К. Ж. Жамбакин.**

РГП на ПХВ «Институт биологии и биотехнологии растений» КН МОН РК (г.Алматы)

ПОЛУЧЕНИЕ ДИГАПЛОИДНЫХ РАСТЕНИЙ РАПСА ИЗ ПЕРСПЕКТИВНЫХ ГИБРИДНЫХ КОМБИНАЦИЙ МЕТОДОМ АНДРОГЕНЕЗА

Аннотация. В ходе эксперимента, для создания гомозиготных линий с ценными признаками были получены гаплоидные регенеранты рапса первого поколения, из ранее полученных перспективных гибридных комбинаций, методом культуры микроспор и пыльников. Полученные регенеранты были предварительно проверены на пloidность, клонированы, колхицинированы и адаптированы в грунте.

Результаты показывают, что культура изолированных микроспор имеет явное преимущество перед культурой пыльников в количестве индуцируемых эмбриоидов на количество отобранных бутонов. Кроме того, в культуре микроспор индуцируются только эмбриоиды, без образования каллусов, таким образом практически исключается регенерация химер, анеуплоидов, самоклональная изменчивость.

Ключевые слова: рапс, гибриды, культура микроспор, эмбриоид, дигаплоиды

Введение

Мировой опыт свидетельствует о том, что возделывание рапса (*Brassica napus olifera* Metzg) является одним из наиболее коммерчески выгодных направлений в растениеводстве. Высокое содержание эруковой кислоты и гликозинолатов вредных для здоровья человека и животных сдерживало расширение посевных площадей этой культуры [1,2]. В 1974 году селекционером Б. Стефансоном в Канаде был выведен первый сорт рапса “Tower” в котором было достигнуто низкое содержание как эруковой кислоты, так и гликозинолатов. Этот сорт первым получил торговое название «канола» (canola – Canadian oil low acid), которым начало пользоваться Правительство штата Манитоба [3,4] (Канада). В настоящее время семена рапса(*Brassica napus*) и сурепицы(*Brassica campestris*) называются канолой, если они содержат менее 0,2 % эруковой кислоты и менее 15 микромолей глюкозинолатов [5,6]. Для ускоренного получения генетически стабильного, по хозяйственно ценным признакам материала рапса необходима разработка методов получения гаплоидных растений-регенерантов и удвоенных гаплоидов рапса и их широкое использование в селекционном процессе. Такая необходимость связана с тем, что методы андрогенеза, основными из которых являются культура пыльников и микроспор, позволяют получать исходный селекционный материал – удвоенные гаплоиды за одно поколение и исключают длительный процесс инбридинга, применяемый в классической селекции для закрепления признаков [7]. Следует также отметить, что гаплоиды значительно расширяют генетическое разнообразие исходного селекционного материала, во-первых, за счет рекомбинаций при мейотическом делении в процессе гаметогенеза, во-вторых, за счет мутаций, возникающих в процессе культивирования клеток *in vitro* [8].

Материалы и методы

Материалами исследования в эксперименте являлись 13 перспективных гибридных

комбинации рапса из высокоурожайных, технологичных, безэруковых сортов белорусской и российской селекции.

Метод культуры пыльников *in vitro* использовался для получения андрогенных гаплоидных регенерантов. Срезанные утром цветочные бутоны размером 3,0 – 4,0 мм в фазе одноядерной микроспоры, предварительно промывали дистиллированной водой. В дальнейшем экспланты помещали в холодильную камеру с температурой +4...+7 °C на несколько суток. Стерилизация цветочных бутона проводилась следующим образом, перед стерилизацией бутоны: 1) промывали бидистиллированной водой, затем обрабатывали этиловым 70 % спиртом в течение 5 сек.; 2) промывали мыльным раствором (30 мин.), этиловым 70 % спиртом (3сек). После этого следовала 3-х кратная промывка стерильной водой. Питательную среду для культивирования пыльников в пробирках стерилизовали автоклавированием при 120 °C и 0,7-0,9 атм. в течении 15 мин. Пыльники рапса извлекали и вводили в культуру *in vitro* и пассировали в асептических условиях на питательную среду Гамборга B5 с содержанием 2,4-Д 0,1 мг/л и НУК 0,1 мг/л. Пыльники помещали в термостат с температурой 32°C на двое суток, затем спускали температуру до 25°C.

Культивирование изолированных микроспор проводили следующим образом. Сбор бутона проводили рано утром в стадии одноядерной микроспоры в часы интенсивного деления пыльцы, размером 2-3 мм. Предобработку бутона проводили в растворе нитрата серебра в концентрации 10 мг/л, при температуре +4°C в течение 2 суток. После предобработки холдом, проводили стерилизацию бутона с помощью 50% гипохлорита натрия в течении 5-7 минут, затем в 70% спирте в течении 3-5 секунд, после чего промывали дистиллированной водой три раза. Затем бутоны помещали в прохладный микросмеситель (10 °C), используя 30-40 мл прохладной среды B5 без гормонов (10-12 °C), и гомогенизировали 7-9 секунд. Получившуюся суспензию пропускали через фильтр, размером пор 100μM, и сливали в стерильную 30 мл Falcon пробирку. Фильтрат центрифугировали (100g) в течение 5 минут. Супернатант сливали, к выпавшему осадку наливали 15 мл среды и снова центрифугировали в течении 5 минут. Повторив это действие еще раз, выпавший осадок переливали в чашку Петри и добавляли среду NLN для культивирования микроспор. Плотность микроспор в среде NLN доводили до 35,000 - 50,000 микроспор/мл. Чашки Петри помещали в термостат с шейкером (40-50 оборота в минуту) при температуре 32°C на двое суток. Затем спускали температуру до 25 °C. После культивирования в среде NLN 1.5-2 недели появлялись торпедовидные эмбриоиды. Чашки Петри перемещали на свет. При достижении размеров 1,5 -2,5 мм эмбриоиды перемещали на B5 среду (0,8 % агар) с 2%-ной сахарозой (GA3 - 0,1 мг/л), затем через две недели проводили пересадку эмбриоидов на безгормональную среду B5, часть эмбриоидов из которых не происходила регенерация, пересаживали на свежую B5 среду с 0,05 мг/л бензиладенином. Полученные регенеранты пересаживали на безгормональную среду MS с половинным набором солей. В дальнейшем клонирование регенерантов проводили на этой же среде. После клонирования 1/3 регенерантов оставляли на дальнейшее клонирование, а 2/3 пересаживали в грунт. До пересадки в грунт регенеранты колхицинировали 0,05% раствором колхицина в течении 18 часов при температуре 4°C. После колхицинирования регенеранты промывали дистиллированной водой три раза и пересаживали в пластиковые горшки диаметром 10-12см (по три регенеранта в горшок). Регенеранты накрывали горшком для увеличения влажности и постепенно через 2-3 дня приоткрывали. После акклиматизации растений, их пересаживали в вегетационные сосуды, так же по три растения на один сосуд. Во время вегетационного периода растения обрабатывали фунгицидом (фитоспорин) и инсектицидом (каратэ).

Тест метод на пloidность по числу хлоропластов проводили следующим образом: у листьев среднего размера срезали эпидерму с нижней стороны, на которую затем

наносили на каплю раствора 1 % (1 мг/мл, рН 4) азотнокислого серебра, закрывали покровным стеклом. Затем считали число хлоропластов в замыкающих устьицах под микроскопом при 100 кратном увеличении, количество хлоропластов в клетках устьиц предположительно гаплоидных регенерантов в среднем составило 8 - 10 шт., в то время как у диплоидных растений 15 - 30 шт. [9].

Определение пloidности гаплоидных регенерантов. Перед колхицинированием, для определения количества хромосом срезали корешки регенерантов длиной 1-2 см. По 7 срезанных корешков поместили в пенициллиновые флаконы, добавили 2 мл холодной димтиллированной воды. Флаконы с корешками выдержали во льду, в холодильнике 20 – 26 часов. Затем корешки поместили в фиксирующий раствор: 3:1 v/v 96% этанол : ледяная уксусная кислота. Фиксация корешков проводилась от нескольких часов до двух дней при комнатной температуре. Для окрашивания корешки помещались в 1% ацето-кармин: от 15 минут до часа. На предметном стекле удаляли кончик с корневым чехликом и затем осторожно выдавливали содержимое корешка на стекло. Меристематическую ткань аккуратно распределяли в капле 45% уксусной кислоты и накрывали покровным стеклом 18x18мм. Придерживая стекло аккуратно разбивали ткань мягкими ударами зубочистки. Подсчет число хромосом проводили под 100 кратным увеличением [10].

Результаты и обсуждения

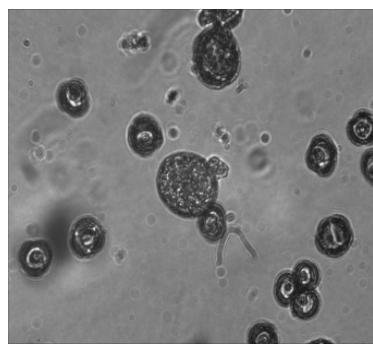
Из гибридных комбинаций F2: Таврион x Гадемин, Гадемин x Антей, Таврион x Антей, Викинг x Антей, Неман x Антей, Смак x Антей, Скиф x Антей, Скиф x Крис, Н-401 x Крис, методом культуры микроспор получено 103 гаплоидных регенеранта и из гибридных комбинаций Викинг x Крис, Неман x Крис, Гедемин x Крис, методом культуры пыльников было получено 64 гаплоидных регенеранта.

Культура микроспор каждой гибридной комбинации была получена в трёх повторностях по 20 бутонов в каждой (таблица 1, рисунок 1) при плотности микроспор – 40000 шт на 1 мл среды.

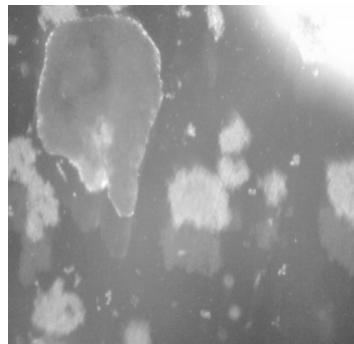
Несмотря на то, что в литературе указывается на значительное влияние генотипа на индукцию эмбриогенеза в культуре микроспор, в наших экспериментах мы получили эмбриоиды во всех изученных комбинациях. При этом очевидно явное преимущество культуры изолированных микроспор перед культурой пыльников в количестве индуцируемых эмбриоидов на количество отобранных бутонов. Кроме того, в культуре микроспор индуцируются только эмбриоиды, без образования каллусов, таким образом практически исключается регенерация химер, анеуплоидов, самоклональной изменчивости.

Таблица 1 – Получение эмбриоидов из культуры микроспор гибридных комбинаций F2 рапса.

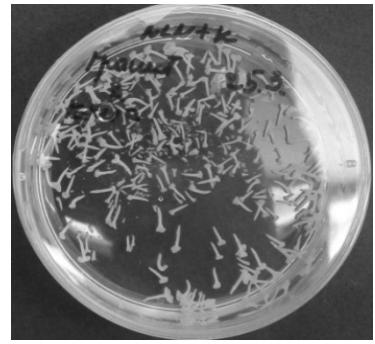
Название гибридной комбинации	Кол-во бутонов в повторности	Кол-во повторностей	Количество эмбриоидов (среднее значение)
Таврион x Гадемин	20	3	267,0±7,94
Гадемин x Антей	20	3	190,7±4,04
Таврион x Антей	20	3	316,3±4,16
Викинг x Антей	20	3	276,3±2,52
Неман x Антей	20	3	176,0±7,81
Гранит x Крис	20	3	362,7±4,51
Смак x Антей	20	3	241,7±2,31
Скиф x Антей	20	3	197,0±4,36
Крис x Скиф	20	3	159,3±10,69
Н-401 x Крис	20	3	283,3±4,93



А



Б



В

А-микроспоры, Б-образование глобул, В- эмбриоиды

Рисунок 1 – Эмбриогенез в культуре микроспор гибридных комбинаций рапса

В каждой гибридной комбинации в среднем получено от 159 до 362 эмбриоидов на каждую повторность.

В дальнейшем отбиралась только часть полученных эмбриоидов, ввиду слишком большого количества полученного материала. Были отобрано в среднем по 24 эмбриоида каждой гибридной комбинации и пересажены на твёрдую среду Гамборга В5 с гибберелиновой кислотой 1мг на литр. По мере образования вторичных эмбриоидов и регенерации, регенеранты срезались и пересаживались на среду Мурасиге Скуга с половинным набором солей без гормонов. Морфогенные каллусы образованные в культуре пыльников во внимание не принимались, считались только эмбриоиды. Практически более половины эмбриоидов имело способность регенерировать в полноценные регенеранты (таблица 2). Среди регенерантов альбиносных растений не обнаружено (рисунок 2).

Таблица 2 – Регенерация в культуре пыльников и микроспор гибридных комбинаций F2.

Название гибридной комбинации	Количество собранных бутонов	Количество полученных эмбриоидов	Количество пересаженных эмбриоидов	Кол-во эмбриоидов давших регенеранты	Регенерация (%) от количества эмбриоидов
1	2	3	4	5	6
Культура микроспор					
Таврион x Гедемин	60	827	24	15	62,5
Гедемин x Антей	60	401	24	10	41,7
Таврион x Антей	60	1091	36	21	58,3
Викинг x Антей	60	995	28	20	71,4
1	2	3	4	5	6
Неман x Антей	60	396	16	9	56,3
Гранит x Крис	60	1305	38	23	60,5
Смак x Антей	60	725	24	14	58,3
Скиф x Антей	60	621	12	8	66,7
Крис x Скиф	60	429	24	16	66,7
Н-401 x Крис	60	1020	38	28	73,7

Культура пыльников					
Викинг x Крис	88	41	41	22	53,4
Гедемин x Крис	45	38	38	27	71,1
Неман x Крис	33	23	23	15	65,2



Рисунок 2 – Гаплоидные регенеранты гибридных комбинаций рапса.

Регенеранты полученные из эмбриоидов были пересажены в грунт в контролируемые условия при 25°C, освещенности 4000 Люкс, влажность 50% и световом периоде 16 часов. Начальный рост и развитие пробирочных растений происходило под закрытыми полиэтиленовыми колпаками, которые по мере адаптации приоткрывались. Растения окончательно открывались через 10 -14 дней (рисунок 3).



Рисунок 4 – Выращивание регенерантов в грунте

А – колхицинированные регенеранты пересаженные в грунт под пластиковым колпаком для сохранения влажности, В – открытые регенеранты, С – полученные растения

Путём колхицинирования полученных гаплоидных регенерантов и последующей адаптации и выращиванием в контролируемых условиях были получены дигаплоидные растения следующих комбинаций: Гедемин x Крис, Неман x Крис, Н-401 x Крис, Гранит x Крис, Викинг x Антей. Перед колхицинированием у регенерантов отбирались корешки или диски листьев для проверки их полидности. Для предварительного определения полидности растений-регенерантов использовался тест-метод по числу хлоропластов в замыкающих устьицах листьев. Данный метод очень прост и позволяет быстро определить – произошла ли спонтанная диплоидизация у регенерантов на любом этапе

роста и развития, а так же произошло ли удвоение хромосом у растения после процесса колхицинирования, при этом для более точного определения пloidности проводился кариологический анализ корешков растений (рисунок 4).

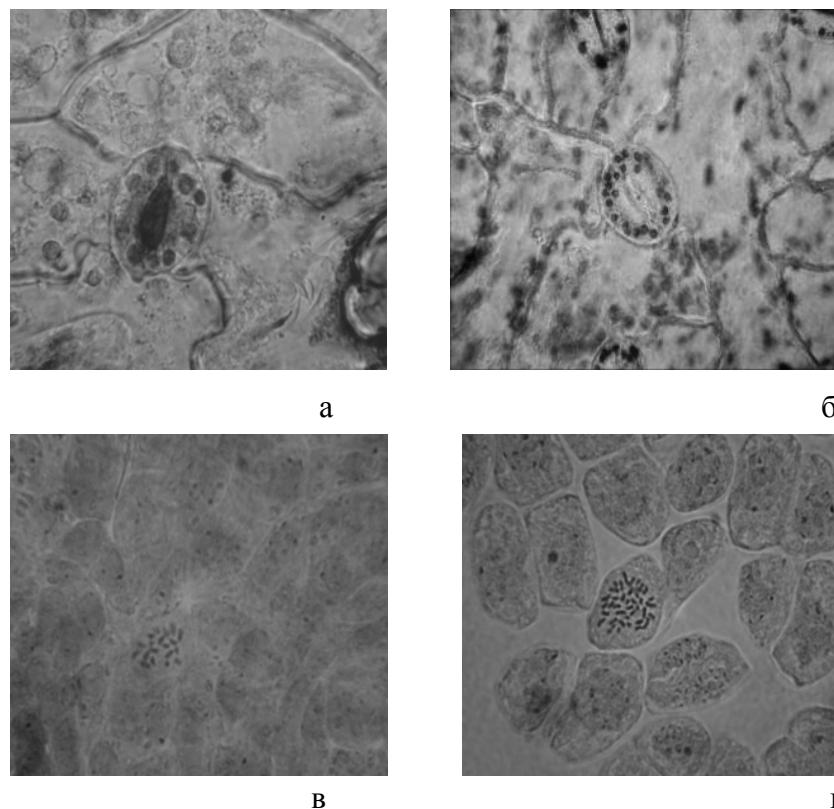


Рисунок 4 – Определение пloidности у регенерантов по количеству хлоропластов в устьицах (x 100): а) гаплоид, б) диплоид; по количеству хромосом: в) гаплоид, г) диплоид

В данном эксперименте все полученные линии - регенеранты размножаются клонированием, поскольку каждое полученное в культуре микроспор растение представляет из себя уникальный генотип, который может быть потерян при колхицинировании или адаптации регенерантов к грунту, в результате чего может остаться стерильным в период созревания семян.

Полученные дигаплоидные растения-регенеранты были высажены после клонирования в культуре *in vitro* и колхицинирования в вегетационные сосуды. Проведенные фенологические наблюдения показали, что дигаплоиды проходят все фазы роста и развития без нарушений в соответствии с биологией развития рапса (рисунок 4).



Рисунок 4 – Рост и развитие дигаплоидов рапса в вегетационных сосудах.

Выводы

В ходе эксперимента выявлено явное преимущество культуры изолированных микроспор перед культурой пыльников в количестве индуцируемых эмбриоидов на количество отобранных бутонов.

Процент регенерации от количества эмбриоидов практически не отличается в обеих культурах.

Проведенные фенологические наблюдения показали, что адаптированные в грунте дигаплоиды, после колхицинирования проходят все фазы роста и развития без нарушений в соответствии с биологией развития рапса.

Получены гаплоидные регенеранты в культуре пыльников и микроспор всех гибридных комбинаций, которые проверены на пloidность, колхицинированы и адаптированы в грунте в контролируемых условиях.

Литература

- 1 Chrispeels M. J. and Sadova D. E. // *Plants, Genes, and Crop Biotechnology*. – 2003. – Vol.2. – P. 240-242.
- 2 Downey R.K., Rakow G.F.W. *Rapeseed and Mustard* // In *Principles of cultivar development*. MacMillan Pub. Co., New York, USA. – 1987. – Vol. 2. – P. 437-486.
- 3 Prem D., Gupta K. and Agnihotri A. *Doubled haploids: A powerful biotechnological tool for genetic enhancement of oilseed brassicas* // *Plant biotechnology and molecular marker*. Springer Netherlands. – 2004. – P. 18-30.
- 4 Lionneton E., Beuret W., Delaitre C., Ochatt S. and Rancillae M. *Improved microspore culture and doubled haploid plant regeneration in the brown condiment mustard (B. juncea)* // *Plant Cell Reports*. – 2001. – Vol. 20. – P. 126-130.
- 5 Karin S., Eicke R. *Microspore mutagenesis in transgenic oilseed rape for the modification of fatty-acid composition* // *Acta Universitatis Latviensis, Biology*. – 2004. – Vol.676. – P. 227-230.
- 6 Weber S., Zarhloul M. K., Friedt W. *Modification of oilseed quality by genetic transformation* // *Progress in Botany*. – 2000. – Vol. 62. – P. 140-174.
- 7 Swapan K. *Datta Androgenic haploids: Factors controlling development and its application in crop improvement* // *Current Science*, Vol. 89, №. 11, 2005, p. 1870 – 1878
- 8 Amitava Roy, and P. K. Saha *Isolation of low erucic acid-containing genotype of Indian mustard (Brassica juncea Czern. and Coss.) through F1 hybrid anther culture* // *African Journal of Biotechnology* Vol. 5 (22), 2006, pp. 2092-2096
- 9 Пухальский В.А., Соловьев А.А., Бадаева Е.Д., Юрцев В.Н. *Практикум по цитологии и цитогенетике растений*. – М: КолосС, 2007. – 145-146 с.
- 10 Барыкина Р. П. , Веселова Т. Д. , Девятов А. Г. , Джалилова Х. Х. , Ильина Г. М. , Чубатова Н. В. *Справочник по ботанической микротехнике. Основы и методы*. – М: Изд-во МГУ, 2004. – 151-175 с

Д.В.Волков, А.К. Затыбеков, Д.Л. Дауров, А.К. Даурова,
М.Х. Шамекова, К.Ж. Жамбакин.

АНДРОГОНЕЗ ӘДІСІ АРҚЫЛЫ РАПСТЫҢ ПЕРСПЕКТИВТІ БУДАНДЫ ҚЫСТЫРУЛАРЫНАН ДИГАПЛОИДТЫ ӨСІМДІКТЕР АЛУ

Жүргізілген тәжірибелер нәтижесінде, рапстың перспективті буданды қыстыруларынан микроспораларды дақылдандыру және тозандарды дақылдандыру арқылы

дигаплоидты өсімдіктер алынған, тозандарды дақылдандыру әдісіне қарағанда микроспораларды дақылдарндыру әдісі, іріктеліп алынған гүлшанақтан пайда болған ұрық санымен салыстырғанда әлдекайда тиімді екені анықталған. Топыраққа жерсіндірлген дигаплоидты өсімдіктер, колхицинделгеннен кейін де барлық биологиялық есү фазаларынан ешқандай кедергілерсіз өтеді.

Кітт сөздер: рапс, будандар, микроспоралар дақылы, ұрық, дигаплоидтар

D.V.Volkov, A.K. Zatybekov, D.L.Daurov, A.K. Daurova,
M.H. Shamekova, K.Zh. Zhambakin.

GETTING DIHAPLOIDS RAPE PROMISING HYBRIDS BY ANDROGENESIS.

Were created dihaploid plants in anther and microspore culture rape, promising hybrid combinations. Revealed a distinct advantage microspore culture to culture of anthers in the output by the number of embryos selected bud. Adapted to the soil dihaploid pass all phases of growth and development without violations in accordance with the developmental biology of rape.

Key words: rape, hybrids, culture microspores, embryos, dihaploids

UDC 631.8: 633.01

**Y. Dutbayev¹, Sh. Suiesinova¹, Zh. Auyelbekova¹, A. Kyresbek¹,
N.Zh. Sultanova², A. Sarbayev³, R.A. Iskendirova³**

Kazakh national agrarian university

*Department of horticulture, vegetable growing, chemistry and plant protection¹,
Kazakh scientific research institute of plant protection, Department of protection of cereal
crops², Kazakh Scientific Research Institute of Farming and Plant Growing.
Kazakhstan, Almaty region³*

INFLUENCE OF USING OF DIFFERENT SEED TREATMENT WITH MICROFERTILIZERS FOR WINTER WHEAT PRODUCTIVITY AND TO COMMON BUNT DEVELOPMENT

In the article are shown results of studying of seed treatments of winter wheat what (phytosporin, vitavax and iunta) with using fertilizers in the laboratory and field conditions in the southeast Kazakhstsan. Studies of effectiveness seed treatments in the field conditions well influenced to winter wheat productivity by increasing of number of heading, length of spikes, weight of 1000 grains. Period terminal spikelet initiation stage wheat was sprayed by micro fertilizer of YaraVita™ Tenzo Cocktail, which includes pine forest, calcium, copper, iron, manganese, molybdenum, zinc, with rate 1 kg per hectar. The using of microfertilizers increased wheat productivity up to 0,3-0,7 tones per hectar

Key words: winter wheat, common bunt, productivity, seed treatment, cultivar

The main method for control of winter wheat's common bunt is a using seed treatment before sowing. Investigation in Kazakhstan in this direction were conducting since 50-th years of 20-th century in North, Northeast and Southeast Regions. On this problem were working such