

УДК 631.111:57.085.23

ГАПЛОИДНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В СЕЛЕКЦИИ РАСТЕНИЙ

Уразалиев К.Р.

*Казахский НИИ земледелия и растениеводства
ул. Ерлепесова, 1, с. Алмалыбалык, Карасайский район, Алматинская область, 040909, Казахстан
kairatu@mail.ru*

АБСТРАКТ

Регенерация гаметных клеток с образованием гаплоидных или дигаплоидных растений – превосходный пример тотипотентности клеток растений, называемый гаметогеиезом. Получение дигаплоидных растений через андрогенез или гинеогенез дает возможность получения гомозиготного растения за один этап (год). Данный метод полезен при селекции растений, генетических манипуляциях и во многих областях фундаментальных исследований, связанных с изучением биологии растений. Достижение гомозиготности в одном поколении помогает уменьшить многочисленные циклы инбридинговых скрещиваний. С эффективной системой регенерации растений гаметные клетки также более предпочтительны для целей селекции, генетических трансформаций, трансгенетических исследований растений и др.

Дигаплоидные растения и полученные гомозиготные линии используются в нескольких областях фундаментальных исследований, в таких как классическая генетика растений и цитогенетика, современная молекулярная генетика, в том числе индуцированный мутагенез, картирование генома и др. Наиболее важной сферой практического применения дигаплоидов является селекция растений.

Возможность регенерации растений из микроспор имеется у многих видов растений. Необходимо проводить преобработку в форме физической, физиологической и/или химической обработки, чтобы переключить микроспоры с гаметофитного развития на спорофитный путь развития. Увеличение эффективности этого процесса сделало возможным прямой доступ к искусственной манипуляции индивидуальными микроспорами и успешное получение регенерированных растений более 300 видов.

Ключевые слова: дигаплоид, гаплоидная технология, пыльник, микроспора, гомозигота, селекция.

DOUBLED HAPLOIDS TECHNOLOGY IN PLANTS

Urazaliyev K.R.

*Kazakh Institute of Agriculture and Plant Growing
1, Erlepesov str., Almalybalyk, Karasai district, Almatinskaya oblast, 040909, Kazakhstan
kairatu@mail.ru*

ABSTRACT

Regeneration of gametic cells to produce haploid or doubled haploid plants is an excellent example of totipotency of plant cells, called gametogenesis. Producing doubled haploid plants through androgenesis or gynogenesis facilitates the possibility of obtaining homozygous plants in a single step (one year). This approach is useful in plant breeding, genetic manipulation, and in many areas of basic research related to the study of plant biology. Achievement of homozygosity in one generation helps reduce the number of inbreeding cross cycles that are required to obtain purebred lines. As an effective system of plant regeneration, gametic cells also are preferred for breeding, genetic transformation, transgenic plant research, and other regeneration efforts.

Doubled haploid plants and the obtained homozygous lines are used in several areas of basic research such as classical plant genetics and cytogenetics, modern molecular genetics, including induced mutagenesis, site-directed mutagenesis, genome mapping and the evaluation of the relative remoteness of genomes, gene dosage effects, and the analysis of the relationships mechanisms of genetic control of chromosome pairs. One of the most important areas of practical application of this technology is plant breeding.

Many plant species have the ability to regenerate from microspores. However, in most cases, it is necessary to perform one or more pre-processing steps, in the form of physical, physiological and/or chemical treatments. Pre-processing must be used to switch microspores from a gametophytic development pathway to a sporophytic

Biotechnology. Theory and Practice/Биотехнология. Теория и практика.
2015, no. 3, pp. 33-43
DOI: 10.11134/btp.3.2015.4

development path. It is possible to increase the efficiency of this process by the direct, artificial manipulation of individual microspores, which has enabled the successful production of regenerated plants in more than 300 species.

Keywords: doubled haploids, haploid technology, anther, microspore, homozygote, breeding

ВВЕДЕНИЕ

Получение гаплоидов *in vitro* с последующим удвоением хромосом значительно ускоряет получение полностью гомозиготных линий в одном поколении и увеличивает точность и эффективность процесса отбора в селекции растений. Это позволяет: обнаруживать генные взаимодействия, оценку генетической дисперсии и генов количественных признаков и производить генетические манипуляции, а также облегчает исследования в области генетической трансформации и мутагенеза.

Роль гаплоидной технологии в селекции велика. Применение ее позволяет быстрее найти нужную комбинацию, сокращает время на создание сорта. Опубликованы данные о получении дигаплоидов более 300 изучаемых видов [1, 2]. Удвоенные гаплоиды, полученные *in vitro*, могут применяться не только в практической селекции, но и в генетической инженерии, а также клеточной селекции растений. По некоторым данным [3] несколько сот тысяч дигаплоидных линий (ДГ) пшеницы производится ежегодно в мире. Большинство новых зарегистрированных сортов ячменя в Германии созданы с использованием гаплоидной технологии и не менее 50% площадей в 2006-2007 гг. засеивались сортами ярового и озимого ячменя, полученного с использованием гаплоидной технологии.

Технология удвоенных 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). Интеграция технологии гаплоидии вместе с другими имеющимися биотехнологическими инструментами, такие как маркерная селекция (MAS), индуцированного мутагенеза и генно-инженерные технологии могут значительно ускорить селекцию сельскохозяйственных культур [4].

Основное селекционное преимущество использования гаплоидов исходит из возможности одноэтапного получения гомозигот, что позволяет быстро фиксировать морфофизиологические параметры адаптивности и сократить сроки создания сортов, приспособленных к суровым условиям Казахстана и многочисленным болезням, способных стабильно формировать высокие урожаи зерна и отвечающих всем потребностям современного рынка.

У гаплоидов каждый ген представлен единственным аллелем и рецессивные аллели одних генов проявляются наряду с доминантными аллелями других. Генетическое расщепление при использовании гаплоидов менее сложно (фактически оно не превышает числа классов гамет) и для выделения определенной комбинации генов нужна сравнительно малочисленная популяция [5].

Как известно, отбор в традиционной селекции проводится по одному колосу или одному растению, а на проявление признака в сложной гибридной популяции оказывают влияние как внутривидовые взаимоотношения между растениями, так и различные эффекты взаимодействия генов, что делает отбор малоэффективным. Потомства диплоидизированных гаплоидов, представляющие линию и состоящие из нескольких растений, легче оценивать и отбирать [1].

Каждый год в мире регистрируется значительное число новых сортов растений, полученных с использованием гаплоидных технологий (главным образом, в ЕС, Канаде, США, Австралии) [6]. На сегодняшний день ЕС, Канада, Австралия, США и Китай являются лидерами в области гаплоидных технологий.

МЕТОДЫ ИНДУЦИРОВАНИЯ ГАПЛОИДОВ

Начиная с 70-х годов, гаплоидная технология интенсивно развивалась. Впервые регенерацию гаплоидного растения получили Гуха и Махешвари в 1964 году *in vitro* в культуре незрелых пыльников дурмана (*Datura innoxia*) [7], за которым последовало успешное получение *in vitro* гаплоидов табака (*Nicotiana tabacum* L.) [8, 9] и риса (*Oryza Sativa* L.) [10]. Позднее гаплоиды пшеницы (*Triticum aestivum* L.) были получены в культуре пыльников [11, 12], культуре изолированных микроспор [13, 14, 15, 16] и с помощью отдаленной гибридизации с диким ячменем (*Hordeum bulbosum* L.) и кукурузой (*Zea mays* L.) [17, 18, 19].

Опубликована работа Систу с соавторами и Лаббани с соавторами с протоколом ДГ для твердой пшеницы [20, 21]. Главными усовершенствованиями, которые описаны ими, являются предобработка маннитом и использование колхицина *in vitro*.

О регенерации зеленых проростков из культуры пыльников ячменя сообщил Клэпман [22] и позднее Као [23] об успешном протоколе культуры изолированных микроспор ячменя.

В 1976 году было доложено об успешной гаплоидии в гексаплоидных тритикале, с частотой до 30% [24]. Первый успех в культуре пыльников октоплоидных тритикале был получен в Китае [25]. С частичным успехом гаплоиды также были получены у тетраплоидных тритикале [26]. Первые дигаплоиды из культуры изолированных микроспор были получены в 2000 году Паук и соавторы [27].

Как было указано выше, впервые дигаплоиды риса в культуре пыльников были получены в 1968 году [10], а в культуре изолированных микроспор (Чэнь и соавторы) в 1980 году [28].

Из-за ограничений по объему исследования по другим злакам здесь не рассматриваются. Далее приведены обзорные статьи по регенерации дигаплоидов других видов зерновых культур различными методами: овес [29], рожь [30], просо [31], кукуруза [32], сорго [33].

На сегодня существуют разные способы получения дигамплоидов растений. Можно выделить несколько основных методов экспериментальной гаплоидии:

1. Получение ДГ растений путем отдаленной гибридизации часто применяется в селекционных программах (метод опыления пыльцой кукурузы или других растений – отдаленная гибридизация с селективной элиминацией хромосом чужеродного вида-опылителя), в комбинации с обработкой фитогормонами и последующей регенерацией целого растения из эмбриона [7, 35, 36]. Это явление особенно хорошо изучено у ячменя. При скрещивании диплоидного ячменя *Hordeum vulgare* (культурный) и *H. bulbosum* (многолетний луковичный дикий) на стадии роста зародыша и эндосперма (через 5 дней после оплодотворения) происходит элиминация хромосом дикого вида. Возникает гаплоид с набором хромосом *H. vulgare*. Через 15 суток после оплодотворения рост гибридного зародыша в материнском растении прекращается, но при культивировании *in vitro* из таких зародышей развиваются проростки.

2. Гиногенез – получение гаплоидов в культуре женского гаметофита [37, 38, 39, 40]. У растений с мужской стерильностью культивирование неоплодотворенных семян является единственной возможностью получения гаплоидов. Женский гаметофит может быть источником получения гаплоидов и у растений с низким морфогенетическим потенциалом каллусной ткани, либо если каллусная ткань или пыльца регенерирует растения-альбиносы. У некоторых растений, например, у ячменя и риса, индукция зеленых растений намного выше при гиногенезе по сравнению с андрогенезом. В зависимости от того, какая клетка зародыша даст начало новому организму, различают партеногенез и апогамию. Партеногенез – развитие яйцеклетки без оплодотворения. При апогамии зародыш развивается из синергиды или антиподы.

3. Андрогенез – процесс образования гаплоидного растения из микроспоры или клеток пыльцевого зерна. Андрогенез может быть прямым (эмбриогенез) или непрямым, т.е. через каллусогенез. Андрогенез может происходить различными путями, в том числе через развитие генеративной или вегетативной клеток, а также через образования суспензора [41]. Основными же методами получения гаплоидных растений на основе андрогенеза являются:

а) Культуры пыльников (КП) – является самым технологичным на сегодняшний день. Этим методом пользуются практически все биотехнологические подразделения селекционно-генетических компаний Европы и США [42, 43]. Получение гаплоидных растений из изолированных пыльников может идти по двум направлениям: прямая регенерация и косвенная – через каллусогенез. В первом случае внутри пыльников из отдельных пыльцевых зерен формируются проэмбриональные структуры, которые при определенных условиях культивирования развиваются в эмбриоиды, дающие начало гаплоидным растениям. Эмбриоиды – зародышеподобные структуры. Во втором – пыльца делится, а клетки, возникшие в результате делений, быстро увеличиваются в размерах и, разрывая оболочку пыльцевого зерна, образуют каллус. В результате дальнейшего морфогенеза из этих каллусных клеток регенерируют растения. При этом растения могут иметь разную степень пloidности – ди-, поли-, анеуплоидные. Последние часто стерильны, но после обработки растений колхицином происходит удвоение числа хромосом, в результате чего можно получить фертильные гомозиготы. Культура пыльников все еще остается возможностью для специализированных групп с относительно однородным генетическим пулом и может в будущем еще развивать эффективные методы.

б) Культура изолированных микроспор (КИМ) – является наиболее перспективным методом. Культура изолированных микроспор (КИМ) имеет несколько достоинств по сравнению с другими общедоступными методами [5, 44]. Микроспоры могут быть выделены в больших количествах, обеспечивая большое количество потенциально эмбриогенных одиночных гаплоидных клеток. Несмотря на значительные успехи, достигнутые при разработке этих методов и создании на их основе ряда сортов важнейших видов зерновых культур, их эффективное применение сдерживается рядом причин, главными из которых являются воспроизводимость полученных результатов в различные сезоны и для различных генотипов в сочетании со снижением затрат на получение. Технология КИМ представляет собой индивидуальную клетку, что делает отбор одной клетки реальностью и это также дает возможность напрямую исследовать воздействие различных компонентов среды на развитие микроспоры [44, 45, 46]. Отдельные микроспоры в жидкой среде имеют достаточное и непрерывное поступление питательных веществ, в то время как микроспоры в культуре пыльников исключительно зависят от постоянной диффузии питательных веществ через стенки пыльника [45, 46, 47, 48]. Прямой доступ к единственной клетке и формирование истинного эмбриоида делают культуру микроспор идеальной системой для исследования эмбриогенеза *in vitro*, аспектов биологии развития растений [49, 50]. Проблема КИМ в довольно большом проценте выхода безхлорофильных проростков (альбиносов), которая значительно влияет на селекционные программы за счет снижения частоты регенерации зеленых проростков [46]. Альбинизм связан в основном с видом, генотипом и условиями культивирования и очень трудно искоренить. Однако усилиями многочисленных ученых разрабатываются технологии и непрерывно оптимизируются питательные среды, условия культивирования, предобработка и другие факторы, снижающие выход альбиносов. И уже в ближайшие годы эта технология станет наиболее используемой в селекционных программах.

За последние 30-50 лет разработаны высокоэффективные технологии получения удвоенных гаплоидов (ДГ) сельскохозяйственных растений различных родов и семейств. Наиболее важной группой являются зерновые культуры из-за их экономического и продовольственного значения в мире. Поэтому большое количество

исследований в области гаплоидных технологий проводятся именно с этой группой. На сегодня уже разработаны основные технологии, подобраны условия и среды культивирования и понятны основные механизмы данного процесса. Но для отдельных видов и технологий предстоит еще провести значительные исследования для улучшения эффективности ДГ технологий.

ОСНОВНЫЕ ЭТАПЫ ПОЛУЧЕНИЯ ДИГАПЛОИДОВ И ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ АНДРОГЕНЕЗА

Самые эффективные системы ДГ технологий делятся на четыре ключевых шага. Во-первых, переключение микроспор от их естественно запрограммированного пути гаметофитного к спорофитному пути развития физическим/физиологическим стрессом (например, высокая или низкая температура, голодание) в кооперации с воздействием химическими компонентами. Во-вторых, разделение эмбриогенных и неэмбриогенных микроспор. В-третьих, оптимальные условия культивирования получаются при использовании адекватного питания, ко-культивирования с яйцеклетками и благоприятной физической среды. В-четвертых, выращивание эмбриоидов на твердых, безгормональных средах, чтобы сформировать ДГ растения.

Есть несколько основных правил, соблюдение которых необходимо для успешного получения гаплоидных или дигаплоидных растений-регенерантов:

- условия выращивания растений (при температуре 18-23°C, фотопериоде 16/8 часов и влажности 70-80% и освещенности не менее 10-15 тысяч люкс;
- оценка стадии развития микроспор цитологическими методами. Выбор растений с микроспорами на поздней одноядерной или ранней двухядерной стадии;
- холодовой стресс, +2-4°C, в течение 7-14 дней;
- высокотемпературный шок (30-35°C), в течение 1-3 дней в темноте;
- выделение и перенос в оптимизированную среду культивирования;
- культивирование в/на среде индукции при оптимальной температуре (+23-25°C) 4-6 недель.

После начала эмбриогенеза дальнейшие этапы одинаковы для всех трех методов и не представляют технических или технологических сложностей.

Основные факторы, влияющие на эффективность андрогенеза:

1. Генотип.
2. Условия выращивания исходных растений-доноров.
3. Стадия развития микроспор.
4. Условия предобработки.
5. Условия культивирования микроспор и пыльников.
6. Постобработка и применение осмотиков.

Существенные усовершенствования КИМ пшеницы теперь возможны с применением химических индукторов, ко-культивирования с яйцеклетками и арабиногалактанопротеины.

На рисунках 1-4 представлены различные стадии развития микроспор и эмбриоидов, а также регенерации гаплоидов на серии схем и фотографий результатов исследований сотрудников лаборатории биотехнологии КазНИИЗиР и других исследователей.

Важность совместного ко-культивирования культуры микроспор пшеницы с яйцеклетками была впервые опубликована Мейджа с соавторами [16]. Несмотря на новые опубликованные результаты и многочисленные исследования культуры изолированных микроспор пшеницы, массовое использование данной методики в практических целях не применяется из-за ограниченного выхода зеленых регенерантов.

Многие публикации описывают стресс-обработки, такие как: температурные, осмотические обработки и голодание, или даже их комбинации применительно к колосьям, побегам или даже изолированным пыльникам или микроспорам. Другие сообщали об успешной регенерации после шоковой терапии высокой температурой на пыльниках и об успешной регенерации без какой-либо предварительной стресс-обработки и использовании свободной питательной среды для индукции эмбриогенеза.

Есть генотипы пшеницы, которые показывают значительно более высокий отклик в КП или КИМ и иногда есть также небольшие пулы генотипов с удовлетворительными уровнями ответа, воспроизводимость и передача изданных протоколов не были до настоящего времени успешно применены в селекции, кроме отдельных случаев [43]. Для примера можно привести сорта пшеницы Свилен, Павон или сорт ячменя Игри, которые в исследованиях часто используют как модельные сорта, с высоким эмбриогенным потенциалом.

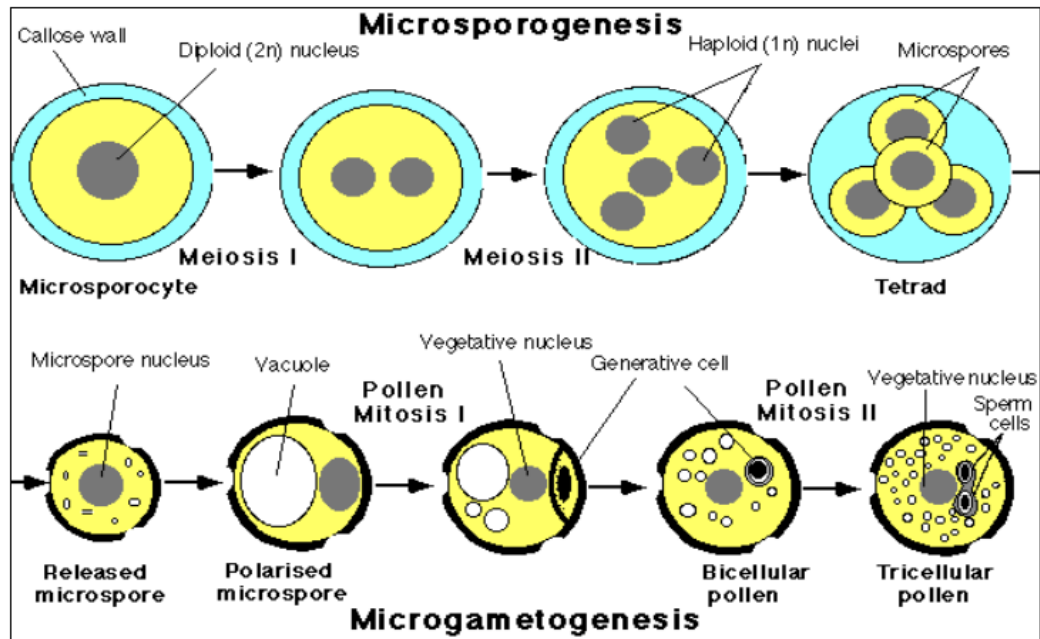


Рис. 1. Стадии развития микроспор [51]

Fig. 1. Stages of development of microspores [51]

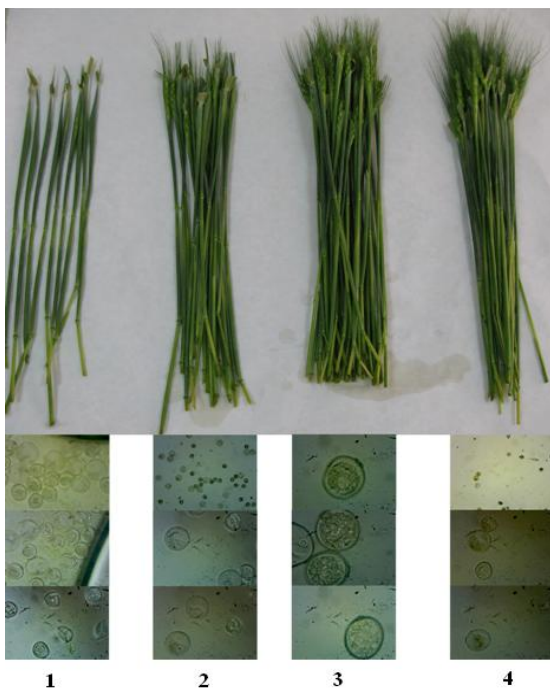


Рис. 2. Колосья пшеницы на разных стадиях развития микроспор [4]

Fig. 2. Ears of wheat at different developmental stages of microspores [4]

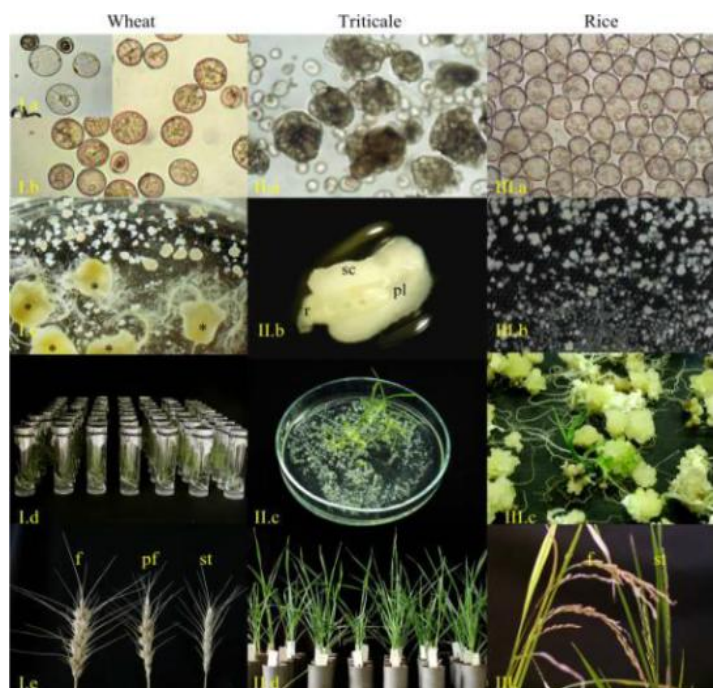


Рис. 3. Характерные этапы эмбриогенеза микроспор [52]

Fig. 3. Typical stages of embryogenesis of microspores [52]



а – ранняя и средняя одноядерная; б – поздняя одноядерная; с – ранняя двухядерная

Рис. 4. Стадии развития микроспор озимой пшеницы [4]

а – Early and middle uninucleate; б – Late uninucleate; с – Early binucleate.

Fig. 3. Stages of development of winter wheat microspores [4]

На основании многочисленных литературных данных, а также проведенных многолетних собственных исследований нами предложены два, наиболее, на наш взгляд, оптимальных протокола получения удвоенных гаплоидов (ДГ) (таблица 1).

Таблица 1. Протоколы культуры пыльников и культуры изолированных микроспор

Table 1. Manuals of the Anther culture and Isolated microspores culture

Этапы Stages	Культура пыльников Anther culture	Культура изолированных микроспор Isolated microspores culture
Этап 1 Stage 1	Подбор донорных растений по согласованию с селекционерами	Подбор донорных растений по согласованию с селекционерами
Этап 2 Stage 2	Условия выращивания донорных растений (+18-23°C, фотопериод 16/8 часов, влажность 60-80% и освещенность 10-15 тысяч люкс)	Условия выращивания донорных растений (+18-23°C, фотопериод 16/8 часов, влажность 60-80% и освещенность 10-15 тысяч люкс)
Этап 3 Stage 3	Оценка стадии развития микроспор цитологическими методами. Отбор колосьев с микроспорами на средней и поздней одноядерной	Оценка стадии развития микроспор цитологическими методами. Отбор колосьев с микроспорами на средней и поздней одноядерной
Этап 4 Stage 4	Предобработка стрессом (+2-4°C, 7-14 дней)	Предобработка стрессом (+2-4°C, 7-14 дней)
Этап 5 Stage 5	Стерилизация колосьев 70% этанолом или 1% гипохлоритом натрия, 3-кратная промывка стерильной водой	Стерилизация колосьев 70% этанолом или 1% гипохлоритом натрия, 3-кратная промывка стерильной водой
Этап 6 Stage 6		Гомогенизация – скорость 6-8 тыс. об/сек, 10-50 секунд
Этап 7 Stage 7		Фильтрация через сито 100 μm
Этап 8 Stage 8		Центрифугирование в течение 3-6 минут при 100 g, дважды или в градиенте плотности
Этап 9 Stage 9		Доведение плотности микроспор до 3-7 x 10 ⁴ микроспор/мл
Этап 10 Stage 10	Осмотическая и температурная постобработка и голодание – маннитол, +32°C, 3 дня	Осмотическая и температурная постобработка и голодание – маннитол, +32°C, 3 дня
Этап 11 Stage 11	Культивирование пыльников в чашках Петри на среде индукции. Помещение в термостат при 22-25°C на 4 недели в темноте	Культивирование микроспор в чашке Петри на среде индукции. Помещение в термостат при +22-25°C на 4 недели в темноте
Этап 12	Перенос полученных эмбриоидов на среду	Перенос полученных эмбриоидов на среду для

Stage 12	для регенерации при 16-часовом фотопериоде при 22°C	регенерации при 16-часовом фотопериоде при 22°C
Этап 13 Stage 13	Перенос растений в землю (16-часовой фотопериод, температура 15-20°C)	Перенос растений в землю (16-часовой фотопериод, температура 15-20°C)
Этап 14 Stage 14	Контроль плоидности полученных растений	Контроль плоидности полученных растений

Спонтанное удвоение хромосом обычно низкое. Поэтому иногда применяют антимитотические агенты. Число эмбрионов было ниже, но число зеленых проростков удвоилось, число гаплоидов на колос было выше. Однако уровень диплоидизации из года в год меняется и часто получаются химеры. Успех также очень зависит от среды и условий культивирования, да и сама технология обработки колхицином очень сложна и вредна.

Поэтому в последние годы ученые все чаще используют спонтанную диплоидизацию из-за ее простоты и безопасности. Хотя процент получения дигаплоидов и ниже, зато, учитывая огромное количество задействованных микроспор, можно получать значительное количество полностью фертильных, взрослых, дигаплоидных растений [42, 43].

ПРИМЕНЕНИЕ ГАПЛОИДНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ

Гаплоидные растения и полученные гомозиготные линии используются в нескольких областях фундаментальных исследований, в таких как цитогенетика, молекулярная генетика, эволюция культур, биотехнология растений и традиционная селекция растений [44]. Гаплоидия предоставляет эффективный инструмент исследований для изучения индуцированного мутагенеза и генетической трансформации. Платформа ДГ технологии предлагает быстрый способ получения действительно гомозиготной линии, которая помогает ускорить селекционные программы сельскохозяйственных культур, где однородность является абсолютно необходимым параметром для быстрого развития сельскохозяйственных культур.

Гаплоидия является общепринятой терминологией, используемой для всех спорофитов, будь с диплоидным или полиплоидным гаметным числом хромосом. При упрощенном толковании дигаплоид (удвоенный гаплоид – ДГ) – это генотип, полученный при удвоении хромосом гаплоидной клетки. ДГ популяции схожи по генетике с рекомбинантными инбредными линиями; порожденные из единого источника происхождения семян, были использованы для картирования локусов количественных признаков (QTLs) для некоторых признаков.

Наследственные признаки, кодируемые рецессивным геном(и), могут быть эффективно обнаружены в небольших популяциях ДГ растений, необходимых для скрининга желательных рекомбинантов. Эмбриогенез микроспор в культуре пыльников/изолированных микроспор – наиболее часто используемый метод для создания ДГ.

Гаплоидная технология в настоящее время адаптирована в различных программах селекции растений и является наиболее часто используемым подходом для быстрого развития культур для передачи полезных генов, хромосомных сегментов или даже полных хромосом. Сорты пшеницы, полученные с использованием ДГ, выращиваются повсеместно и оказались доминирующими в ряде стран по всему миру.

И сегодня на первый план в селекционных программах выходят: время и финансовые затраты, необходимые на получение нового сорта. Поэтому во многих селекционных центрах проводят различные сравнительные исследования, направленные на снижение времени и увеличение экономической эффективности селекции. На рисунках 5 и 6 даны примеры таких исследований.

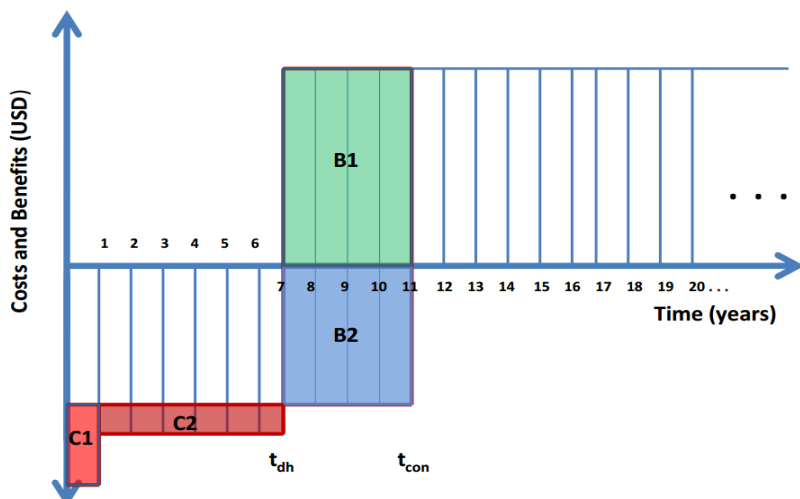


Рис. 5. Эффективность и стоимость традиционной и ДГ селекции [53]

Fig. 5. Efficiency and cost of traditional and DH breeding [53]

Индукцированная гаплоидия способствует стабилизации гетерозиса с интересующим геном. Полученные гибридные линии и последующее удвоение хромосом для получения гомозиготности при введении чужеродного гена(ов), тем самым стабилизирует недавно реконструированный очень сложный геном растения. Эта техника также очень полезна при генетической трансформации полиплоидной пшеницы (44). Прямое включение клонированных генов на гаплоидном уровне в соответствии с последующим удвоением хромосом может помочь ускорить стабильную интеграцию гена-мишени(ей).

Применение ДГ технологий для ускорения селекции растений показано на рисунке 7.

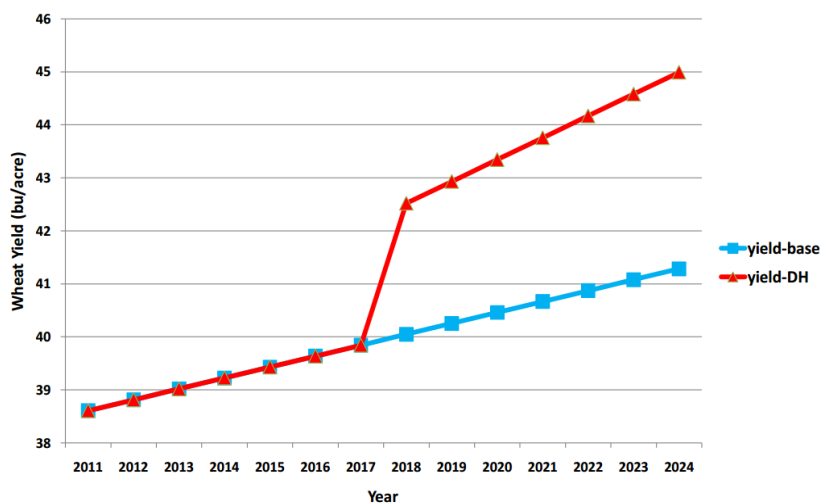


Рис. 6. Сравнение традиционной и ДГ селекции пшеницы [53]

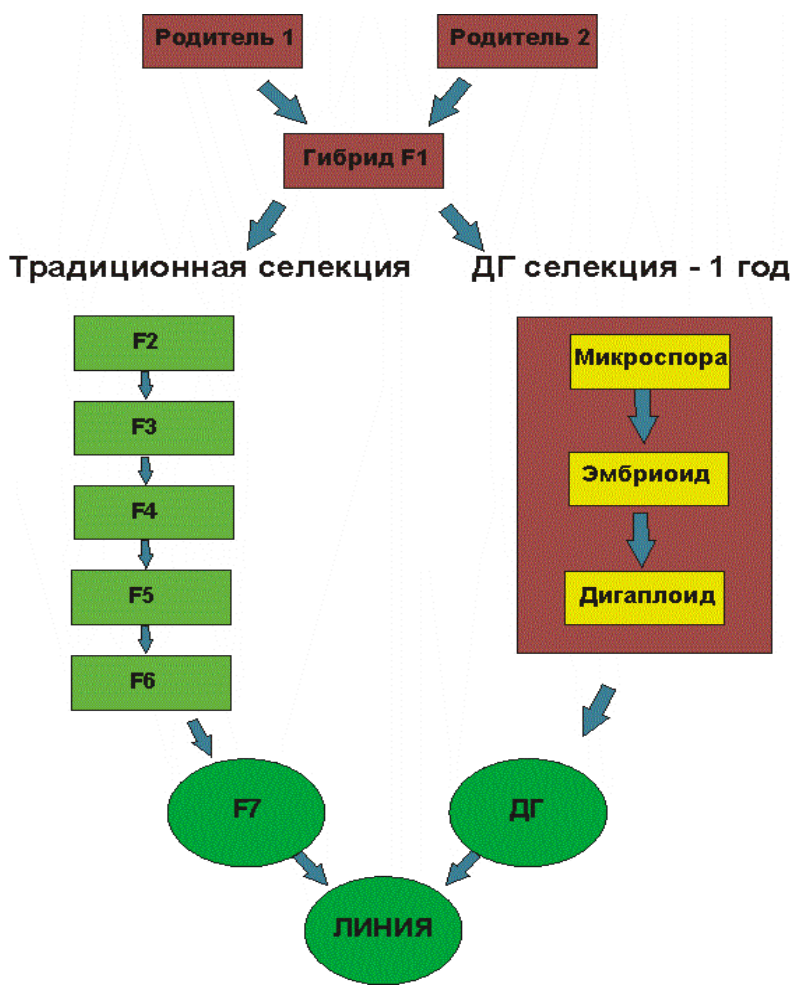


Fig. 6. Comparison of conventional and DH wheat breeding [53]

Традиционно, в рамках усилий по сокращению циклов размножений, селекционеры предпочитают получать ДГ от поколения F1. Гомозиготирование на таком раннем этапе может ограничить возможность для рекомбинаций [51].

Рис. 7. Схема ускорения селекционного процесса с использованием ДГ технологий

Fig. 7. Scheme of the speed up the breeding process with DH Technology

ПЕРСПЕКТИВЫ ГАПЛОИДНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ

Интеграция технологии гаплоидии вместе с другими имеющимися биотехнологическими инструментами, такие как селекция с помощью маркеров (MAS), индуцированного мутагенеза и трансгенных технологий могут также эффективно ускорить программы улучшения сельскохозяйственных культур, работающих по всему миру.

В начале 1990-х были разработаны большинство основных протоколов для гаплоидии и дигаплоидии, но многие из них были неэффективны. В течение прошлых десятилетий прогресс в технологии был достигнут главным образом эмпирически, время и стоимость используемых тестируемых протоколов и, как следствие, успех был пропорционален числу вовлеченных лабораторий. В наиболее часто изучаемых зерновых культурах (ячмень, пшеница, тритикале, кукуруза, рис и рапс) улучшенные протоколы теперь обычно используются в селекции, и хотя некоторые проблемы остаются, преимущества данной технологии делают дигаплоидию перспективным методом. Существенные достижения были также получены на овощах, фруктах, декоративных, древесных и лекарственных видах.

Применение удвоенных гаплоидов – сегодня уже рутинная процедура в селекции рапса, ячменя и тритикале. Хотя довольно значительное количество линий ДГ может быть произведено в селекционных программах, есть все еще некоторые ограничивающие факторы, которые связаны с техническими и генетическими факторами. Чтобы улучшить эффективность регенерации в более широком диапазоне генотипов, издаются различные сборники, где собираются детальные руководства, которые описывают протоколы для получения ДГ.

Усовершенствования, приводящие к более или менее эффективным технологиям, были изданы многими авторами [2, 46]. И вообще различные технологии культуры пыльника (КП), изолированная культура микроспоры (КИМ) и отдаленные скрещивания (ОС) стали сегодня «обычными» в селекции и программах исследования во всем мире, однако есть все еще некоторые препятствия и необходимы дальнейшие исследования, чтобы преодолеть ограничения, такие как зависимость от генотипа, альбинизм и низкая фертильность после дигаплоидизации. Поскольку удвоенные гаплоидные технологии по существу становятся более эффективными на уровне научно-исследовательской лаборатории и в практических селекционных программах и при взаимодействии с технологиями молекулярного маркирования, то, соответственно, и сами становятся более приспособленными и адаптивными. Получение фертильных удвоенных гаплоидных линий все еще считается дорогим и требует быстрого размножения семян, многолетних полевых испытаний и высококачественной коллекции и аналитической системы.

В то время как исследователи ожидают дальнейшую оптимизацию протоколов, фундаментальные исследования в управлении механизмами эмбриогенеза микроспор только начали продвигаться, но базовые параметры уже ясны. По крайней мере два эффективных подхода могут использоваться, чтобы идентифицировать маркеры, связанные с развитием андрогенеза микроспор пшеницы. Первое: используются генные продукты, синтезируемые во время эмбриогенеза в естественных условиях, исследование развития микроспор в эмбриониды. Второе: сравнительное использование подхода исследований по экспрессии генов во время гаметогенеза и эмбриогенеза микроспор. Лучшее понимание генетических, клеточных, биохимических и молекулярных механизмов, связанных с эмбриогенезом микроспор пшеницы, будет способствовать дальнейшему улучшению ДГ технологий и расширению генофонда, из которых ДГ могут быть получены. Недавние достижения в технологии уже сделали культуру изолированных микроспор более перспективными по сравнению с культурой пыльников. Во-первых, из большего количества эмбрионных микроспор получают большее количество ДГ. Во-вторых, одноклеточные микроспоры обеспечивают прямой доступ для управления процессом индукции, следовательно, возможно максимизирование эффективности культуры. И наконец, возможность выделения и культивирования гомогенной популяции эмбрионных микроспор предоставляет идеальную систему анализа сигналов трансдукции путей развития эмбриогенеза *in vitro* и событий, связанных с ним [5].

Ускорение селекционного процесса, благодаря применению гаплоидных технологий и селекции на основе ДНК-маркеров, позволит сократить создание новых сортов растений на 3-5 лет, при обычном сроке 10-12 лет, ускорить сортосмену, снизить затраты на создание сорта на 15-20% [4, 54].

Однако, на пути к созданию универсальной системы для всех генотипов остаются неуловимые нюансы из-за генетического различия в их откликах на искусственные манипуляции. Изменение генотипа и отличительные отклики генотипов к изменениям в условиях роста и культивирования делают трудным разработку единой

методику культивирования, подходящую для всех генотипов. Таким образом, пока полностью не понятен процесс эмбриогенеза микроспор, среда культивирования должна подбираться к определенным генотипам индивидуально. Будущие исследования должны быть направлены на понимание механизмов генетического контроля, молекулярных и биохимических механизмов, управляющих всем процессом эмбриогенеза микроспор, вероятно, через сравнительные исследования между отзывчивыми и упрямыми генотипами. Тем не менее, разработанные к настоящему времени системы эффективны для большинства генотипов зерновых культур и уже могут быть использованы в практической селекции.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование выполнено в рамках проекта «Использование физиолого-биохимических, биотехнологических, молекулярно-генетических и генно-инженерных методов в селекционном процессе для создания перспективных линий и оценке константных форм озимой пшеницы и тритикале», финансируемого Министерством сельского хозяйства Республики Казахстан.

ЛИТЕРАТУРА

1. Wedzony M., Foster B.P., Zur I., Golemiac E., Szechynska-Hebda M., Dubas E., Gotebiowska G. Progress in doubled haploid technology in higher plants // *Advanced in haploid production in higher plants* / ed. A. Touraev, B.P. Foster, E.M. Jain. – SpringerScience + 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 // *Advanced in haploid production in higher plants* / ed. A. Touraev, B.P. Foster, E.M. Jain. – SpringerScience + BusinessMedia B.V. – 2009. – P. 179-189.
4. Уразалиев К.Р., Орсини Х.М., Абекова А.М., Базылова Т.А., Даниярова А.К. Ускорение селекции пшеницы с использованием дигамплоидов, полученных методом культуры микроспор // *Бюллетень КазНУ. Серия экологическая.* – 2013. – №2/2(38). – С. 369-374.
5. Zheng M.Y. Microspore culture in wheat (*Triticum aestivum*) – doubled haploid production via induced embryogenesis // *Plant Cell Tiss Org Cult.* – 2003. – Vol. 73. – P. 213-230.
6. Dunwell J.M. Haploids in flowering plants: origins and exploration // *Plant biotechnology journal.* – 2010. – Vol. 8. – P. 377-424.
7. Guha S., Maheshwari S.C. In vitro production of embryos from anthers of *Datura* // *Nature.* – 1964. – Vol. 204. – P. 497.
8. Nakata K., Tanaka M. Differentiation of embryoids from developing germcells in anther culture of tobacco // *Jap. J. Genet.* – 1968. – Vol. 43. – P. 67-71.
9. Nistch J.P. Experimental androgenesis in *Nicotiana* // *Phytomorp.* – 1969. – Vol. 19. – P. 389-404.
10. Niizeki H., Oono K. Induction of haploid rice plant from anther culture // *Proc. Japan Acad.* – 1968. – Vol. 44. – P. 554-557.
11. Ouyang Y.W., Hu C.C., Chuang C.C., Tseng C.C. Induction of pollen plants from anthers of *Triticum aestivum* L. cultured in vitro // *Sci Sin.* – 1973. – Vol. 16. – P. 79-95.
12. Picard E., Buysier J.D. Obtention de plantlets haploides de *Triticum aestivum* L. a partir de cultures d'antheres in vitro // *CR Academie des Sciences.* – 1973. – Vol. 277. – P. 1463-1466.
13. Wei Z.M. Pollen callus culture in *Triticum aestivum* // *Theor. Appl. Genet.* – 1982. – Vol. 67. – P. 71-73.
14. Datta S.K., Wenzel G. Isolated microspore derived plant formation via embryogenesis in *Triticum aestivum* L. // *Plant Sci.* – 1987. – Vol. 48. – P. 49-54.
15. Tuveesson I.K.D., Öhlund R.C.V. Plant regeneration through culture of isolated microspores of *Triticum aestivum* L. // *Plant Cell Tissue Organ Cult.* – 1993. – Vol. 34. – P. 163-167.
16. Mejza S.J., Morgant V., DiBona D.E., Wong J.R. Plant regeneration from isolated microspores of *Triticum aestivum* // *Plant Cell Rep.* – 1993. – Vol. 12. – P. 149-153.
17. Barclay I.R. High frequencies of haploid production in wheat (*Triticum aestivum*) by chromosome elimination // *Nature.* – 1975. – Vol. 256. – P. 410-411.
18. Laurie D.A., Bennett M.D. Wheat × maize hybridization // *Can. J. Genet. Cytol.* – 1986. – Vol. 28. – P. 313-316.
19. Inagaki M.N., Tahir M. Comparison of haploid production frequencies in wheat varieties crossed with *Hordeum bulbosum* L. and maize // *Japanese Journal of Breeding.* – 1990. – Vol. 40. – P. 209-216.
20. Cistué L., Soriano M., Castillo A.M., Vallés M.P., Sanz J.M., Echavarri B. Production of doubled haploid in durum wheat (*Triticum turgidum* L.) through isolated microspore culture // *Plant Cell Rep.* – 2006. – Vol. 25. – P. 257-264.
21. Labbani Z., Buysier J.D., Picard E. Effect of mannitol pretreatment to improve green regeneration on isolated microspore culture in *Triticum turgidum* ssp. Durum cv. 'Jannah Khetifa' // *Plant Breed.* – 2007. – Vol. 126. – P. 565-568.
22. Clapman D. Haploid *Hordeum* plants from anthers *in vitro* // *Z. Pflanzenzüchtg.* – 1973. – Vol. 69. – P. 142-155.

23. Kao K.N., Saleem M., Abrams S., Pedras M., Horn D., Mallard C. Culture conditions for induction of green plants from barley microspores by anther culture methods // *Plant Cell Reports*. – 1991. – Vol. 9. – P. 595-601.
24. Bernard S., Picard E., Buysier J.D. Obtaining haploid plants from Triticale hexaploides (X Triticosecale Wittmack) by in vitro anther culture // *C. R. Acad. Sci.* – 1976. – Vol. 283. – P. 235-238.
25. Wang Y.Y., Sun C.S., Wang C.C., Chien N.F. The induction of the pollen plants of Triticale and Capsicum annuum from anther culture // *Sci. Sinica*. – 1973. – Vol. 16. – P. 147-151.
26. Lehmann C., Krolow K.D. Experiments on haploid production from tetraploid triticales by the Hordeum bulbosum system and anther culture // *Cereal Res. Commun.* – 1991. – Vol. 19. – P. 283-290.
27. Pauk J., Puolimatka M., Toth K.L., Monostori T. In vitro androgenesis of triticale in isolated microspore culture // *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* – 2000. – Vol. 61. – P. 221-229.
28. Chen, Y., Zahavi, E., Barak, P., Ummiel, N. Effects of salinity stresses on tobacco. I. The growth of N. tabacum callus cultures under seawater, NaCl, and mannitol stresses // *Z. Pflanzenphysiol. Bd.* – 1980. – Vol. 98. – P. 141-153.
29. Rines H.W., Riera-Lizarazu O., Nunez V.M., Davis D.W., Phillips R.L. Oat haploids from anther culture and from wide hybridizations // *In Vitro Haploid Production in Higher Plants. Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture*. – 1997. – Vol. 26. – P. 205-221.
30. Deimling S., Flehinghaus-Roux T. Haploidy in rye // *In Vitro Haploid Production in Higher Plants. Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture*. – 1997. – Vol. 26. – P. 181-204.
31. Choi B.H., Park K.Y., Park R.K. Haploidy in pearl millet [Pennisetum glaucum (L.) R. Br.] // *In Vitro Haploid Production in Higher Plants. Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture*. – 1997. – Vol. 26. – P. 171-179.
32. Büter B. *In vitro* haploid production in maize // *In Vitro Haploid Production in Higher Plants. Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture*. – 1997. – Vol. 26. – P. 37-71.
33. Liang George H., Xu Gu, Guilan Yue, Z.S. Shi, K.D. Kofoid. Haploidy in sorghum // *In Vitro Haploid Production in Higher Plants. Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture*. – 1997. – Vol. 26. – P. 149-161.
34. Kammholz S.J., Suttierland M.W., Banks P.M. Improving the efficiency of haploid wheat production mediated by wide crossing // *SABRAO Journal*. – 1995. – Vol. 28(1). – P. 37-46.
35. Niroula R.K., Bimb H.P. Overview of Wheat X Maize System of Crosses for Dihaploid Induction in Wheat // *World Applied Sciences Journal*. – 2009. – Vol. 7(8). – P. 1037-1045.
36. Hussain B., Muhammad A. K., Qurban A., Shadab S. Double Haploid Production in Wheat Through Microspore Culture And Wheat X Maize Crossing System: An Overview // *International Journal for Agro Veterinary and Medical Sciences*. – 2012. – Vol. 6(5). – P. 332-344.
37. Yang H.Y., Zhou C. In vitro induction of haploid plants from unpollinated ovaries and ovules // *Theor Appl Genet*. – 1982. – Vol. 63(2). – P. 97-104.
38. Mukhambetzhonov S.K. Culture of nonfertilized female gametophytes in vitro // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. – 1997. – Vol. 48(2). – P. 111-119.
39. Bohanec B. Doubled Haploids via Gynogenesis // *Advanced in haploid production in higher plants / ed. A. Touraev, B.P. Foster, E.M. Jain*. – SpringerScience + BusinessMedia B.V. – 2009. – P. 47-65.
40. Kielkowska A., Adamus A., Baranski R. An improved protocol for carrot haploid and doubled haploid plant production using induced parthenogenesis and ovule excision in vitro // *In Vitro Cell.Dev.Biol. – Plant*. – 2014.
41. Seguí-Simarro J.M. Nuez F. How microspores transform into haploid embryos: changes associated with embryogenesis induction and microspore-derived embryogenesis // *Physiol Plantarum*. – 2008. – Vol. 134, №1. – P. 1-12.
42. 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.
43. Lantos C., Weyen J., Orsini J.M., Gnad H., Schlieter B., Lein V., Kontowski S., Jacobi A., Mihaly R., Broughton S., Pauk J. Efficient application of in vitro anther culture for different European winter wheat (Triticum aestivum L.) breeding programmes // *Plant Breeding*. – 2013. – Vol. 132. – P. 149-154.
44. Touraev A., Forster B.P., Jain S.M. Advances in haploid production in higher plants // *SpringerScience + BusinessMedia B.V.* – 2009. – 347 p.
45. Basu S.K., Eudes F., Kovalchuk I. Role of *recA/RAD51* gene family in homologous recombination repair and genetic engineering of transgenic plants // *In: Applications of plant biotechnology: In vitro propagation, plant transformation and secondary metabolite production. Chapter 12 / ed. A. Kumar and S. Sopory*. – New Delhi, India: I.K. International Publishing Houst Pvt Ltd. – 2010. – P. 231-255.
46. Soriano M., Li H., Boutilier K. Microspore embryogenesis: establishment of embryo identity and pattern in culture // *Plant Reprod.* – 2013. – Vol. 26. – P. 181-196.
47. Kasha K.J., Simion E., Oro R., Yao Q.A., Hu T.C., Carlson A.R. An improved in vitro technique for isolated microspore culture of barley // *Euphytica*. – 2001. – Vol. 120. – P. 379-385.
48. Yeung E.C. The canola microspore derived embryo as a model system to study developmental processes in plants // *J. Plant Biol.* – 2002. – Vol. 45(3). – P. 119-133.

49. Vicente O., Benito-Moreno R.M., Heberle-Bors, E. Pollen cultures as a tool to study plant development // *Cell Biol. Rev.* 1991. – Vol. 25. – P. 295-305.
50. Reynolds T.L. Pollen embryogenesis // *Plant Mol. Biol.* 1997. – Vol. 33. – P. 1-10.
51. Tadesse W., Tawkaz S., Inagaki M.N., Picard E., Baum M. Methods and applications of doubled haploid technology in wheat breeding. A technical manual // ICARDA. – 2013. – 36 p.
52. Lantos C., Jancso M., Pauk J. Microspore culture of small grain cereals // *Acta Physiol. Plant.* – 2005. – Vol. 27. – P. 631-639.
53. Barkley A., Chumley F.G. A Doubled Haploid Laboratory for Kansas Wheat Breeding: An Economic Analysis of Biotechnology Adoption // *International Food and Agribusiness Management Review.* – 2012. – Vol. 15(2). – P. 99-120.
54. Беккужина С.С., Боровиков С.Н., Рахимбаев И. Сигнальные функции гормонов и реакция ответа на стрессоры при индукции пыльцевого эмбриогенеза // *Биотехнология. Теория и практика.* – 2014. – №3. – С. 28-37.

REFERENCES

1. Wedzony M., Foster B.P., Zur I., Golemiac E., Szechynska-Hebda M., Dubas E., Gotebiowska G. Progress in doubled haploid technology in higher plants // *Advanced in haploid production in higher plants.* ed. A.Touraev, B.P. Foster, E.M. Jain. *SpringerScience + BusinessMedia B.V.*, 2009, pp. 1-35.
2. Germana M.A. Anther culture for haploid and doubled haploid production. *Plant Cell Tiss Org Cult.*, 2011, vol. 104, pp. 283-300.
3. Weyen J. Barley and wheat doubled haploids in breeding // *Advanced in haploid production in higher plants.* ed. A. Touraev, B.P. Foster, E.M. Jain. *SpringerScience + BusinessMedia B.V.*, 2009, pp. 179-189.
4. Urazaliyev K.R., Orsini J.M., Abekova A.M., Bazylova T.A., Daniyarova A.K.. Speeding wheat breeding using dihaploids obtained by microspore cultureю. *Bulletin of the KNU: a environmental series*, 2013, no. 2/2(38), pp. 369-374.
5. Zheng M.Y. Microspore culture in wheat (*Triticum aestivum*) – doubled haploid production via induced embryogenesis. *Plant Cell Tiss Org Cult.*, 2003, vol. 73, pp. 213-230.
6. Dunwell J.M. Haploids in flowering plants: origins and exploration. *Plant biotechnology journal*, 2010, vol. 8, pp. 377-424.
7. Guha S., Maheshwari S.C. In vitro production of embryos from anthers of *Datura*. *Nature*, 1964, vol. 204, pp. 497.
8. Nakata K., Tanaka M. Differentiation of embryoids from developing germcells in anther culture of tobacco. *Jap. J. Genet*, 1968, vol. 43, pp. 67-71.
9. Nistch J.P. Experimental androgenesis in *Nicotiana*. *Phytomorp.*, 1969, vol. 19, pp. 389-404.
10. Niizeki H., Oono K. Induction of haploid rice plant from anther culture. *Proc. Japan Acad.*, 1968, vol. 44, pp. 554-557.
11. Ouyang Y.W., Hu C.C., Chuang C.C., Tseng C.C. Induction of pollen plants from anthers of *Triticum aestivum* L. cultured in vitro. *Sci Sin.*, 1973, vol. 16, pp. 79-95.
12. Picard E., Buysier J.D. Obtention de plantlets haploides de *Triticum aestivum* L. a partir de cultures d'antheres in vitro. *CR Academie des Sciences*, 1973, vol. 277, pp. 1463-1466.
13. Wei Z.M. Pollen callus culture in *Triticum aestivum*. *Theor. Appl. Genet.*, 1982, vol. 67, pp. 71-73.
14. Datta S.K., Wenzel G. Isolated microspore derived plant formation via embryogenesis in *Triticum aestivum* L. *Plant Sci.*, 1987, vol. 48, pp. 49-54. doi:10.1016/0168-9452(87)90069-07.
15. Tuveesson I.K.D., Öhlund R.C.V. Plant regeneration through culture of isolated microspores of *Triticum aestivum* L. // *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 1993, vol. 34, pp. 163-167.
16. Mejza S.J., Morgant V., DiBona D.E., Wong J.R. Plant regeneration from isolated microspores of *Triticum aestivum*. *Plant Cell Rep.*, 1993, vol. 12, pp. 149-153.
17. Barclay I.R. High frequencies of haploid production in wheat (*Triticum aestivum*) by chromosome elimination. *Nature*, 1975, vol. 256, pp. 410-411.
18. Laurie D.A., Bennett M.D. Wheat × maize hybridization. *Can. J. Genet. Cytol.*, 1986, vol. 28, pp. 313-316.
19. Inagaki M.N., Tahir M. Comparison of haploid production frequencies in wheat varieties crossed with *Hordeum bulbosum* L. and maize. *Japanese Journal of Breeding*, 1990, vol. 40, pp. 209-216.
20. Cistué L., Soriano M., Castillo A.M., Vallés M.P., Sanz J.M., Echavarri B. Production of doubled haploid in durum wheat (*Triticum turgidum* L.) through isolated microspore culture. *Plant Cell Rep.*, 2006, vol. 25, pp. 257-264.
21. Labbani Z., Buysier J.D., Picard E. Effect of mannitol pretreatment to improve green regeneration on isolated microspore culture in *Triticum turgidum* ssp. Durum cv. 'Jannah Khetifa'. *Plant Breed*, 2007, vol. 126, pp. 565-568.
22. Clapman D. Haploid *Hordeum* plants from anthers in vitro. *Z. Pflanzenzüchtg*, 1973, vol. 69, pp. 142-155.
23. Kao K.N., Saleem M., Abrams S., Pedras M., Horn D., Mallard C. Culture conditions for induction of green plants from barley microspores by anther culture methods. *Plant Cell Reports.*, 1991, vol. 9, pp. 595-601.
24. Bernard S., Picard E., Buysier J.D. Obtaining haploid plants from *Triticale hexaploides* (X *Triticosecale* Wittmack) by in vitro anther culture. *C. R. Acad. Sci.*, 1976, vol. 283, pp. 235-238.

25. Wang Y.Y., Sun C.S., Wang C.C., Chien N.F. The induction of the pollen plants of Triticale and Capsicum annuum from anther culture. *Sci. Sinica*, 1973, vol. 16, pp. 147-151.
26. Lehmann C., Krolow K.D. Experiments on haploid production from tetraploid triticales by the Hordeum bulbosum system and anther culture. *Cereal Res. Commun.*, 1991, vol. 19, pp. 283-290.
27. Pauk J., Puolimatka M., Toth K.L., Monostori T. In vitro androgenesis of triticale in isolated microspore culture. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, 2000, vol. 61, pp. 221-229.
28. Chen Y., Zahavi E., Barak P., Ummiel N. Effects of salinity stresses on tobacco. I. The growth of N. tabacum callus cultures under seawater, NaCl, and manitol stresses. *Z. Pflanzenphysiol. Bd.*, 1980, vol. 98, pp. 141-153.
29. Rines H.W., Riera-Lizarazu O., Nunez V.M., Davis D.W., Phillips R.L. Oat haploids from anther culture and from wide hybridizations // *In Vitro Haploid Production in Higher Plants. Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture*, 1997, vol. 26, pp. 205-221.
30. Deimling S., Flehinghaus-Roux T. Haploidy in rye // *In Vitro Haploid Production in Higher Plants. Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture*, 1997, vol. 26, pp. 181-204.
31. Choi B.H., Park K.Y., Park R.K. Haploidy in pearl millet [Pennisetum glaucum (L.) R. Br.] // *In Vitro Haploid Production in Higher Plants. Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture*, 1997, vol. 26, pp. 171-179.
32. Bütter B. In vitro haploid production in maize // *In Vitro Haploid Production in Higher Plants. Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture*, 1997, vol. 26, pp. 37-71.
33. Liang George H., Xu Gu, Guilan Yue, Z.S. Shi, K.D. Kofoid. Haploidy in sorghum // *In Vitro Haploid Production in Higher Plants. Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture*, 1997, vol. 26, pp. 149-161.
34. Kammholz S.J., Suttierland M.W., Banks P.M. Improving the efficiency of haploid wheat production mediated by wide crossing. *SABRAO Journal*, 1995, vol. 28(1), pp. 37-46.
35. Niroula R.K., Bimb H.P. Overview of Wheat X Maize System of Crosses for Dihaploid Induction in Wheat. *World Applied Sciences Journal*, 2009, vol. 7(8), pp. 1037-1045.
36. Hussain B., Muhammad A.K., Qurban A., Shadab S. Double Haploid Production in Wheat Through Microspore Culture And Wheat X Maize Crossing System: An Overview. *International Journal for Agro Veterinary and Medical Sciences*, 2012, vol. 6(5), pp. 332-344.
37. Yang H.Y., Zhou C. In vitro induction of haploid plants from unpollinated ovaries and ovules. *Theor Appl Genet.*, 1982, vol. 63(2), pp. 97-104.
38. Mukhambetzhonov S.K. Culture of nonfertilized female gametophytes in vitro. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1997, vol. 48(2), pp. 111-119.
39. Bohanec B. Doubled Haploids via Gynogenesis // *Advanced in haploid production in higher plants*. Ed. A. Touraev, B.P. Foster, E.M. Jain. *SpringerScience + BusinessMedia B.V.*, 2009, pp. 47-65.
40. Kielkowska A., Adamus A., Baranski R. An improved protocol for carrot haploid and doubled haploid plant production using induced parthenogenesis and ovule excision in vitro. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.*, 2014. Online. doi: 10.1007/s11627-014-9597-1.
41. Seguí-Simarro J.M. Nuez F. How microspores transform into haploid embryos: changes associated with embryogenesis induction and microspore-derived embryogenesis. *Physiol Plantarum.*, 2008, vol. 134, no. 1, pp. 1-12.
42. 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.) J. Efficient application of in vitro anther culture for different European winter wheat (Triticum aestivum L.) breeding programmes. *Plant Breeding*, 2013, vol. 132, pp. 149-154.
43. Touraev A., Forster B.P., Jain S.M. Advances in haploid production in higher plants. *SpringerScience + BusinessMedia B.V.*, 2009, 347 p.
44. Basu S.K., Eudes F., Kovalchuk I. Role of *recA/RAD51* gene family in homologous recombination repair and genetic engineering of transgenic plants // *Applications of plant biotechnology: In vitro propagation, plant transformation and secondary metabolite production*. Chapter 12. ed. A. Kumar and S. Sopory. New Delhi, India: I.K. International Publishing Houst Pvt Ltd, 2010, pp. 231-255.
45. Soriano M., Li H., Boutilier K. Microspore embryogenesis: establishment of embryo identity and pattern in culture. *Plant Reprod.*, 2013, vol. 26, pp. 181-196.
46. Kasha K.J. Simion E., Oro R., Yao Q.A., Hu T.C., Carlson A.R. An improved in vitro technique for isolated microspore culture of barley. *Euphytica*, 2001, vol. 120, pp. 379-385.
47. Yeung E.C. The canola microspore derived embryo as a model system to study developmental processes in plants. *J. Plant Biol.*, 2002, vol. 45(3), pp. 119-133.
48. Vicente O., Benito-Moreno R.M., Heberle-Bors E. Pollen cultures as a tool to study plant development. *Cell Biol. Rev.*, 1991, vol. 25, pp. 295-305.
49. Reynolds T.L. Pollen embryogenesis. *Plant Mol. Biol.*, 1997, vol. 33, pp. 1-10.
50. Tadesse W., Tawkaz S., Inagaki M.N., Picard E., Baum M. Methods and applications of doubled haploid technology in wheat breeding. A technical manual. *ICARDA*, 2013, 36 p.
51. Lantos C., Jancso M., Pauk J. Microspore culture of small grain cereals. *Acta Physiol. Plant.*, 2005, vol. 27, pp. 631-639.

52. Barkley A., Chumley F.G. A Doubled Haploid Laboratory for Kansas Wheat Breeding: An Economic Analysis of Biotechnology Adoption. *International Food and Agribusiness Management Review*, 2012, vol. 15(2), pp. 99-120.

53. Bekkuzhina S.S., Borovikov S.N., Rahimbaev I. Signal function of hormones and response to pollen embryogenesis induction stressors. *Biotechnology. Theory and practice*, 2014, no. 3, pp. 28-37.

ӨСІМДІКТЕРДІҢ СЕЛЕКЦИЯСЫНДАҒЫ ГАПЛОИДТЫҚ ТЕХНОЛОГИЯЛАР

Уразалиев К.Р.

Қазақ Егіншілік және Өсімдік шаруашылығы Ғылыми Зерттеу Институты
040909, Ерлеспесов көш., 1, Алмалыбак ауылы, Карасай ауданы, Алматы облысы, Қазақстан
kairatu@mail.ru

ТҮЙІН

Гаплоидты немесе дигаплоидты өсімдіктер тудыра отырып, гаметалық жасушаларды қалпына келтіру - гаметогенез деп аталатын, өсімдіктер жасушаларының тотипотенттілігінің өте тамаша мысалы. Дигаплоидты өсімдіктерді андрогенез немесе гиногенез арқылы алу бір кезеңде (жылда) гомозигота өсімдіктерін алуға мүмкіндік береді. Осы тәсіл өсімдіктерді селекциясы, генетикалық манипуляция кезінде және өсімдіктер биологиясын зерттеумен байланысты іргелі зерттеулердің көптеген салаларында көмектеседі. Бір ұрпақта гомозиготалыққа қол жеткізу инбридингті будандастырулардың көптеген циклдерін азайтуға көмектеседі. Өсімдіктерді қалпына келтірудің тиімді жүйесімен гаметалық жасушалар да селекция, генетикалық трансформациялар, өсімдіктерді трансгенетикалық зерттеулер және басқа мақсаттар үшін неғұрлым қолайлы болып көрінеді.

Дигаплоидты өсімдіктер және алынған гомозиготалық сорттармақтар өсімдіктердің классикалық генетикасы және цитогенетикасы, қазіргі заманғы молекулалық генетика, соның ішінде индукцияланған мутагенез, геномды карталау сияқты іргелі зерттеулердің көптеген салаларында пайдаланылады. Дигаплоидтарды практикалық қолданудың неғұрлым маңызды саласы өсімдіктер селекциясы болып табылады.

Өсімдіктерді микроспоралардан қалпына келтіру мүмкіндігіне көптеген өсімдік түрлері ие. Микроспораларды гаметофиттік дамудан спорофиттік даму жолына ауыстыру үшін табиғи, физиологиялық және/немесе химиялық өңдеу түрінде алдын ала өңдеу жүргізу қажет. Бұл процесстің тиімділігінің артуы жекелеген микроспораларды жасанды манипуляциялауға тікелей қол жеткізуді және қалпына келтірілген өсімдіктердің 300-ден астам түрін ойдағыдай алуды мүмкін етті.

Негізгі сөздер: дигаплоид, гаплоидтік технология, тозандық, микроспора, гомозигота, селекция.