

LATVIJAS UNIVERSITĀTE
BIOLOĢIJAS FAKULTĀTE
MOLEKULĀRAS BIOLOĢIJAS KATEDRA

**VASARAS KVIEŠU HIBRĪDU (*TRITICUM DURUM* X
TRITICUM AESTIVUM) GAMETISKO ŠŪNU *IN VITRO*
KULTŪRU IZVEIDOŠANA UN DUBULTOTO
HAPLOĪDU IEGŪŠANA UN ANALĪZE**

BAKALaura DARBS

Autore: **Jana Kiseļova**

Stud. apl. Nr. jk20055

Darba vadītāja: Dr.biol., asoc. prof. Dace Grauda

Darba konsultante: Mg.biol. Andra Miķelsone

Recenzents: Mg.biol. Kārlis Žagata

RĪGA 2023

KOPSAVILKUMS

Pieprasījums pēc kviešiem nemazinās, tāpēc selekcionāri turpina strādāt pie uzlabotas kvalitātes šķirņu izveides. Jaunu šķirņu izveidošana klasiskās selekcijas ceļā prasa aptuveni 12 gadus, tādēļ ir aktuāli pilnveidot metodes, kuras paātrina šo procesu. Visefektīvākā metode ir dubultoto haploīdu iegūšana, pielietojot putekšņmaciņu metodi. Šī darba mērķis bija pārbaudīt putekšņmaciņu kultūras metodi zaļo augu-reģenerantu dubultoto haploīdu iegūšanai no starpsugu hibrīdiem (*Triticum durum* x *Triticum aestivum*) un izpētīt to ģenētisko daudzveidību. Darba gaitā tika iegūti 16 zaļie augi-reģeneranti. Izmantojot iPBS PCR metodi, tika secināts, ka pielietojot putekšņmaciņu kultūru, ir iespējams iegūt ģenētiski stabilas dubultoto haploīdu līnijas. Plūsmas citometrija parādīja, ka visi analizējamie genotipi bija miksoploīdi.

Atslēgvārdi: Kvieši, starpsugu hibrīdi, putekšņmaciņu kultūra, dubultotie haploīdi, ģenētiskā daudzveidība, plūsmas citometrija

SUMMARY

Establishment of Gametic Cells *in vitro* Cultures of Spring Wheat Hybrids (*Triticum durum* x *Triticum aestivum*) and Obtaining and Analysis of Doubled Haploids.

The demand for wheat does not decrease, so breeders continue to work on the creation of high quality varieties. Classical methods of selection take more than 12 years to create a new variety. So it is important to improve methods that speed up this process. The most efficient method is to obtain doubled haploids using an anther culture. The aim of this work was to receive green plants-regenerants to obtain double haploids from the interspecific hybrids (*Triticum durum* x *Triticum aestivum*) using an anther culture and to study its genetic diversity. In the course of the work, 16 green plants-regenerants were obtained. The iPBS PCR method had shown that using an anther culture, it is possible to obtain genetically stable doubled haploid lines. Using the flow cytometry, mixoploidy was confirmed in all analyzed genotypes.

Key words: Wheat, interspecific hybrids, anther culture, doubled haploids, genetic diversity, flow cytometry

SATURS

IEVADS	5
1. LITERATŪRAS APSKATS.....	6
1.1. Kviešu izcelsme un klasifikācija.....	6
1.2. Mīksto kviešu apraksts.....	8
1.3. Cieto (durum) kviešu apraksts	8
1.4. Kviešu selekcija Latvijā.....	9
1.5. Mīksto un cieto (durum) kviešu hibrīdi	9
1.6. Kviešu <i>in vitro</i> metodes	10
1.7. <i>In vitro</i> iegūto kviešu ģenētiskā izpēte	12
1.8. Plūsmas citometrija.....	13
2. METODIKA.....	15
2.1. Donoraugu audzēšana	15
2.2. Barotņu pagatavošana	15
2.3. Materiāla ievākšana un vārpu sterilizēšana.....	16
2.4. Laminārā boksa sagatavošana.....	16
2.5. Putekšņmaciņu izņemšana un stādīšana	16
2.6. Embriju pārstādīšana uz reģenerācijas barotni	17
2.7. Zaļo augu pārstādīšana tālākai kultivācijai	18
2.8. Papildus hibrīdaugu audzēšana	19
2.9. Hromosomu skaitīšana kviešu saknītēs	20
2.10. Ploiditātes noteikšana ar plūsmas citometriju	21
2.11. DNS ekstrakcija no augu lapām.....	21
2.12. Polimerāzes ķēdes reakcija (PCR) ar iPBS praimeriem.....	23
2.13. DNS un PCR produktu analīze ar agarozes gēla elektroforēzi	24
3. REZULTĀTI UN TO ANALĪZE	25
4. DISKUSIJA.....	33
5. SECINĀJUMI.....	36
PATEICĪBAS	37
LITERATŪRAS SARAKSTS	38

IEVADS

Kvieši jau no seniem laikiem ir viena no nozīmīgākajām graudaugu kultūrām pasaulē. Kvieši ir ļoti plaši audzēti graudaugi un aizņem otro vietu pasaules graudaugu tirgū, jo tiem piemīt ekoloģiskais plastiskums attiecībā pret augšanas vides apstākļiem un augsta uzturvērtība (Дубровная 2017). Mūsdienās joprojām ir ļoti liels pieprasījums pēc kviešiem, tāpēc selekcionāri visā pasaulē cenšas izveidot vēl vairāk jaunu kviešu šķirņu, lai uzlabotu to kvalitāti, ražību, izturību un bioloģisko stabilitāti. Pielietojot starpsugu hibridizāciju, ir iespējams iegūt ģenētiski bagātinātu hibrīdu populāciju ar jaunām pazīmēm (Wang et al. 2005). Agroresursu un Agroekonomikas institūta Stendes nodaļās arī veic kviešu jaunu šķirņu izveidi. Taču selekcijas klasiskās metodes, tādas kā genotipu atlase, hibridizācija un izlase, prasa vairāk nekā 12 gadus, lai izveidotu jaunu kviešu šķirni. Tāpēc ir ļoti aktuāli pilnveidot selekcijas metodes, kuras paātrina šo procesu.

Viena no visplašāk izmantotajām metodēm, kura ievērojami paātrina kviešu selekcijas procesu, ir dubultoto haploīdu (DH) iegūšana. Hromosomu dubultošana haploīdiem augiem un DH iegūšana krietni samazina pilnīgi homozigotu līniju iegūšanas laiku. Tādā veidā ir iespējams iegūt pilnīgi jaunas homozigotas līnijas vienas paaudzes laikā, kas palielina selekcijas efektivitāti. Visefektīvākā un vienkāršākā metode kviešu DH iegūšanai ir putekšņmaciņu kultūra (Maheshwari et al. 1982 cit. pēc Logue 1996). Piemēram, Latvijā iegūtā jaunā vasaras kviešu šķirne 'Robijs' tika izveidota no DH līnijas septiņu gadu laikā, izmantojot putekšņmaciņu kultūru (Grauda et al. 2009 cit. pēc Grauda et al. 2016). Putekšņmaciņu kultūra ir ļoti nozīmīga daudzu kultivējamo augu sugu haploīdu un DH iegūšanai, un šīs metodes pilnveidošana ir ļoti perspektīva.

Darba mērķis: pārbaudīt kviešu putekšņmaciņu kultūras metodi zaļo augu-reģenerantu dubultoto haploīdu iegūšanai no starpsugu hibrīdiem (*Triticum durum* x *Triticum aestivum*) un izpētīt to ģenētisko daudzveidību.

Darba uzdevumi:

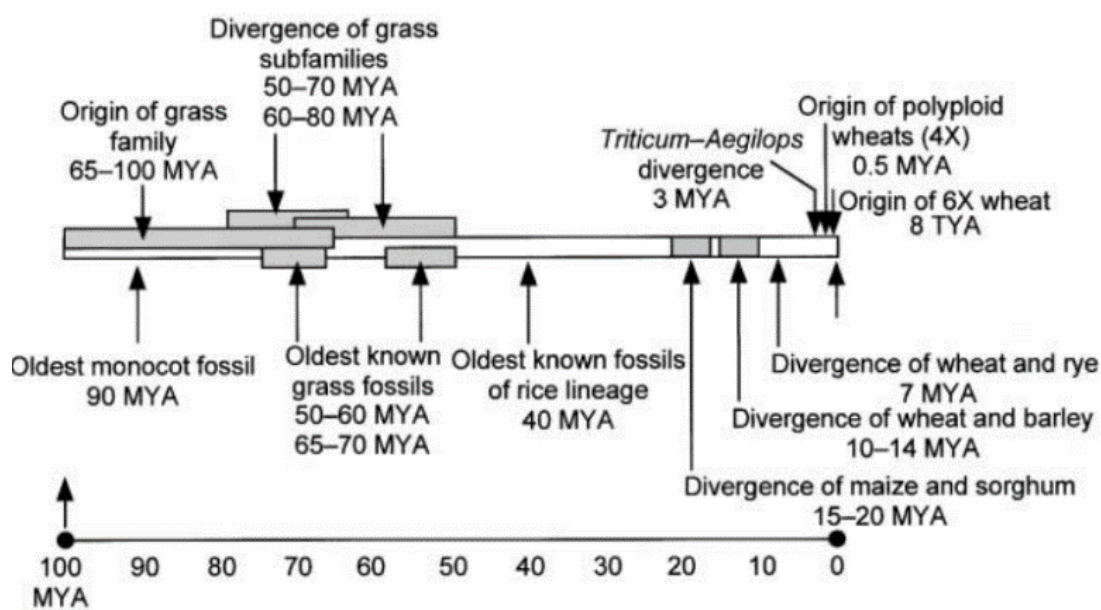
1. Izmantojot putekšņmaciņu kultūru *in vitro* metodi, iegūt zaļus augus-reģenerantus no vasaras kviešu starpsugu *Triticum durum* x *Triticum aestivum* un iekšsugu *Triticum durum* x *Triticum durum* hibrīdiem.
2. Veikt vasaras kviešu hibrīdu un iegūto dubultoto haploīdu ģenētisko analīzi ploīditātes noteikšanai, izmantojot plūsmas citometriju.
3. Veikt vasaras kviešu hibrīdu un iegūto dubultoto haploīdu ģenētiskās daudzveidības analīzi, izmantojot uz retrotranspozoniem balstīto iPBS metodi.

1. LITERATŪRAS APSKATS

1.1. Kviešu izcelsme un klasifikācija

Jau no seniem laikiem graudaugi ir viens no nozīmīgākajiem uzturvielu avotiem gan cilvēkam, gan mājdzīvniekiem. Tiek uzskatīts, ka pirmie graudaugi parādījās pirms 65-100 miljoniem gadu. Mūsdienu kviešu sugas parādījās jau vēlāk, piemēram, pirmie tetraploīdie kvieši parādījās pirms 500 tūkstošiem gadu, savukārt heksaploīdi kvieši, piemēram, mīkstie kvieši *Triticum aestivum*, ir veidojušies apmēram pirms 8000 gadu (1. attēls). Par kviešu izcelsmes vietu tiek uzskatīta Dienvidrietumāzija, mūsdienu Turcijas, Irākas un Sīrijas teritorijas. Mūsdienās kvieši ir ļoti plaši audzēti graudaugi un pēc rīsiem aizņem otro vietu pasaules graudaugu tirgū. Kartupeļi, soja un kukurūza pasaules lauksaimniecības kultūru tirgū ierindojas aiz kviešiem. Iemesls tam ir kviešu ekoloģiskais plastiskums attiecībā pret augšanas vides apstākļiem un kviešu augstā uzturvērtība (apmēram 79% ogļhidrāti, >10% proteīni, 2,4% tauki) (Дубровная 2017).

Triticum ģintī ir apmēram 25 sugas. Kviešiem ir ļoti komplicēts un garš genoms (16 000 Mb), salīdzinājumā ar citām lauksaimniecības kultūrām, piemēram, ar kukurūzu (2500 Mb) vai rīsiem (420 Mb) (Gill et al. 2004). Sākumā pirmās kviešu sugas bija diploīdas, piemēram, *Triticum boeoticum* un *Triticum monococcum*, bet vēlāk dabiskās hibridizācijas ceļā un domestikācijas procesā parādījās poliploīdi (Гончаров и Кондратенко 2008).



1.attēls. Domesticēto graudaugu ģinšu diverģences shēma (Gill et al. 2004).

Figure 1. Domesticated cereal genera divergence scheme (Gill et al. 2004).

Vēsturiski kviešu poliploīdi izveidojās dabiskās hibridizācijas procesā starp *Triticum* un *Aegilops* ģintīm, jo *Aegilops* ģints ir kviešiem tuvākā radniecīgā graudzāļu dzimtas ģints. Tiek uzskatīts (Gill et al. 2004), ka diverģence starp *Triticum* un *Aegilops* ģintīm ir notikusi pirms trim miljoniem gadu (1. attēls). Pateicoties poliploīdijai, kviešiem piemīt ļoti liela ģenētiskā daudzveidība vienas ģints ietvaros un lielisks mainības potenciāls.

Poliploīdija ir hromosomu evolūcijas process, kas ir bieži sastopams augstāko augu genomos, tostarp kviešos. Poliploīdiem organismiem ir palielināts homologu hromosomu skaits hromosomu komplektos. Poliploidizācija var atvieglot gēnu plejotropiju – viena gēna spēju veikt dažādas funkcijas un kontrolēt vairākas organisma pazīmes. Tāpat, organismiem ar gēnu duplikāciju bieži parādās jaunas funkcijas. Poliploidizācijas process var arī stimulēt turpmākas strukturālas genoma izmaiņas, nodrošinot poliploīdu līniju genoma variācijas (Otto 2007). Poliploīdija un hromosomu pārkārtošanās tiek uzskatītas par galvenajiem hromosomu evolūcijas faktoriem (Li et al. 2017). Pēc ploīditātes līmeņa kvieši tiek iedalīti trīs grupās: diploīdi (AA), tetraploīdi (AABB) un heksaploīdi (AABBDD) (I.K.Vasil and V.Vasil 1999). Tomēr bieži ir sastopami arī kvieši ar miksoploīdu hromosomu komplektu. Miksoploīdajos organismos var novērot šūnas ar atšķirīgu hromosomu skaitu. Miksoploīdija var rasties dažādu iemeslu dēļ, piemēram, šūnu dalīšanās laikā vai hromosomu eliminācijas procesā. Šūnas ar dažādu ploīditātes līmeni var būt lokalizētas dažādos organisma audos un orgānos. Miksoploīdijai ir gan negatīvas, gan pozitīvas sekas. Var rasties izmaiņas auga morfoloģijā, gēnu ekspresijā, kā rezultātā auglība var palielināties vai samazināties. Taču dažos gadījumos miksoploīdija var būt arī izdevīga, jo tā var izraisīt jaunu iezīmju rašanos un palielināt ģenētisko daudzveidību, kas ir svarīgi selekcijā. Visbiežāk miksoploīdija piemīt hibrīdiem organismiem (Кунах 1980).

Katru kviešu ploīditātes grupu cilvēki izmanto dažādiem nolūkiem pārtikas ražošanā vai lopbarībā. Piemēram, no diploīdiem un heksaploīdiem kviešiem galvenokārt iegūst miltus un cep maizi, bet no tetraploīdiem kviešiem izgatavo pilngraudu makaronus un mannas putraimus (Гончаров и Кондратенко 2008).

Pēc sējas laika kviešus var iedalīt vasaras un ziemas kviešos. Ziemas kviešiem, lai tie varētu uzziedēt, ir nepieciešama jerovizācija - ziemošanas periods. Tāda fizioloģiska īpašība neļauj ziemas kviešiem attīstīt ziedpumpurus pārāk agri, līdz ar to tie neiet bojā aukstā laikā. Savukārt vasaras kviešiem nav nepieciešams pārdzīvot aukstuma periodu, tāpēc vasaras kviešus audzē galvenokārt zonās ar kontinentālāku klimatu, kur vasaras periodā ir augstāka gaisa temperatūra un kopumā ir vairāk saulaino stundu dienā. Ziemas kviešus parasti sēj septembrī un novāc nākamā gada augustā, savukārt vasaras kviešus sēj pavasarī un novāc rudenī (Flood and Halloran 1986).

1.2. Mīksto kviešu apraksts

Mīkstie jeb parastie, jeb maizes kvieši (*Triticum aestivum*) ir vasaras kvieši, ko audzē galvenokārt maizes miltu iegūšanai (tiek izmantoti maizes, cepumu un kūku izgatavošanai). Mīkstajiem kviešiem ir gaišs kodols, milti ir balti. Olbaltumvielu saturs ir samērā neliels - ap 9-12%, tāpēc no mīkstajiem kviešiem izgatavotie produkti netiek uzkatīti par veselīga uztura ēdieniem. Tiem ir mīksta endospermas struktūra, tāpēc malšanas procesā cietes graudi sadrūp.

Mīkstie kvieši ir ekonomiski izdevīga suga, un pēc sējumu platībām tā aizņem pirmo vietu pasaulē. Augšanai tiem ir nepieciešams vēss klimats ar vidēju lietus daudzumu. Mīkstos kviešus audzē galvenokārt Eiropā, Ziemeļamerikā, Ķīnā, Indijā un Austrālijā (I.K.Vasil and V.Vasil 1999). Tiem izšķir vasaras formu, ziemas formu un atšķirībā no cietajiem kviešiem arī starpformu (pusziemāji). Atkarībā no ārējiem apstākļiem, veģetācijas periods mīkstajiem kviešiem ilgst no 120 līdz 180 dienām. Tā kā mīkstie kvieši ir vasaras kvieši, tiem nav nepieciešams ziemošanas periods, lai sāktos ziedēšana. Taču ziedēšanai tiem ir nepieciešama 7°C - 18°C temperatūra aptuveni 15 dienu laikā (Anonīms 2022). Mīkstos kviešus plaši audzē arī Latvijā.

Mīkstie kvieši ir heksaploīdi (2n=42). Uzskata, ka mīkstie kvieši parādījās *Triticum dicoccum* (genoms BBAA) un *Aegilops squarrosa* (genoms DD) dabiskās hibridizācijas procesā. Mīksto kviešu genoms ir BBA^uA^uDD (haploīds genoms ir BA^uD) (Гончаров и Кондратенко 2008).

1.3. Cieto (durum) kviešu apraksts

Cietie jeb durum kvieši (*Triticum durum*) pēc kvalitatīvajām pazīmēm ir augstākās kvalitātes vasaras kvieši, kas pēc sējumu platībām aizņem otro vietu pēc mīkstajiem kviešiem. Durum kvieši aizņem 5–10% no kopējās kviešu sējplatības (Zadiņš 2017). Cietos vasaras kviešus audzē galvenokārt dienvidu reģionos - Dienvideiropā, Ziemeļāfrikā un Dienvidrietumāzijā. Tiem izšķir vasaras un ziemas formu. Tāpat kā mīkstajiem kviešiem, durum kviešiem nav nepieciešams ziemošanas periods, lai sāktos ziedēšana. Latvijas klimats nav īpaši piemērots durum kviešu audzēšanai, jo tiem ir nepieciešams siltāks un sausāks klimats, tāpēc Latvijā tos plaši neaudzē.

Durum kviešiem ir viscietākā endospermas struktūra starp kviešu sugām, tāpēc tos izmanto pilngraudu makaronu, kuskusu, bulgura un maizes izgatavošanai (Liu 1996). Pēc Latvijas Lauksaimniecības Universitātes 2017. gada pētījumu datiem, tiem ir ļoti augsts olbaltumvielu (ap 11-15%) un lipekļa saturs. Turklāt durum kvieši ir labs klīju eļļas, karotinoīdu un E vitamīna avots (Durante et al. 2012). Pieprasījums pēc durum kviešiem pasaules tirgū palielinās, pateicoties šīs kultūras īpašībam.

Durum kvieši ir tetraploīdi ($2n=28$). Tiek uzskatīts, ka durum kvieši ir cēlušies no tetraploīda *Triticum dicoccum* pirms 10,000 - 12,000 gadu (Sall 2019). Durum kviešu genoms ir BBA^uA^u (haploīds genoms ir BA^u) (Гончаров и Кондратенко 2008).

1.4. Kviešu selekcija Latvijā

Kviešus plaši audzē arī Latvijas teritorijā. Pēc 2020. gada datiem, kviešu sējumu platības Latvijā katru gadu aizņem apmēram 450-500 ha. Pēc dažu publikāciju datiem laikā posmā no 2015. gada līdz 2020. gadam vidējais kviešu ražas apjoms bija apmēram 3,4 t/ha (Švarta u.c. 2020). Visvairāk Latvijā audzē vasaras kviešus. Divdesmit pirmā gadsimta sākumā vasaras kvieši katru gadu aizņēma apmēram 50 000 ha platību, kas veidoja aptuveni 25% no kopējas kviešu sējplatības (Strazdiņa 2012). Pašlaik kviešu kopējās sējplatības Latvijā ir palielinājušās gandrīz līdz 100 000 ha gadā.

Ar augu selekciju Latvijā sāka nodarboties 20. gadsimta sākumā. Priekuļu selekcijas stacija tika nodibināta 1913. gadā, un 1922. gada tika nodibināta Valsts Stendes selekcijas un izmēģinājumu stacija. Selekcijas stacijās veic galvenokārt agrotehnikas pētījumus, nodarbojas ar augu pavairošanu un jaunu šķirņu veidošanu. Mūsdienās ir arī citas zinātniskās iestādes, kuras veic selekcijas darbus Latvijā, taču tikai Priekuļu selekcijas stacijā un Valsts Stendes selekcijas un izmēģinājumu stacijā vēl joprojām nodarbojas ar kviešu selekciju.

Latvijā selekcionēto kviešu šķirņu ir daudz, tomēr vienas šķirnes izveidošana un audzēšana aizņem vairāk nekā 10-12 gadus. Pārtikas ražotāju prasības pēc graudu kvalitatīvajām īpašībām mainās, tādēļ nepieciešams veidot arvien vairāk jaunu šķirņu. Pēc Valsts augu aizsardzības dienesta reģistriem, Agroresursu un ekonomikas institūtā (Stendes pētniecības centrā) tika selekcionētas sešas dažādas mīksto ziemas kviešu šķirnes: 'Brencis', 'Brigens', 'Edvins', 'Fredis', 'Reinis', un 'Talsis'. Taču jaunas mīksto kviešu vasaras šķirnes ir tikai divas: 'Robijs' un 'Uffo'. Visas pārējās kviešu šķirnes, kas ir ierakstītas Latvijas augu šķirņu katalogā, tika selekcionētas citās valstīs, piemēram, Vācijā, Polijā, Šveicē, Francijā un Zviedrijā (Valsts augu aizsardzības dienesta reģistrs).

1.5. Mīksto un cieto (durum) kviešu hibrīdi

Augu hibrizācijas vēsture sākās jau 17. gadsimtā, kad vācu botaniķis Rudolfs Jakobs Kamerariuss (angl. Rudolf Jacob Camerarius) 1694. gadā pieņēma, ka vienas sugas sievišķo augu ir iespējams apaugļot ar citas sugas vīrišķā auga ziedputekšņiem. Joprojām augu hibrizācijas pētījumi ir ļoti aktuāli, īpaši lauksaimniecības mērķiem (Rieseberg and Carney 1998).

Kviešu selekcijas uzdevums - izveidot jaunas, konkurētspējīgas kviešu šķirnes, izturīgas pret slimībām un nelabvēlīgiem vides apstākļiem. Izveidot jaunas kviešu šķirnes iespējams ar iekšsugu un starpsugu hibridizāciju (krustošanu). Starpsugu hibridizācijas rezultātā parasti tiek iegūta ģenētiski bagātināta hibrīdu populācija ar jaunām pazīmēm. Viens no starpsugu hibridizācijas uzdevumiem ir dzīvotspējīgu un ražīgu pirmas paaudzes hibrīdu iegūšana. Veiksmīgai starpsugu hibridizācijai bieži var traucēt dažādi ģenētiskie vai vides faktori: dažādu sugu augu putekšņu un drīksnu nesaderība, embriju nāve kādā no attīstības stadijām, nepiemērotie vides vai kultivēšanas apstākļi. Pēc literatūras datiem, ar starpsugu hibridizācijas palīdzību grūti iegūt veselīgus un auglīgus mīksto un cieto kviešu hibrīdus (Бабаева 2017).

Mīksto kviešu izcelsme arī ir saistīta ar starpsugu hibridizāciju un hromosomu dubultošanu, kas arī nedaudz apgrūtina hibridizācijas procesu. Taču pateicoties tam, ka mīkstajiem kviešiem un durum kviešiem ir homologās hromosomas, durum kviešus var veiksmīgi izmantot hibrīdu augu iegūšanai. Mīksto kviešu starpsugu krustošana ar durum kviešiem nodrošina lielāku izturību, stabilitāti mainīgos vides apstākļos, auglību un augstu kvalitāti hibrīdiem (Wang et al. 2005). Hibrīdus vecākus var arī izmantot dubultoto haploīdu (DH) iegūšanai un jaunu rekombinantu līniju veidošanai.

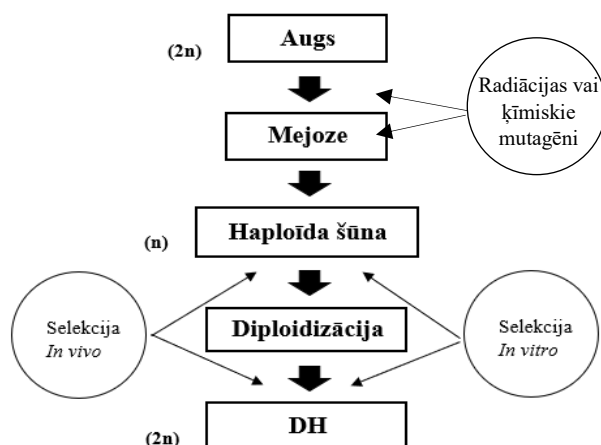
1.6. Kviešu *in vitro* metodes

In vitro no latīņu valodas nozīme 'stiklā' jeb 'mēģenē'. Šo terminu lieto, kad pētījumu vai eksperimentu veic ārpus dzīva organisma - barotnē vai citā mākslīgā vidē, parasti kontrolētos apstākļos. *In vitro* metodes plaši izmanto bioloģijā, medicīnā un lauksaimniecībā.

Daudziem graudaugiem, tajā skaitā kviešiem, piemīt androģenēze - spēja veidot embrijus no nenobriedušiem putekšņiem jeb mikrosporām. Androģenēze jeb vīrišķā partenogēnēze ir tāds fizioloģisks process, kad veidojas organisms, kurā ir tikai tēva hromosomu komplekts. Tādu augu sauc par haploīdu. Haploīdu iegūšana ļauj pēc tam veidot dubultos haploīdus (DH) (Першина и др. 2013).

Hromosomu dubultošana haploīdiem augiem un DH iegūšana (2.attēls) krietni (pat līdz 6 gadiem) samazina pilnīgi homozigotu līniju iegūšanas laiku. Homozigotos organismos recesīvie gēni izpaužas tāpat kā dominantie gēni. Tādā veidā ir iespējams iegūt pilnīgi jaunas homozigotas līnijas vienas paaudzes laikā, kas palielina selekcijas efektivitāti. Izmantojot DH metodes, jauno šķirņu izveidošanai nepieciešamais laiks samazinās par 3-5 gadiem, dažos gadījumos pat vairāk (Grauda 2016). Pilnīgi homozigoto līniju iegūšana ļauj arī piefiksēt vienā genotipā abu vecāku gēnus un attiecīgas pazīmes. DH iegūšanai var izmantot divas metodes. Pirmā – putekšņmaciņu jeb mikrosporu kultūra, un otrā – hromosomu eliminācija. Hromosomu eliminācija ir atsevišķu hromosomu zudums meitas hibrīdšūnā, kā rezultātā veidojas haploīds.

Efektīvāka un vienkāršāka metode DH iegūšanai graudaugiem ir putekšņmaciņu kultūra (Maheshwari et al. 1982 cit. pēc Logue 1996).



2.attēls. Dubultoto haploīdu (DH) iegūšanas shēma (Maluszynski et al. 1996).

Figure 2. Scheme of doubled haploid (DH) production (Maluszynski et al. 1996).

Putekšņmaciņu kultūra tiek izmantota kultivējamo augu sugu haploīdu un dubultoto haploīdu iegūšanai, tai skaitā kviešiem (El-Hennawy et al. 2011). Pirmais raksts par putekšņmaciņu kultūras izmantošanu haploīdu iegūšanai tika publicēts 1964. gadā (Guha and Maheshwari 1964). Pirmo reizi putekšņmaciņu kultūra tika izmantota *Datura innoxia* haploīdu iegūšanai. Vēlāk parādījās arvien vairāk publikāciju par putekšņmaciņu metodes pielietojumu dažādu augu selekcijā. Šo metodi vairākkārt modificēja, taču mūsdienās joprojām izmanto šīs metodes pamatu. Putekšņmaciņu kultūrai ir vēl dažas priekšrocības, piemēram, šajā metodē nav nepieciešama putekšņmaciņu pirmapstrāde pirms kultivēšanas, kā arī tiek izmantota reproducējama sintētiska barotne (Barnabas 2003). Sākotnēji šī metode ietvēra slēgto augu ziedpumpuru izmantošanu, kuru putekšņmaciņi satur vienkodola mikrosporas. Pumpurus sterilizēja un izņēma no tiem putekšņmaciņus. Veselus putekšņmaciņus iesēja agarizētā vai šķidrā barotnē un kultivēja 24-27°C temperatūrā apmēram 3-8 nedēļas. Inkubācijas periodā no putekšņmaciņiem sāka veidoties embriji, kurus pārstādīja uz reģenerācijas barotnes (Sopory and Munshi 1996). Kultivēšanas apstākļi un barotnes sastāvs vienmēr ir atkarīgs no augu sugas. Šajā darbā tika izmantota līdzīga metode, kas ir piemērota vasaras kviešiem.

In vitro androģenēzi kviešiem iedala trīs stadijās: embriju veidošana, embriju indukcija un augu attīstība. Augu attīstības stadijā var veidoties gan zaļie augi, gan albīnie augi. Albīno augu organismos nesintezējas hlorofils, tāpēc tādi augi nav spējīgi fotosintezēt un vairs nav dzīvotspējīgi. Putekšņmaciņu kultūrās albīnie augi veidojas daudz biežāk, nekā zaļie augi (Zheng 2003). Albīnisma parādība *in vitro* graudaugiem nav pilnībā izpētīta, taču ir zināma vara savienojumu pozitīva ietekme uz zaļo augu veidošanos (Jacquard et al. 2009).

Androģenēzes procesu bieži ietekmē donoraugu kultivēšanas apstākļi, tāpēc vislabāk donoraugus audzēt siltumnīcā, kur ir iespējams kontrolēt visus kultivēšanas apstākļus, tādus kā barības vielu pieejamība, temperatūra, gaismas režīms, gaismas intensitāte un spektrs. Liela nozīme arī ir donorauga attīstības stadijai, kad ir nepieciešams ievākt putekšņmaciņus. Vislabāk ievākt putekšņmaciņus, kad putekšņi jeb mikrosporas ir vidējā vai vēlā vienkodola stadijā. Šajā stadijā putekšņi ir vispiemērotākie androģenēzes ierosināšanai. Androģenēzi ietekmē arī putekšņmaciņu apstrādes metodes, jo kontrolēta stresa apstākļos ir iespējams paaugstināt androģenēzes efektivitāti. Stresa apstākļus var radīt, izmantojot īso dienu gaismas režīmu, temperatūras pazemināšanu vai paaugstināšanu, slāpekļa trūkumu donoraugiem, cukuru trūkumu, ķīmisko putekšņmaciņu vai putekšņu apstrādi (Zheng 2003). Piemēram, līdz 1-5°C pazemināta temperatūra pozitīvi ietekmē kviešu putekšņmaciņu kultūras izveidošanu. Taču galvenais faktors ir genotipa ietekme uz putekšņmaciņu spēju veidot embrijus optimālos kultivēšanas apstākļos (Першина и др. 2013).

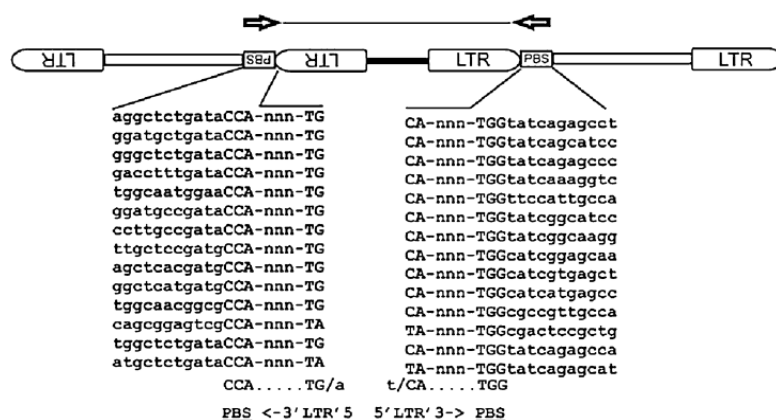
1.7. *In vitro* iegūto kviešu ģenētiskā izpēte

Kā bija minēts iepriekš, kviešiem ir ļoti komplicēts genoms. Kviešu ģenētiskā izpēte ir īpaši svarīga, ja augi tiek iegūti *in vitro* no audu kultūrām, piemēram, pumpuriem, dzinumiem, lapām, saknēm vai putekšņmaciņiem. *In vitro* kultūru nestabilitāte bieži var izraisīt iegūtajās kultūrās dažādas ģenētiskas un epiģenētiskas izmaiņas, kuras sauc par somaklonālo mainību. Somaklonālās mainības izpausmē iegūtie augi-reģeneranti jeb somakloni, kas ģenētiski ir identiski donoraugiem, fenotipiski atšķiras no tiem (Ferreira et al. 2023). Pirmo reizi jēdziens ‘somaklonālā mainība’ tika izmantots 1981. gadā, kā arī tajā laikā tika paziņots, ka somaklonālo mainību var izmantot selekcijā, lai veidotu jaunas šķirnes ar vēlamajām īpašībām (Larkin and Scowcroft 1981 cit. pēc Jain et al. 1998). Somaklonālās mainības rezultātā var izveidoties ģenētiski stabili genotipi, it īpaši ja papildus tiek izmantota inducētā mutāģenēze. Gan inducētā, gan nejaušā mutāģenēze var fenotipiski izpausties un palielināt graudaugu ģenētisko daudzveidību.

Somaklonālās mainības mehānismi ir dažādi. Tie var būt ķīmiski izraisītas punktveida mutācijas, transpozonu, retrotranspozonu un citu mobilo elementu aktivācija, DNS metilēšana, izmaiņas plastīdu vai mitohondriju DNS, hromosomu skaita (piemēram, aneiploīdija, allopoliploīdija vai miksploīdija) vai struktūras izmaiņas, gēnu ekspresijas izmaiņas. Somaklonālo mainību bieži ietekmē augs genotips, audu kultūras veids, barotnes sastāvs, donoraugu vecums un kultivēšanas ilgums (Jain et al. 1998).

Allopoliploīdija, kas ir bieži sastopams poliploīdijas veids starpsugu hibrīdiem augiem, ir ļoti cieši saistīta ar mobilo elementu, it īpaši retrotranspozonu, aktivāciju (Kraitshtein et al.

2010). LTR (Long Terminal Repeat) retrotranspozoni ir visizplatītākie mobilie elementi augu un citu eikariotu genomos, tāpēc tos plaši izmanto kā molekulāros marķierus. Retrotranspozoni hromosomu sekvencēs bieži pārklājas, invertējas, saīsinās un atrodas blakus viens otram, kas ļauj efektīvi izmantot LTR retrotranspozonu sekvences PCR amplifikācijā ģenētiskā polimorfisma noteikšanai (Kalendar et al. 2017). Noteikt, vai iegūtie kviešu augi-reģeneranti jeb somakloni ir ģenētiski vienādi vai atšķirīgi, ir iespējams, izmantojot iPBS (inter-Primer Binding Site) metodi. Šī metode ir balstīta uz praimeru izmantošanu, kas specifiski tRNS saistīšanās vietām LTR retrotranspozonu sekvencēs. Šie specifiskie praimeru parasti ir LTR retrotranspozonu sekvencu fragmenti. Izmantojot iPBS PCR metodi tiek amplificēti sekvences fragmenti starp diviem pretēji vēršiem LTR retrotranspozoniem (3.attēls).



3.attēls. iPBS darbības shēma (Kalendar et al. 2010).

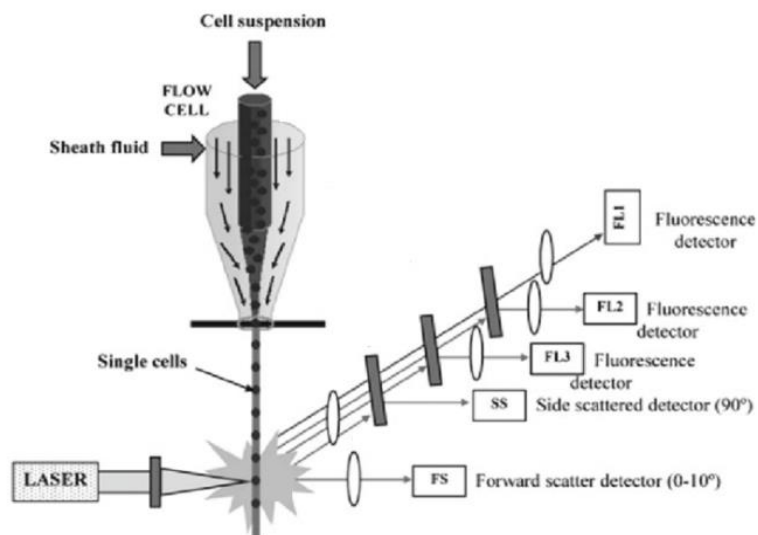
Figure 3. The iPBS action scheme (Kalendar et al. 2010).

Analizējot iPBS (Kalendar et al. 2010) PCR produktus ar agarozes gēla elektroforēzes palīdzību, ir iespējams noteikt, vai darbā izmantotie kviešu hibrīdi un iegūtie augi-reģeneranti jeb DH līnijas ir ģenētiski līdzīgi vai tiem piemīt ģenētiskais polimorfisms.

1.8. Plūsmas citometrija

Plūsmas citometrija ir metode, kas nodrošina ātru atsevišķu šūnu vai citu daļiņu daudzparametrisko analīzi speciālā sāls buferšķīdumā. Šo metodi plaši izmanto molekulārajā bioloģijā, imunoloģijā, bakterioloģijā, virusoloģijā, vēža bioloģijā un infekcijas slimību uzraudzībā. Plūsmas citometrijas pamatā ir fluorescējošu signālu uztvere, tāpēc šajā metodē tiek izmantoti dažādi fluorescējoši reaģenti. Tie var būt fluorescējošas konjugētas antivielas (piemēram, CD3FITC), DNS saistošas krāsvielas (piemēram, propīdija jodīds), jonu indikatorkrāsvielas un fluorescējošas ekspresijas olbaltumvielas. Kā gaismas avotus plūsmas citometros izmanto lāzerus, lai iegūtu fluorescējošas gaismas signālus, ko nolasa īpaši detektori, piemēram, fotodiodes vai fotopavairotāja lampas. Šie gaismas signāli tiek pārveidoti

elektroniskajos signālos, kurus analizē datorprogramma. Plūsmas citometrijā tiek analizēta katras šūnas vai daļiņas radītā redzamās gaismas izkliede. Redzamās gaismas izkliede tiek mērīta divos virzienos: virzienā tieši uz priekšu (Forward Scatter jeb FSC), kas ļauj noteikt šūnas relatīvo izmēru, un 90° virzienā no sāniem (Side Scatter jeb SSC) (4.attēls), kas ļauj izpētīt šūnas virsmu, formu vai granularitāti. Plūsmas citometrija ļauj sadalīt šūnas noteiktās grupās, pamatojoties uz to fluorescējošām īpašībām (McKinnon 2018).



4.attēls. Plūsmas citometra shēma (Diaz et al. 2010).

Figure 4. Scheme of flow cytometer (Diaz et al. 2010).

Plūsmas citometrijas attīstība sākās ar nepieciešamību analizēt un klasificēt šūnas pēc to lieluma, sastāva un fenotipiskiem parametriem. Šūnu izpētes pirmssākumus var tieši saistīt ar Antonija van Lēvenhuka un Roberta Huka darbiem 17. gadsimta beigās. Mikroskopijas un šūnu krāsošanas metožu uzlabojumi, kuri tika veikti 19. gadsimta vidū, deva lielāku izpratni par to, kas ir šūnas un kādas tām ir funkcijas. Taču tikai 20. gadsimta vidū kļuva iespējams veikt diezgan precīzu šūnu kvantitatīvo analīzi, izmantojot paraugu plūsmas sistēmas. Līdz 1960. gadu beigām vairāki pētnieki veica šūnu izpēti, izmantojot fluorescenci, lai uzlabotu gan kvantitatīvo, gan kvalitatīvo citometrisko analīzi. Plūsmas citometriju ļoti plaši izmanto vissarežģītāko analītisko uzdevumu risināšanai (Shapiro 2010).

Plūsmas citometriju var izmantot, lai noteiktu kviešu ploīditāti. Lai noteiktu ploīditāti ir nepieciešami DNS paraugi no kviešu somatiskajiem audiem, visbiežāk no auga lapām. Metode iekļauj lapas paraugu krāsošanu ar DNS saistošo krāsvielu - propīdija jodīda šķīdumu. Jo stiprāks ir fluorescējošās gaismas signāls no šūnas kodoliņa, ko uztver plūsmas citometra fluorescences detektors, jo lielākas ir DNS molekulas paraugā. Pēc DNS molekulas izmēra ir iespējams noteikt auga ploīditāti, izmantojot kā kontroli paraugus ar apstiprināto ploīditātes līmeni (Bohanec 2003).

2. METODIKA

2.1. Donoraugu audzēšana

Sējmateriāls tika saņemts no Latvijas Biozinātņu un tehnoloģiju universitātes Agroresursu un ekonomikas institūta. *In vitro* kultūru iegūšanai izmantoja iepriekš aprakstīto metodi (Grauda et al. 2016). Darbā kā donoraugi putekšņmaciņu kultūras izveidošanai tika izmantoti 12 vasaras kviešu dažādu šķirņu hibrīdi (1.tabula). Donoraugi tika iesēti podos (1l) ar augsni, kuras sastāvā bija melnzeme un kūdra attiecībā 2 : 1. Donoraugi tika audzēti siltumnīcā ar 16 stundu fotoperiodu.

1.tabula.

Putekšņmaciņu kultūras iegūšanai izmantotie vasaras kviešu hibrīdi

Table 1.

Spring wheat hybrids used for an anther culture

№	Genotipa nr. / Genotype no.	Izcelsme / Origin
1.	21KD-4	Malvadur / Fabulis (<i>T.durum/T.durum</i>)
2.	21KD-11	DC 753-8/12 / Bezenčukskaja (<i>T.aestivum/T.durum</i>)
3.	21KD-13	SMH 87 / KV 4K 18 (<i>T.durum/ T.aestivum</i>)
4.	21KD-14	Granny / SMH 87 (<i>T.aestivum/T.durum</i>)
5.	21KD-16	Fabulis / SMH 87 (<i>T.durum/T.durum</i>)
6.	21KD-22	Stanga / Fabulis (<i>T.aestivum/T.durum</i>)
7.	21KD-23	SMH 87 / Stanga (<i>T.durum/T.aestivum</i>)
8.	21KD-26	Meridiano / Fabulis (<i>T.durum/T.durum</i>)
9.	21KD-28	Miradur / Fabulis (<i>T.durum/T.durum</i>)
10.	21KD-31	Floradur / Тома (<i>T.durum/ T.aestivum</i>)
11.	21KD-32	Meridiano / Сабина (<i>T.durum/T.aestivum</i>)
12.	21KD-33	Diskett / Malvadur (<i>T.aestivum/T.durum</i>)

2.2. Barotņu pagatavošana

Darbā izmantoto barotņu sastāvdaļas ir aprakstītas 1. pielikumā. Reaģentus, kuru koncentrācija barotnē ir lielāka par 20 mg/l, nosvēra un pievienoja vārglāzē ar 100 ml destilētā ūdeni. Visi pārējie reaģenti, kuru koncentrācija barotnē ir zem 20 mg/l, tika pievienoti šķīduma veidā atšķaidījumā 1:1. Kad visi reaģenti tika pievienoti, šķīdumam pievienoja destilēto ūdeni, lai iegūtu 1l barotnes. Gatavai barotnei tika nolīdzsvarots pH līmenis līdz pH=5,8.

Pirms izmantošanas indukcijas barotni AMC+Cu filtrsterilizēja, izmantojot nitrocelulozes filtrus (ražotājs 'Sigma-Aldrich', Īrija). AMC+Cu barotnes sterilizēšanai neizmantoja autoklāvu, jo tajā esošie cukuri ir jūtīgi pret augstām temperatūrām. Reģenerācijas barotni 190-2 pirms izmantošanas sterilizēja autoklāvā.

2.3. Materiāla ievākšana un vārpu sterilizēšana

Vārpas tika ievāktas, kad putekšņi jeb mikrosporas bija vienkodola stadijā. Parasti šo stadiju nosaka, mikroskopējot putekšņus, taču ir zināms, ka šajā stadijā kviešiem jau ir redzama vārpas augšējā daļa, tāpēc iespējams novērtēt stadiju vizuāli.

Stieбри ar vārpām tika sagriezti un ievietoti 200 ml burciņā ar destilētu ūdeni. Stiebru daļa virs burciņas kakliņa tika nosepta ar plēvi, lai pasargātu vārpas no izzūšanas. Stiebrus ar vārpām uzglabāja vitrīnā (ražotājs 'Snaige design line', Lietuva) divas nedēļas +4°C grādu temperatūrā. Tādā veidā putekšņmaciņi tika pakļauti stresa apstākļiem, lai paaugstinātu androgēneses efektivitāti.

Pēc divām nedēļām vārpas tika atdalītas no stiebriem. Tika pagatavots 50% 'ACE classic' balinātāja šķīdums vārpu sterilizēšanai: 200 ml burciņā ielēja 100 ml 'ACE classic' balinātāja un 100 ml destilētā ūdeni. Šķīdumā tika pievienots nedaudz 'Tween 80', lai samazinātu šķīduma viskozitāti. Vārpas šķīdumā tika sterilizētas 20 minūtes. Pēc sterilizācijas vārpas tika skalotas četras reizes ar autoklavētu destilētu ūdeni.

2.4. Laminārā boksa sagatavošana

Pirms darba uzsākšanas laminārajā boksā tika ievietoti visi darbam nepieciešamie materiāli un piederumi: stikla pudele ar jonizēto, autoklavēto ūdeni, sterilizators *Steri 350* (ražotājs 'Inotech', Šveice), vairākas 10 cm pincetes, smidzinātājs ar 70% etilspirtu, vārglāze ar tilpumu 1l, automātiskā pipete, vienreizlietojamie 10 ml uzgaļi, vienreizlietojamās Petri plates ar diametru 5,5 cm un 10,5 cm, papīrdvielī, Parafilm plēve, šķēres un ūdensizturīgais marķieris. Ieslēdza sterilizatoru, lamināro boksu aizvēra, un ieslēdza ultravioleto gaismu uz vismaz 30 minūtēm. Pēc sterilizēšanas ultravioleto gaismu izslēdza, lamināro boksu atvēra un ieslēdza gaisa plūsmu.

2.5. Putekšņmaciņu izņemšana un stādīšana

Putekšņmaciņu izņemšana un stādīšana tika veikta sterilos apstākļos laminārajā boksā. Visā darba laikā rokas un piederumus kārtīgi un regulāri sterilizēja ar 70% etilspirtu. Ievietojot laminārajā boksā pudeli ar barotni, to no ārpuses sterilizēja ar 70% etilspirtu. Pirms putekšņmaciņu stādīšanas sagatavoja Petri plates ar AMC+Cu indukcijas barotni: katrā 5,5 cm Petri platē ar vienreizlietojamo 10 ml pipeti ielēja 8 ml AMC+Cu indukcijas barotnes. Pincetes tika sterilizētas *Steri 350* sterilizatorā 10-20 sekundes. Turot vārpu rokā, ar pinceti atdalīja vainaglapas. Putekšņmaciņus uzmanīgi paņēma tā, lai nesabojātu, un ievietoja barotnē. Putekšņmaciņi no vienas vārpas tika ievietoti vienā Petri platē. Katrā Petri platē tika ieliktas arī

trīs drīksnas, kuras pēc divām nedēļām pirmās vēdināšanas laikā tika izņemtas. Petri plati ar putekšņmaciņiem aizvēra ar vāciņu, kuru fiksēja ar Parafilmu (ražotājs ‘Sigma-Aldrich’, ASV). Gatavas Petri plates ar putekšņmaciņiem ievietoja termostatā (ražotājs ‘Одесский завод медицинского оборудования’, СССР) uz divām nedēļām, līdz pirmās vēdināšanas laikam. Kultivācija termostatā norisinājās +29°C temperatūrā, tumsā.

2.6. Embriju pārstādīšana uz reģenerācijas barotni

Pēc četrus nedēļu kultivācijas putekšņmaciņu kultūrā sāka veidoties embriji. Kad to diametrs pārsniedza vienu milimetru (5.attēls), tos pārstādīja uz reģenerācijas barotnes 190-2.

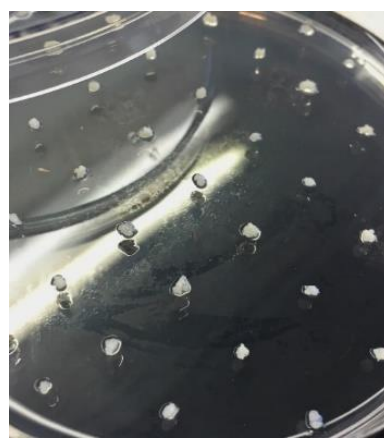
Embriju pārstādīšana uz reģenerācijas barotni tika veikta sterilos apstākļos laminārā boksā, pēc iepriekš aprakstītas darba gaitas. Pirms embriju pārstādīšanas uzkaršēja iepriekš sagatavoto reģenerācijas barotni 190-2. Pirms ievietošanas laminārā boksā Petri plates ar putekšņmaciņiem un uzkaršēto pudeli ar barotni sterilizēja ar 70% etilspirtu. Embriju pārstādīšanai tika izmantotas gan mazas 5,5 cm diametra Petri plates, gan lielas 10,5 cm diametra Petri plates. Petri plates izvēle bija atkarīga no vizuālā novērtējuma – cik liels embriju skaits izveidojās dotajā laikā. Katrā Petri platē ar automātisko pipeti ielēja šķidro barotni 190-2, mazajās Petri platēs 8 ml, lielajās Petri platēs 20 ml. Barotnei ļāva atdzist un sacietēt. Pirms embriju pārstādīšanas 10-20 sekundes sterilizēja pincetes sterilizatorā *Steri 350*.

Petri plati ar putekšņmaciņiem atvēra un pa vienam pārstādīja embrijus uz reģenerācijas barotni 190-2 tā, lai attālums starp embrijiem būtu 8-10 mm (6.attēls). Petri plates ar embrijiem aizvēra ar vāciņu, fiksēja vāciņu ar Parafilmu. Vispirms embriji 2-3 dienas tika kultivēti termostatā tumsā +29°C temperatūrā, pēc tam tos ievietoja gaismas termostatā (ražotājs ‘Binder’, Vācija) ar 16 stundu fotoperiodu.



5. attēls. Pēc četrus nedēļu kultivācijas izveidotie embriji.

Figure 5. Cultured embryos after four weeks.



6. attēls. Embriji uz reģenerācijas barotnes 190-2.

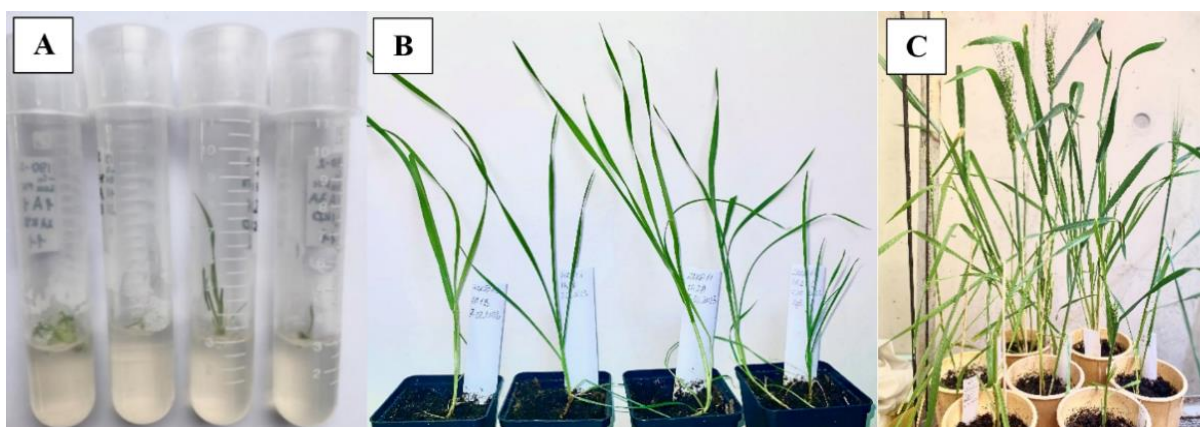
Figure 6. Embryos on the regeneration medium 190-2.

2.7. Zaļo augu pārstādīšana tālākai kultivācijai

Kad augam-reģenerantam izveidojās sakņu sistēma un augu lapu garums sasniedza apmēram 1 cm vai vairāk, tas tika pārstādīts atsevišķā mēģenē. Darbs tika veikts sterilos apstākļos laminārā boksā, pēc iepriekš aprakstītas darba gaitas. Zaļo augu-reģenerantu kultivēšanai tika izmantota reģenerācijas barotne 190-2, bez fitohormoniem (FH), ar varu (Cu). Iepriekš sagatavoto reģenerācijas barotni 190-2+Cu bez FH uzkaršēja. Pirms ievietošanas laminārajā boksā Petri plates ar embrijiem un augiem-reģenerantiem un uzkaršēto trauku no ārpuses sterilizēja ar 70% etilspirtu. Zaļo augu pārstādīšanai tika izmantotas 13 ml mēģenes ar vāciņu. Katrā mēģenē ar automātisko pipeti ielēja 3 ml šķidrās barotnes 190-2+Cu bez FH. Barotnei ļāva atdzist un sacietēt. Pirms augu-reģenerantu pārstādīšanas 10-20 sekundes sterilizēja lielas pincetes un skalpeļus sterilizatorā *Steri 350*.

Turot augu ar pinceti un izmantojot skalpeli, uzmanīgi izgriezta augu no barotnes. Pēc tam augu ievietoja mēģenē tā, lai auga saknes atrastos barotnē, bet auga augšējā daļa paliktu virs barotnes. Mēģeni aizvēra ar vāciņu. Gatavas mēģenes ar augiem-reģenerantiem (7.attēls) ievietoja gaismas termostatā ar 16 stundu fotoperiodu.

Kad lapu garums sasniedza apmēram 5 cm vai vairāk, augi tika pārstādīti atsevišķos podos. Augu uzmanīgi izņēma no mēģenes un ar ūdeni noskaloja lieko barotni no saknītēm. Vispirms augs tika iestādīts 7x7x7,5 cm podā ar gatavo kūdras substrātu sēšanai un piķēšanai (ražotājs 'Biolan', Somija), un pārklāts ar nelielu burciņu, lai izolētu augu no apkārtējās vides. Augu ik pa laiku vēdināja. Pēc divām nedēļām augs tika pārstādīts lielākā podā (diametrs 10 cm x dziļums 18 cm) ar gatavo kūdras substrātu stādīšanai un augsnes uzlabošanai (ražotājs 'Biolan', Somija). Visi augi tika audzēti siltumnīcā, $+22\pm 2^{\circ}\text{C}$ temperatūrā (7.attēls). Augu apstrāde ar kolhicīnu šajā darbā netika veikta.



7.attēls. A – mēģenes ar augiem-reģenerantiem; B – augsnē pārstādīti augi-reģeneranti; C – izaudzētie augi-reģeneranti ar varpām.

Figure 7. A - tubes with plants-regenerants; B - plants-regenerants transplanted into the soil; C – grown plants-regenerants with spikes.

2.8. Papildus hibrīdaugu audzēšana

Tālākai analīzei tika izaudzēti papildus hibrīdraugi ar genotipiem 22KD-1, 22KD-2, 22KD-3, 22KD-4 un 22KD-5 (2.tabula), un trīs durum kviešu šķirnes ‘Fabulis’, ‘Malvadur’ un ‘SMH-87’. Hibrīdaugu audzēšanai izmantoja iepriekš aprakstīto metodi (Rebāne et al. 2020).

2. tabula.

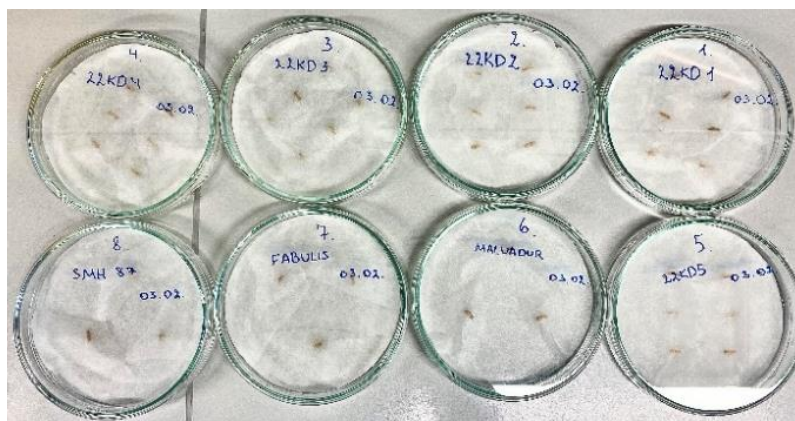
Papildus izaudzētie vasaras kviešu hibrīdi

Table 2.

Additionally grown spring wheat hybrids

Nº	Genotipa nr. / Genotype no.	Izcelsme / Origin
1.	22KD-1	Floradur / Cornetto (<i>T.durum</i> / <i>T.aestivum</i>)
2.	22KD-2	SMH 87 / Granny (<i>T.durum</i> / <i>T.aestivum</i>)
3.	22KD-3	Fabulis / Harenda (<i>T.durum</i> / <i>T.durum</i>)
4.	22KD-4	SMH 87 / Kv4K18 (<i>T.durum</i> / <i>T.aestivum</i>)
5.	22KD-5	SMH 87 / Cornetto (<i>T.durum</i> / <i>T.aestivum</i>)

Pirms sēklu diedzēšanas, tās apstrādāja, ieliekot mazās varglāzēs ar iepriekš pagatavotu 0,1% kālija permanganāta šķīdumu uz 20 min. Diedzēšanai sagatavoja lielas Petri plates, filtrpapīru, destilēto ūdeni, pinceti, smidzinātāju ar 70% etilspirtu, polietilēna plēvi un ūdensizturīgo marķieri. Visā darba laikā rokas un piederumus kārtīgi un regulāri sterilizēja ar 70% etilspirtu. Katrā Petri platē tika ievietots viens filtrpapīra slānis, iepriekš samitrināts destilētā ūdenī. Sēklas 4 reizes noskaloja ar destilēto ūdeni un ar sterilo pinceti novietoja uz filtrpapīra 2-3 cm attālumā vienu no otras. Virs sēklām Petri platē tika novietots otrs slapja filtrpapīra slānis (8.attēls). Slēgtas Petri plates tika aptītas ar polietilēna plēvi un ievietotas gaismas termostatā ar 16 stundu fotoperiodu uz 1 nedēļu.



8.attēls. Petri plates ar kviešu sēklām.

Figure 8. Petri dishes with wheat seeds.

2.9. Hromosomu skaitīšana kviešu saknītēs

Hromosomu skaitīšanai izmantoja dažu iepriekš aprakstīto metožu kopumu (Yan et al. 2020; Maluszynski et al. 2003). Ploiditātes noteikšanai ar hromosomu skaitīšanas metodi tika izmantotas augu saknītes no papildus izaudzētiem hibrīdaugiem 22KD-1, 22KD-2, 22KD-3, 22KD-4 un 22KD-5 (2.tabula). Saknīšu paraugu sagatavošanai vispirms tika pagatavots 0,1% kolhicīna šķīdums un Klarka fiksators (96% etilspirts un ledus etiķskābe, 3:1). Pēc tam tika sagatavoti stobriņi ar skrūvējamiem korķiem, šķēres, automātiskā pipete, vienreizlietojamie uzgaļi, destilēts ūdens, ūdensiztīrīgais marķieris un smidzinātājs ar 70% etilspirtu. No katras izveidotās saknītes uzmanīgi nogrieza ap 1 cm garu saknītes galiņu un noskaloja ar ūdeni. Katru nogriezto galiņu ievietoja atsevišķā stobriņā ar 0,1% kolhicīna šķīdumu uz 2 stundām. Pēc izņemšanas no kolhicīna šķīduma saknītes noskaloja un ievietoja stobriņos ar Klarka fiksatoru. Stobriņus ar saknītēm uzglabāja tumšā vietā.

Saknīšu krāsošanai tika pagatavota krāsa. Tās pagatavošanai izmantoja karmīnu, ledus etiķskābi un dejonizēto ūdeni. Krāsu gatavošana notika velkmē. Vispirms nosvēra 5 g karmīna un rūpīgi saberza pietā līdz pulvera stāvoklim. Pēc tam karmīna pulverim pievienoja 45 ml ledus etiķskābes un rūpīgi samaisīja. Tad pievienoja destilēto ūdeni un atkal samaisīja. Iegūto suspensiju filtrēja caur kroku filtru apmēram 12 stundas tumšā vietā. Jaunos stobriņos ar skrūvējamiem korķiem ieleja 1,5 ml pagatavotās krāsas. Izmantojot pinceti, saknīšu galiņus uzmanīgi izņēma no Klarka fiksatora un ievietoja stobriņos ar krāsu. Saknītes atstāja krāsoties tumšā vietā istabas temperatūrā. Pēc vienas nedēļas veica saknīšu macerāciju. Saknītes tika izņemtas no krāsas un ievietotas iepriekš pagatavotā 0,1 N HCl šķīdumā. Saknīšu macerāciju veica, inkubējot paraugus termomikserī 'Thermomixer Comfort' (ražotājs 'Eppendorf', Vācija) 4-5 stundas +60°C. Pēc macerācijas saknītes atkal tika ieliktas krāsā uz vienu nedēļu.

Hromosomu skaitīšanai saknītēs tika izmantots gaismas mikroskops 'Leica DM500' (ražotājs 'Leica', Vācija). Iepriekš tika sagatavoti priekšmetstikli, segstikliņi, dejonizēts ūdens, pipete, pincete un skalpelis preparātu sagatavošanai. Paņēma priekšmetstiklu un uzpilināja uz tā vienu ūdens pilienu. Ar pinceti uzmanīgi paņēma saknīti un ielika ūdens pilienā. Izmantojot skalpeli, nogrieza labi iekrāsotu saknītes galiņu aptuveni 1 mm garumā, pārējā saknītes daļa tika izmesta. Uzmanīgi nosedza paraugu ar segstikliņu, rūpīgi piespiežot to pie priekšmetstikla tā, lai no saknītes galiņa iegūtu puscaurspīdīgu plankumu. Preparātu aplūkoja mikroskopā un atrada tajā sakņu augšanas zonas šūnas, kurās bija labi redzamas hromosomas. Katram genotipam tika atrastas vismas 15-20 šūnas ar iekrāsotām hromosomām, lai noteiktu genotipa ploiditāti.

2.10. Ploiditātes noteikšana ar plūsmas citometriju

Ploiditātes noteikšanai ar plūsmas citometriju izmantoja iepriekš aprakstīto metodi (Rebāne et al. 2020). Ploiditātes noteikšanai tika izmantoti augu lapu paraugi no genotipiem 22KD-1, 22KD-2, 22KD-3, 22KD-4, 22KD-5, 21-KD-11, 21KD-16 un 21KD-32. Kā kontroli izmantoja lapu paraugus no diploīdiem miežiem, no heksaploīdiem mīkstajiem ziemas kviešiem, kā arī no cieto kviešu šķirnēm 'Fabulis', 'Malvadur' un 'SMH-87', kuri ir tetraploīdi.

Plūsmas citometrijas paraugu sagatavošanai tika sagatavoti visi nepieciešamie materiāli un piederumi: lapu paraugi, šķēres, 10 cm pincete, žilete, smidzinātājs ar 70% etilspirtu, papīrdvielis, stikla Petri plates ar diametru 5,5 cm, ūdensizturīgais marķieris, automātiskā pipete, vienreizlietojamie 1000 µl uzgaļi, 'CyStain UV Ploidy' krāsošanas buferšķīdums, 5 ml polipropilēna mēģenes, 30 µm 'CellTrics' filtri (ražotājs 'Sysmex', Vācija), ribonukleāzes A šķīdums un propīdija jodīda šķīdums.

No katra zaļa auga jaunas lapas ar šķērēm tika nogriezts fragments ap 1 cm garumā un ievietots Petri platē. Izmantojot automātisko pipeti, Petri platē tika pievienots 1 ml 'CyStain UV Ploidy' krāsošanas buferšķīduma, kurā lapas fragments tika lizēts ap 2 min. Pēc tam lapas fragmentu kārtīgi sasmalcināja, izmantojot žileti, un atstāja lizēties vēl 1-2 min. Attiecīgajā mēģenē tika ievietots 30 µm 'CellTrics' filtrs, ar kuru tika izfiltrēts sasmalcinātais lapas paraugs. Izmantoto Petri plati izskaloja ar 1 ml 'CyStain UV Ploidy' krāsošanas buferšķīduma un atkal ielēja mēģenē caur filtru. Kad visi lapu paraugi bija gatavi, tiem pievienoja 1 µl ribonukleāzes A šķīduma. Pēc 10-15 min paraugiem tika pievienoti 5 µl propīdija jodīda šķīduma. Plūsmas citometrijas paraugus glabāja tumsā, ledusskapī, vismaz vienu vai divas stundas (optimāli 24 stundas) pirms izmantošanas plūsmas citometrijā.

Pirms plūsmas citometra izmantošanas to kalibrēja, izmantojot 'Rainbow Calibr Particles, 8 peaks, 3.0-3.4 µm' šķīdumu. Pēc kalibrēšanas katrs paraugs pirms analīzes tika samaisīts, izmantojot 'Vortex' (ražotājs 'Biosan', Latvija), un pēc kārtas ievietots plūsmas citometrā. Plūsmas citometra mērījumi tika iegūti ar 'BS FACS Software 1.0.0.650.' programmas palīdzību. Iegūtie dati tika saglabāti atsevišķā mapē tālākai analīzei.

2.11. DNS ekstrakcija no augu lapām

DNS ekstrakcijai no augu lapām tika izmantots iepriekš aprakstītais protokols (Žagata 2013). Pirms paraugu sagatavošanas DNS ekstrakcijai tika sagatavoti visi nepieciešamie materiāli un piederumi: lapu paraugi, šķēres, pincete, endorfa (centrifugēšanas) stobriņi, mazās piestas endorfa stobriņiem, smidzinātājs ar 70% etilspirtu, papīrdvielis, ūdensizturīgais marķieris, automātiskās pipetes un vienreizlietojamie uzgaļi. Vispirms tika

pagatavots DNS lizēšanas buferšķīdums. DNS lizēšanas buferšķīduma sastāvs ir parādīts 3.tabulā.

3. tabula.

DNS lizēšanas buferšķīduma sastāvdaļas

Table 3.

DNA lysis buffer content

Reāģenti / Reagents	Koncentrācija, ml/l / Concentration, ml/l
1M TRIS pH 8,0	200
5M NaCl	50
0,5M EDTA pH 8,0	50
10% SDS	100
Molekulārais ūdens	600

No katra analizējamā auga lapas ar šķērēm tika paņemts fragments ap 1 cm garumā un ievietots centrifugēšanas stobriņā. Izmantojot automātisko pipeti, stobriņos pievienoja 400 µl DNS lizēšanas buferšķīduma. Ar mazo piestiņu saberza paraugu līdz šķīdums ir iekrāsojis izteikti zaļš. Pēc saberšanas pievienoja vēl 400 µl DNS lizēšanas buferšķīduma un samaisīja ar ‘Vortex’. Tad stobriņus ar paraugiem lika inkubēties termomikserī ‘Thermomixer Comfort’ 20 min +60°C. Pēc inkubācijas DNS paraugam pievienoja 500 µl hloroforma maisījuma (hloroforms un izoamilalkohols 24:1), samaisīja ar ‘Vortex’ un lika centrifugēties ‘Centrifuge 5410’ (ražotājs ‘Eppendorf’, Vācija) 5 min pie 13200 apgriezieniem minūtē. Pēc centrifugēšanas parauga augšējo slāni (ūdens slānis ar izšķīdušo DNS) uzmanīgi nosūca ar pipeti un pārnesa jaunā centrifugēšanas stobriņā. Noņemtajam šķīdumam pievienoja 100 µl kālija oksilacetāta un samaisīja lēni apgriežot 5 reizes, pēc tam atkal lika centrifugēties 5 min pie 13200 apgriezieniem minūtē. Pēc centrifugēšanas šķidro fāzi pārnesa jaunā centrifugēšanas stobriņā un pievienoja 700 µl izopropanola. Paraugus samaisīja, lēni apgrozot 10 reizes, un ievietoja saldētavā uz 20 min -20°C. Pēc tam paraugus centrifugēja 5 min pie 13200 apgriezieniem minūtē. Pēc centrifugēšanas Petri platē uzmanīgi nolēja šķidro fāzi. Stobriņā ar nogulsniem pievienoja 200 µl 70% etanola, samaisīja, lēni apgrozot, un centrifugēja 5 min pie 13200 apgriezieniem minūtē. Atkal uzmanīgi nolēja šķidro fāzi Petri platē. Stobriņus ar nogulsniem atstāja žāvēties 30-60 min līdz nav redzami pilieniņi uz stobriņu iekšējām malām. Pēc žāvēšanas paraugiem pievienoja 50 µl TE buferšķīduma. Ekstragēto DNS lika ledusskapī +4°C un atstāja vismaz uz diennakti.

2.12. Polimerāzes ķēdes reakcija (PCR) ar iPBS praimeriem

Pirmkārt tika pagatavots PCR sagataves šķīdums nepieciešamajam reakciju daudzumam (4.tabula). DNS polimerāze tika pievienota pēdējā.

4. tabula.

PCR sagataves šķīduma sastāvdaļas

Table 4.

PCR solution content

Reāģenti / Reagents	Tilpums vienai reakcijai, µl / Volume per reaction, µl
Molekulārais ūdens	18,8
10xDreamTaq zaļš buferis	3
dNTP	0,6
iPBS praimeris	0,3
DreamTaq HS DNS polimerāze	0,3

PCR platē iepildīja 2 µl ekstragētās DNS šķīduma. Katram DNS paraugam pievienoja 23 µl PCR sagataves šķīduma, kuru pirms tam samaisīja ar 'Vortex'. Kā negatīvo kontroli izmantoja PCR sagataves šķīdumu bez DNS, kā pozitīvo kontroli izmantoja lucernas ekstragēto DNS ar PCR sagataves šķīdumu. Pamatojoties uz iepriekšējiem pētījumiem (Žagata 2013), analīzei tika izvēlēti septiņi uz retrotranspozoniem balstītie iPBS praimeris (5.tabula).

5. tabula.

Izmantoto iPBS praimeru sekvences

Table 5.

Sequences of iPBS primers used for PCR

Praimera nr. / Primer no.	Nukleotīdu skaits / Number of nucleotides	Praimera sekvence / Primer sequence
2083	12	CTTCTAGCGCCA
2240	18	AACCTGGCTCAGATGCCA
2377	12	ACGAAGGGACCA
2386	12	CTGATCAACCCA
2222	18	ACTTGGATGCCGATACCA
2230	18	TCTAGGCGTCTGATACCA
2395	18	TCCCAGCGGAGTCGCCA

PCR plati aizlīmēja ar plēvi un samaisīja MPS-1 kratītājā (ražotājs 'BioSan', Latvija). Pēc tam paraugus ievietoja PCR amplifikatorā 'GeneAmp PCR System 9700' (ražotājs 'Thermo Fisher Scientific', ASV), kuram uzstādīja nepieciešamos reakcijas apstākļus (3.pielikums). Pēc amplifikācijas paraugus glabāja ledusskapī +4°C temperatūrā.

2.13. DNS un PCR produktu analīze ar agarozes gēla elektroforēzi

Pirmkārt tika pagatavots agarozes gēls. Gēla pagatavošanai izmantoja agarozī 'TopVision Agarose' un 1xTAE (Tris-acetate-EDTA) buferšķīdumu. TAE buferšķīduma sastāvs ir parādīts 4.pielikumā. Agarozes daudzums un 1xTAE buferšķīduma tilpums gēla pagatavošanai bija atkarīgs no gēla izmēra un paraugu skaita (5.pielikums).

Agarozī un 1xTAE buferšķīdumu nepieciešamajās proporcijās samaisīja burciņā un uzsildīja mikroviļņu krāsnī līdz agaroze pilnīgi izšķīda. Gēlu atstāja atdzist līdz +50°C - 70°C. Sagatavoja agarozes gēla formu un noregulēja līmeni. Atdzisušo gēlu ielēja formā un ievietoja 'ķemmītes' paraugu kabatiņu izveidošanai, pēc tam gēlu pilnībā atdzesēja. Sagatavoja elektroforēzes iekārtu, ielejot tajā 1xTAE buferšķīdumu. Kad agarozes gēls bija pilnībā sacietējis to ievietoja elektroforēzes iekārtā.

Sagatavoja DNS paraugus un PCR produktus. Paraugu krāsošanas platē katrā bedrītē iepildīja 3 µl '6x DNA loading Dye Buffer Double Blue' krāsu. Stobriņus ar ekstragēto DNS samaisīja ar 'Vortex' un katrā bedrītē ar krāsu pievienoja 15 µl DNS šķīduma. PCR produkti netika krāsoti.

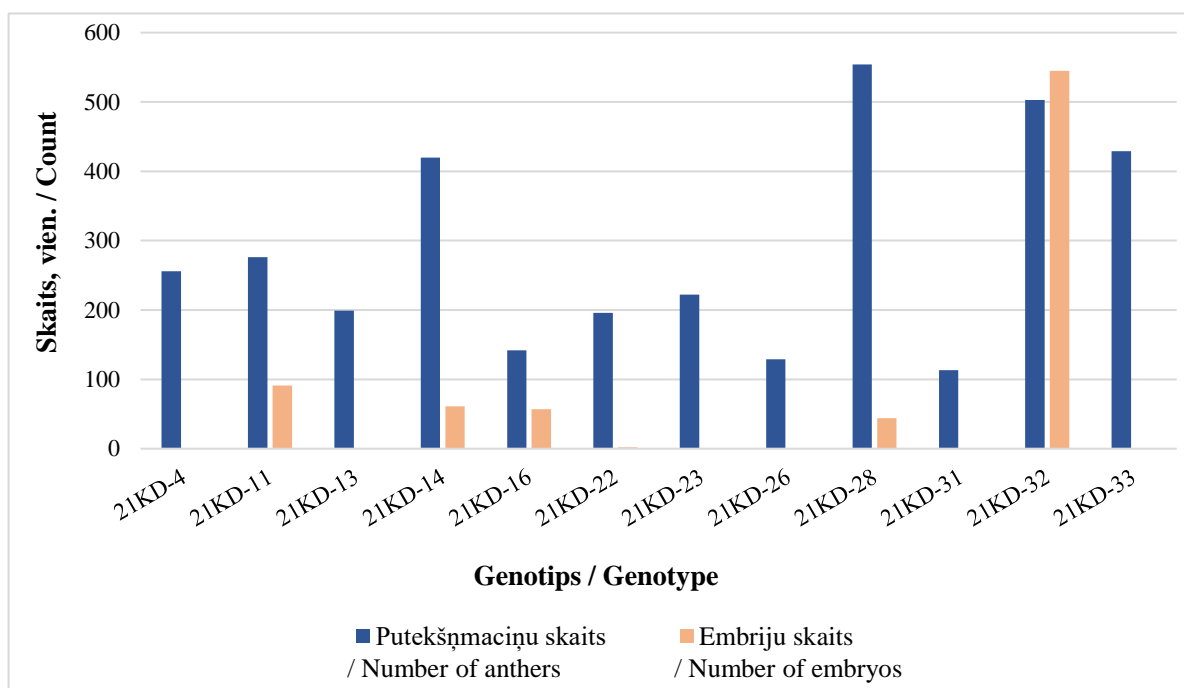
Pirmajā un pēdējā kabatiņā iepildīja 5 µl '1 kb DNA Ladder Ready to Load' garuma marķieri. Visās pārējās kabatiņās iepildīja 18 µl parauga. Pēc tam iekārtai uzlika vāku un ar vadiem savienoja ar 'Life Technologies PS 304' strāvas bloku (ražotājs 'GibcoBRL', ASV). Noregulēja strāvu 80V (gēlam 10x7 cm) vai 120V (gēlam 20x20 cm) un ieslēdza strāvas padevi. Elektroforēzes process bija atkarīgs no gēla izmēra. Elektroforēze turpinājās ap vienu stundu gēlam 10x7 cm un ap trim stundām gēlam 20x20 cm.

Kad elektroforēze bija pabeigta, izslēdza strāvu un atvienoja vadus. Gēlu izņēma no iekārtas un ievietoja traukā ar 50 µl/L etīdija bromīda šķīdumu uz 20-30 min. Pēc krāsošanas etīdija bromīda šķīdumā gēlu noskaloja ar ūdeni. Pēc noskalošanas gēlu novietoja uz UV platformas, uzlika 'MicroDOC' aizsegu (ražotājs 'Clever Scientific Ltd', Lielbritānija), ieslēdza UV gaismu un nofotografēja.

3. REZULTĀTI UN TO ANALĪZE

No visiem darbā izmantotajiem kviešu hibrīdu genotipiem tika iegūti putekšņmaciņi. Kopumā no 12 genotipiem darba gaitā tika iegūti un iestādīti *in vitro* 3439 putekšņmaciņi, 709 embriji, 231 albīnais augs un 16 zaļie augi.

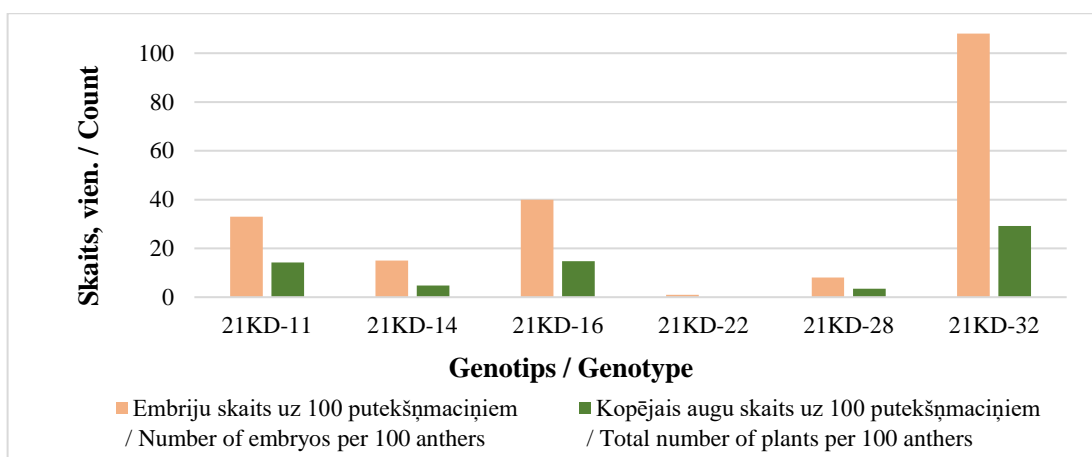
Iegūtais putekšņmaciņu skaits un izveidoto embriju skaits parādīts 9.attēlā. Tikai 50% no darbā izmantotajiem kviešu hibrīdu genotipiem izveidoja embrijus. Konstatēts, ka izveidoto embriju skaits nebija atkarīgs no uz barotnēm uzlikto putekšņmaciņu skaita. Genotipi, kas embrijus neveidoja, nav iekļauti turpmākajā rezultātu analīzē.



9.attēls. Uz barotnēm uzliktais putekšņmaciņu skaits un iegūto embriju skaits katram genotipam.

Figure 9. Number of anthers placed on the medium and embryos received in each genotype.

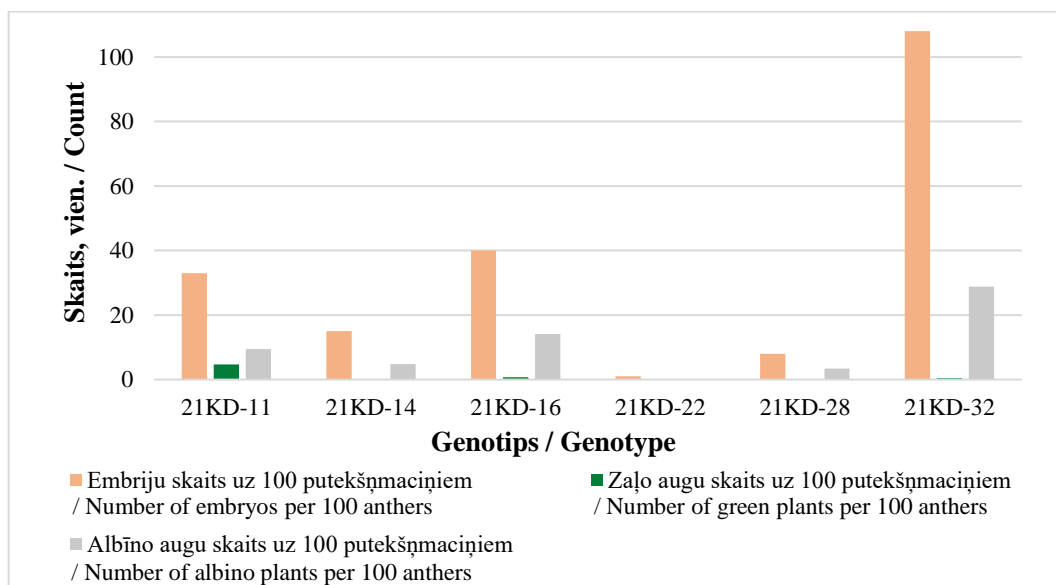
Embriju skaits uz 100 putekšņmaciņiem un kopējais augu skaits uz 100 putekšņmaciņiem ir parādīts 10.attēlā. Rezultāti parāda, ka pastāvēja sakarība starp iegūto embriju skaitu un iegūto augu kopējo skaitu. Genotipos, kuri izveidoja lielāku embriju skaitu, izveidojās lielākais albīno un zaļo augu skaits.



10.attēls. Embriju skaits uz 100 putekšņmaciņiem un kopējais augu skaits uz 100 putekšņmaciņiem. Grafikā iekļauti tikai genotipi, kas veidoja embrijus.

Figure 10. Number of embryos per 100 anthers and total number of plants per 100 anthers. Only the genotypes that formed embryos are included in the graph.

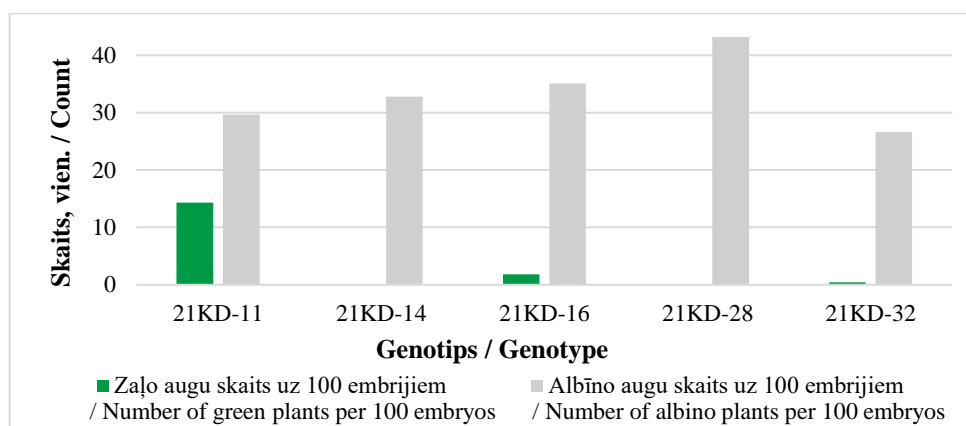
Atsevišķi analizējot iegūto albīno augu skaitu un zaļo augu skaitu uz 100 putekšņmaciņiem, var redzēt, ka albīno augu skaits bija atkarīgs no embriju skaita, taču zaļo augu iznākums nebija atkarīgs no iegūto embriju skaita (11.attēls).



11.attēls. Iegūto embriju, zaļo augu un albīno augu skaits uz 100 iegūtiem putekšņmaciņiem. Grafikā iekļauti tikai genotipi, kas veidoja embrijus.

Figure 11. Number of embryos, green plants and albino plants obtained per 100 anthers obtained. Only the genotypes that formed embryos are included in the graph.

Pieci no sešiem genotipiem, kas izveidoja embrijus, izveidoja augus (83%). Visi pieci augus veidojošie genotipi izveidoja albīnos augus (100%), tikai trīs no tiem izveidoja zaļos augus (60%). Izveidoto albīno augu skaits bija daudz lielāks nekā izveidoto zaļo augu skaits. Iegūto zaļo augu skaits un albīno augu skaits uz 100 iegūtiem embrijiem ir parādīts 12.attēlā.



12.attēls. Iegūto zaļo augu un albīno augu skaits uz 100 iegūtiem embrijiem. Grafikā iekļauti tikai tie genotipi, kas veidoja augus.

Figure 12. Number of obtained green plants and albino plants per 100 embryos obtained. Only the genotypes that formed plants are included in the graph.

Rezultātos albīno augu skaitā tika iekļauti augi, kuriem izveidojās tikai sakņu sistēma, un augi, kuriem izveidojās gan sakņu sistēma, gan virszemes daļa. Albīno augu skaits, kuriem izveidojās tikai sakņu sistēma, sastādīja 58% no kopējā albīno augu skaita, savukārt albīno augu skaits ar sakņu sistēmu un virszemes daļu sastādīja 42%.

Apkopojums par embrijus un augus veidojošajiem vasaras kviešu hibrīdu genotipiem ir parādīts 6.tabulā. Embrijus izveidoja seši no 12 vasaras kviešu hibrīdiem. Divi no tiem bija iekšsugu hibrīdi (*T.durum/T.durum*), četri no tiem bija starpsugu hibrīdi (*T.aestivum/T.durum*). Augus izveidoja pieci no sešiem embrijus veidojošajiem hibrīdu genotipiem. Divi no tiem bija iekšsugu hibrīdi, trīs no tiem bija starpsugu hibrīdi. Zaļos augus izveidoja tikai trīs hibrīdu genotipi, divi starpsugu hibrīdi un viens iekšsugu hibrīds.

6.tabula.

Embriju un augu veidojošie vasaras kviešu hibrīdu genotipi

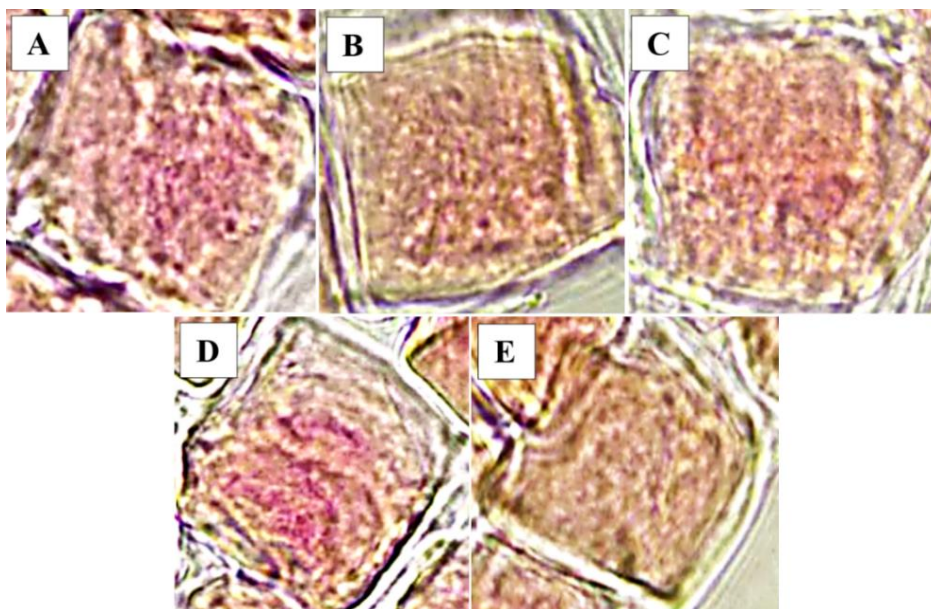
Table 6.

Genotypes of spring wheat hybrids forming embryos and plants

Genotips / Genotype	Izcelsme / Origin	Veido embrijus / Forms embryos	Veido albīnos augus / Forms albino plants	Veido zaļos augus / Forms green plants
21KD-11	DC 753-8/12 / Bezenčukskaja (<i>T.aestivum/T.durum</i>)	+	+	+
21KD-14	Granny / SMH 87 (<i>T.aestivum/T.durum</i>)	+	+	
21KD-16	Fabulis / SMH 87 (<i>T.durum/T.durum</i>)	+	+	+
21KD-22	Stanga / Fabulis (<i>T.aestivum/T.durum</i>)	+		
21KD-28	Miradur / Fabulis (<i>T.durum/T.durum</i>)	+	+	
21KD-32	Meridiano / Сабина (<i>T.durum/T.aestivum</i>)	+	+	+

Pēc augu-reģenerantu pārstādīšanas lielākos podos, septiņi augi no genotipa 21KD-11, viens augs no genotipa 21KD-16 un divi augi no genotipa 21KD-32 izdzīvoja. Visiem augiem-reģenerantiem no genotipiem 21KD-11 un 21KD-32 izveidojās vārpas. Sešiem no septiņiem augiem no genotipa 21KD-11 izveidojās graudi. Graudi izveidojās arī augiem-reģenerantiem no genotipa 21KD-32. Augs-reģenerants no genotipa 21KD-16 graudu pārbaudes brīdī vēl nebija sasniedzis vārpas veidošanas fāzi.

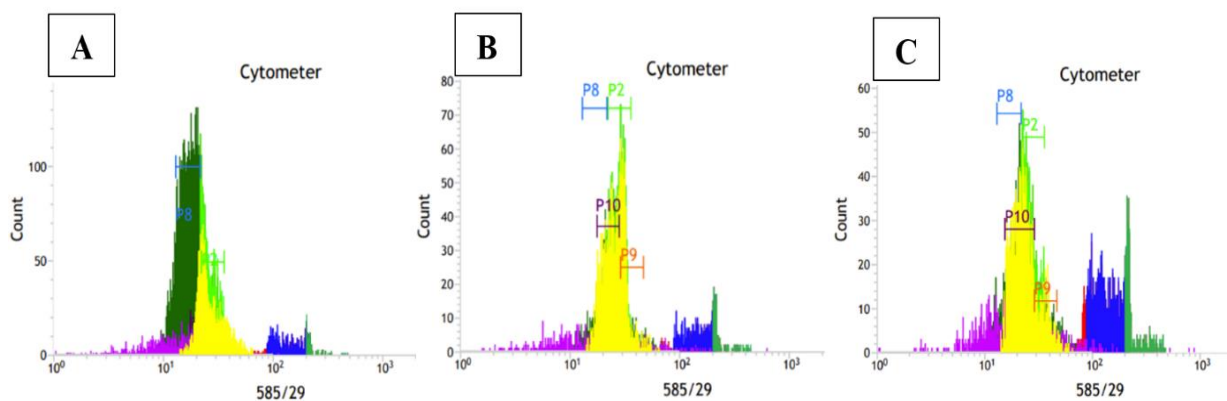
Hibrīdu augu ploīditātes noteikšanai vispirms tika veikta hromosomu skaitīšana kviešu sakņu meristēmas šūnās. Katram genotipam tika atrastas no 15 līdz 20 šūnām ar iekrāsotām hromosomām. Sakņu meristēmas šūnu piemēri ir parādīti 13.attēlā. Genotipos 22KD-1 un 22KD-4 lielākā daļa atrasto šūnu bija heksaploīdas (hromosomu skaits bija $6n=42$), genotipos 22KD-2, 22KD-3 un 22KD-5 lielākā daļa šūnu bija tetraploīdas (hromosomu skaits bija $4n=28$).



13.attēls. Kviešu sakņu augšanas zonas šūnu piemēri hromosomu skaitīšanai. A – 22KD-1 heksaploīda šūna; B – 22KD-2 tetraploīda šūna; C – 22KD-3 tetraploīda šūna; D – 22KD-4 heksaploīda šūna; E – 22KD-5 tetraploīda šūna.

Figure 13. Examples of wheat root growth zone cells for chromosome counting. A – 22KD-1 hexaploid cell; B – 22KD-2 tetraploid cell; C – 22KD-3 tetraploid cell; D – 22KD-4 hexaploid cell; E – 22KD-5 tetraploid cell.

Ar plūsmas citometrijas metodi tika noteikta ploīditāte gan hibrīdiem augiem, gan darbā iegūtajām DH līnijām. Plūsmas citometrijas rezultāti parāda, ka visi analizējamie genotipi bija miksoploīdi. Visos paraugos tika atrastas gan tetraploīdas šūnas, gan heksaploīdas šūnas (14.attēls).

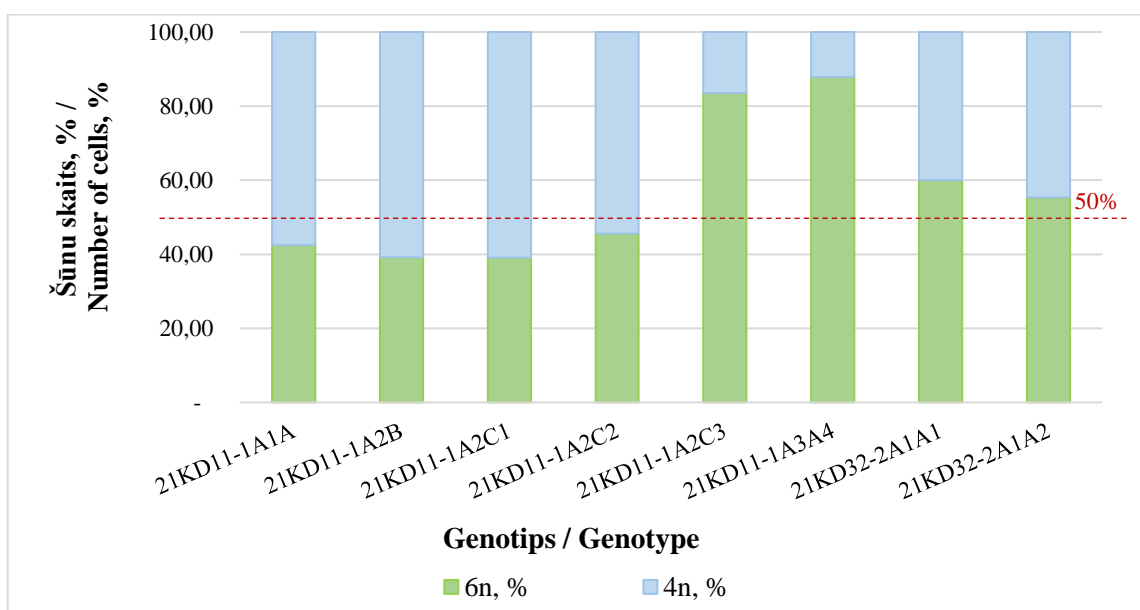


14.attēls. Plūsmas citometrijas rezultātu piemēri. P8 – tetraploīdas šūnas; P2 – heksaploīdas šūnas. A – genotips ar 4n ploīditātes līmeni; B – genotips ar 6n ploīditātes līmeni; C – genotips, kur 4n un 6n šūnu skaits ir gandrīz vienāds.

Figure 14. Examples of flow cytometry results. P8 – tetraploid cells; P2 – hexaploid cells. A – genotype with 4n ploidy level; B – genotype with 6n ploidy level; C – genotype, where the number of 4n and 6n cells is almost equal.

Ja tetraploīdo šūnu skaits noteiktā paraugā pārsniedza 50%, tad genotips tika uzskatīts par tetraploīdu. Savukārt, ja heksaploīdo šūnu skaits paraugā pārsniedza 50%, tad genotips tika uzskatīts par heksaploīdu.

Darbā iegūto zaļo augu reģenerantu (DH līniju) ploīditāte ir parādīta 15.attēlā. Ploīditātes noteikšana tika veikta tikai no starpsugu hibrīdiem iegūtajām DH līnijām. Pieciem no sešiem augiem ar genotipu 21KD-11 tika noteikts 4n ploīditātes līmenis, vienam tika noteikts 6n ploīditātes līmenis. Augiem no genotipa 21KD-32 tika noteikts 4n ploīditātes līmenis.



15.attēls. No starpsugu hibrīdiem iegūto DH līniju ploīditāte.

Figure 15. Polyploidy of DH lines from interspecific hybrids.

Apkopojums par kviešu starpsugu hibrīdu un darba gaitā iegūto DH līniju ploīditāti ir parādīts 7.tabulā. Genotipiem 22KD-1, 22KD-4 un 21KD-32 lielākā daļa šūnu bija heksaploīdas, savukārt, genotipiem 22KD-2, 22KD-3, 22KD-5 un 21KD-11 lielākā daļa šūnu bija tetraploīdas.

7. tabula.

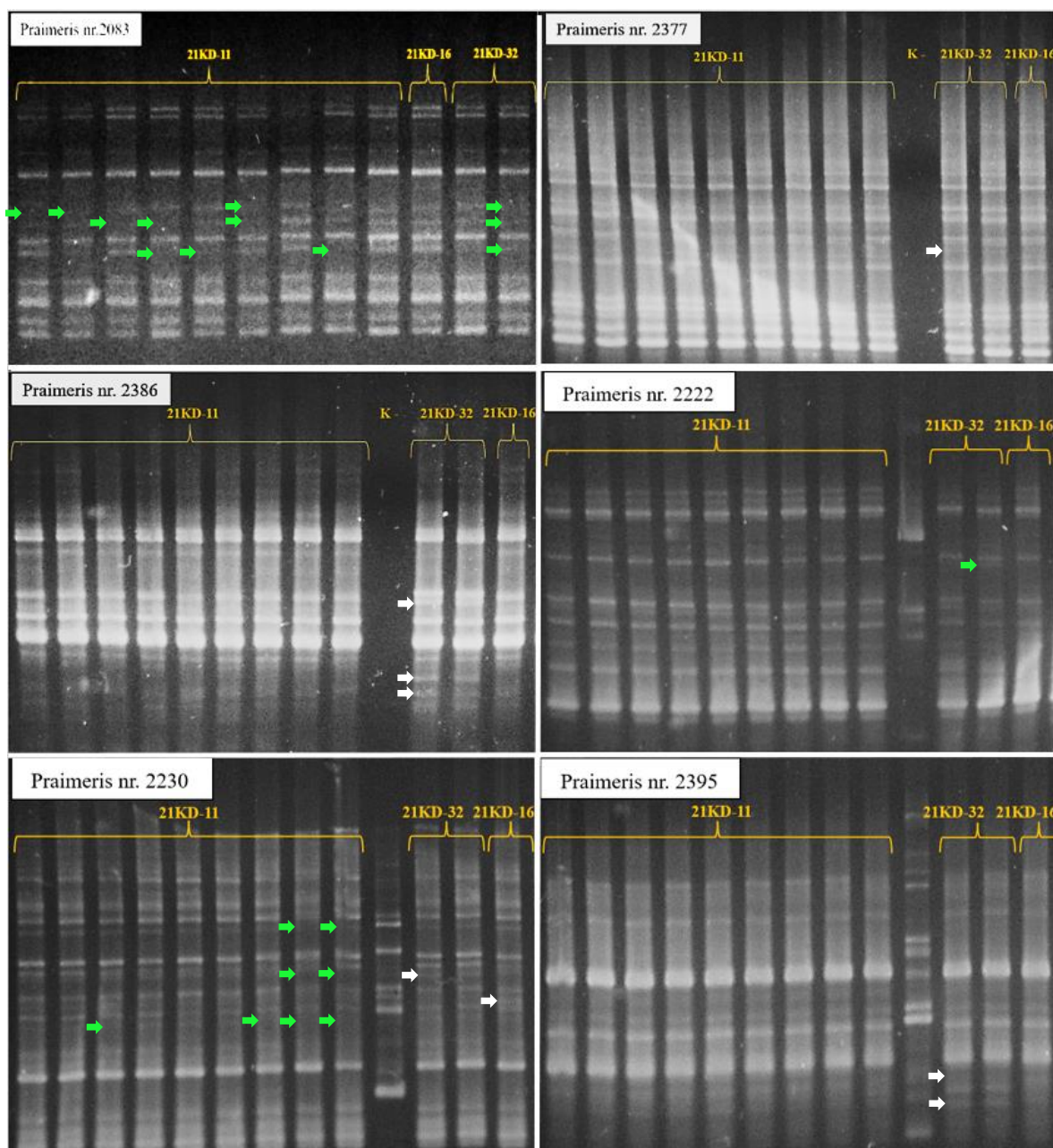
Vasaras kviešu starpsugu hibrīdu un DH līniju ploīditāte.

Table 7.

Polyploidy of spring wheat interspecific hybrids and DH lines.

Genotipa nr. / Genotype no.	Izcelsme / Origin	Ploīditāte / Polyploidy
22KD-1	Floradur / Cornetto (<i>T.durum/T.aestivum</i>)	Heksaploīds (6n)
22KD-2	SMH 87 / Granny (<i>T.durum/T.aestivum</i>)	Tetraploīds (4n)
22KD-3	Fabulis / Harenda (<i>T.durum/T.durum</i>)	Tetraploīds (4n)
22KD-4	SMH 87 / Kv4K18 (<i>T.durum/T.aestivum</i>)	Heksaploīds (6n)
22KD-5	SMH 87 / Cornetto (<i>T.durum/T.aestivum</i>)	Tetraploīds (4n)
21KD-11 (DH)	DC 753-8/12 / Bezenčukskaja (<i>T.aestivum/T.durum</i>)	Tetraploīds (4n)
21KD-32 (DH)	Meridiano / Сабина (<i>T.durum/T.aestivum</i>)	Heksaploīds (6n)

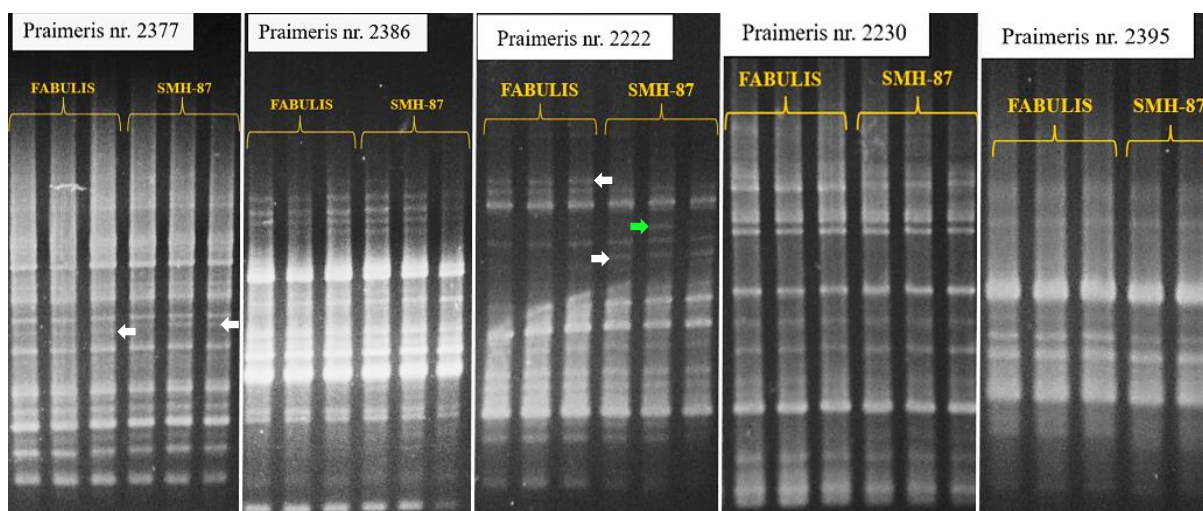
Darbā iegūto DH līniju polimorfisma noteikšana tika veikta, izmantojot septiņus iPBS praimerus. Izmantojot praimeru nr. 2240, nekādas atšķirības starp paraugiem netika atrastas. Pārējo praimeru izmantošanas rezultāti ir parādīti 16. attēlā. Izmantojot praimeru nr. 2083, tika atrastas atšķirības gan starp DH līniju genotipiem, gan viena genotipa ietvaros. Izmantojot praimeru nr. 2377, tika atrasts viens atšķirīgs lokuss starp genotipu 21KD-32 un pārējiem genotipiem. Izmantojot praimeru nr. 2386, tika atrasti trīs atšķirīgi lokusi starp genotipu 21KD-32 un pārējiem genotipiem. Izmantojot praimeru nr. 2222, tika atrasts viens atšķirīgs lokuss 21KD-32 genotipa ietvaros. Izmantojot praimeru nr. 2230, tika atrastas atšķirības gan starp dažādiem genotipiem, gan 21KD-11 genotipa ietvaros. Izmantojot praimeru nr. 2395, tika atrastas atšķirības starp genotipiem 21KD-32 un 21KD-16.



16.attēls. DH līniju PCR produkti ar iPBS praimeriem. Baltās bultiņas parāda atšķirības starp dažādiem genotipiem; zaļās bultiņas parāda atšķirības viena genotipa ietvaros.

Figure 16. DH line PCR products with iPBS primers. White arrows show differences between different genotypes; green arrows show differences within a single genotype.

Durum kviešu šķirņu ‘Fabulis’ un ‘SMH-87’ polimorfisma noteikšana tika veikta, izmantojot piecus iPBS praimerus (17. attēls). Izmantojot praimerus nr. 2386, 2230 un 2395, nekādas atšķirības starp šķirnēm netika atrastas. Izmantojot praimeru nr. 2377, tika atrasti divi atšķirīgi lokusi starp šķirnēm. Izmantojot praimeru nr. 2222, tika atrasti divi atšķirīgi lokusi starp šķirnēm un viens atšķirīgs lokuss ‘SMH-87’ šķirnes ietvaros.



17.attēls. Durum kviešu šķirņu PCR produkti ar iPBS praimeriem. Baltās bultiņas parāda atšķirības starp šķirnēm; zaļā bultiņa parāda atšķirību vienas šķirnes ietvaros.

Figure 17. Durum wheat varieties PCR products with iPBS primers. White arrows show differences between varieties; green arrow shows difference within a single variety.

4. DISKUSIJA

Iegūtie rezultāti parāda, ka visi darbā izmantotie vasaras kviešu hibrīdu genotipi veidoja putekšņmaciņus, kurus potenciāli var izmantot putekšņmaciņu kultūras izveidošanai un dubultoto haploīdu iegūšanai. Taču tikai 50% genotipu izveidoja embrijus. Tas nozīmē, ka genotipos, kuru embriji neizveidojās, androģenēzi ietekmēja viens vai vairāki faktori, kas apturēja putekšņu attīstību un embriju veidošanos. Tā kā visi paraugi tika kultivēti vienādos apstākļos, visticamāk, androģenēzi ietekmēja tieši donoraugu genotips, kas saskan ar citu autoru izvirzītajām teorijām, ka genotips ir galvenais androģenēzi limitējošais faktors (Grauda et al. 2016., Першина и др. 2013).

Izveidoto embriju skaits nebija atkarīgs no iegūto putekšņmaciņu skaita. Taču tika novērota sakarība starp iegūto embriju skaitu un iegūto augu kopējo skaitu – jo lielāks bija izveidoto embriju skaits, jo lielāks bija iegūto augu kopējais skaits katrā genotipā. Svarīgi uzsvērt, ka šī sakarība attiecas galvenokārt uz albīno augu veidošanos, jo zaļo augu iznākums nebija atkarīgs no embriju skaita.

Pieci no sešiem embrijus veidojošiem genotipiem izveidoja augus. Albīno augu skaits bija daudz lielāks nekā zaļo augu skaits, kas saskan ar citu autoru pētījumu rezultātiem (Zheng 2003). Darba gaitā albīnie augi tika iedalīti divās grupās: augi, kuriem izveidojās tikai sakņu sistēma, un augi, kuriem izveidojās gan sakņu sistēma, gan virszemes daļa. Virszemes daļas attīstības trūkumi un lēna auga augšana liecina par to, ka izmaiņas genomā un hlorofila trūkums albīnos augos negatīvi ietekmē to attīstību, un ļauj secināt, ka albīnie augi nav spējīgi izdzīvot (Zheng 2003, Jacquard et al. 2009).

Tikai trīs genotipi izveidoja zaļos augus, kas atbilst izvirzītajam pētījuma uzdevumam un gaidītajam rezultātam – ar putekšņmaciņu kultūras metodi iegūt zaļus augus-reģenerantus no vasaras kviešu hibrīdu selekcijas materiāla. Svarīgi uzsvērt, ka divi no trim zaļo augu veidojošajiem genotipiem bija starpsugu hibrīdi, kas nesaskan ar daudziem citu autoru pētījumu rezultātiem, jo kviešu starpsugu hibridizācija reti notiek ar pozitīvu iznākumu, kas apgrūtina selekcijas procesu (Бабаева 2017). Vislielākais zaļo augu-reģenerantu skaits tika iegūts no hibrīda ar genotipu 21KD-11, kas ir DC 753-8/12 un Bezenčukskaja šķirņu starpsugu hibrīds. Šis fakts palielina darbā iegūto rezultātu svarīgumu.

Iegūtie augi-reģeneranti netika apstrādāti ar kolhicīnu, jo pēc apstrādes palielinās augu-reģenerantu mirstības līmenis (Soriano et al. 2007). Tomēr gandrīz visiem augiem-reģenerantiem izveidojās graudi. Tas nozīmē, ka augos-reģenerantos notika pašploidizācija, jo haploīdi augi-reģeneranti nav spējīgi veidot graudus. Dažos rakstos tiek minēts, ka vasaras kviešiem pašploidizācijas biežums sasniedz aptuveni 15-44% (Soriano et al. 2007).

Salīdzinājumā ar ziemas kviešiem, kuriem šīs rādītājs ir ap 25-68% (Barnabas 2003), tās ir zema pašploidizācijas spēja. Tas liecina par to, ka darbā izmantotajiem vasaras kviešu hibrīdiem un DH līnijām ir augstas pašploidizācijas spējas. No dubultotiem haploīdiem iegūtie graudi tika nodoti tālākai audzēšanai un novērošanai Latvijas Biozinātņu un tehnoloģiju universitātes Agroresursu un ekonomikas institūtam.

Vispirms kviešu hibrīdu ploīditāte tika noteikta ar hromosomu skaitīšanas metodi kviešu sakņu augšanas zonas šūnās, kas ļāva vizuāli novērtēt genomu, tomēr ļoti liels hromosomu skaits un to neliels izmērs apgrūtināja hromosomu komplekta noteikšanu. Šo metodi nevarēja izmantot ploīditātes noteikšanai darbā iegūtajās DH līnijās, jo nebija iespējams iegūt pietiekošā skaitā augu-reģenerantu sakņu paraugus. Tādēļ ploīditātes noteikšanai tika izmantota plūsmas citometrijas metode.

Plūsmas citometrijas rezultāti parāda, ka visi darbā analizējamie kviešu hibrīdi un no tiem iegūtie augi-reģeneranti (DH līnijas) bija miksoploīdi, tajos tika atrastas gan šūnas ar tetraploīdu ($4n = 28$) hromosomu komplektu, gan šūnas ar heksaploīdu hromosomu komplektu ($6n = 42$). Tas saskan ar citu autoru pētījumu rezultātiem, ka miksoploīdija bieži piemīt hibrīdiem organismiem (Кунах 1980). Miksoploīdija tika noteikta arī durum kviešu šķirnēs, kuras tiek uzskatītas par tetraploīdiem. Tas ļauj secināt, ka šīs šķirnes kādreiz agrāk bija sakrustotas ar heksaploīdiem kviešiem. Plūsmas citometrijā iegūtie rezultāti par kviešu hibrīdu ploīditāti sakrīta ar hromosomu skaitīšanas rezultātiem. Tas paaugstina darbā iegūto rezultātu ticamību.

Hibrīdam ar genotipu 22KD-3 (Fabulis / Harenda) tika noteikts tetraploīds hromosomu komplekts, ko var skaidrot ar to, ka šis genotips ir durum kviešu iekšsugu hibrīds. Starpsugu hibrīdiem 22KD-1 (Floradur / Cornetto) un 22-KD-4 (SMH 87 / Kv4K18) tika noteikts heksaploīds hromosomu komplekts, savukārt starpsugu hibrīdiem 22KD-2 (SMH 87 / Granny) un 22KD-5 (SMH 87 / Cornetto) tika noteikts tetraploīds hromosomu komplekts. Konstatēts, ka pastāv vienāda iespēja iegūt gan tetraploīdus, gan heksaploīdus starpsugu (*Triticum durum* x *Triticum aestivum*) hibrīdus. Tādu pieņēmumu var izdarīt, aplūkojot arī no starpsugu hibrīdiem iegūto DH līniju ploīditāti: augiem-reģenerantiem no genotipa 21KD-11 tika noteikts tetraploīds hromosomu komplekts, bet augiem-reģenerantiem no genotipa 21KD-32 tika noteikts heksaploīds hromosomu komplekts.

Kviešu ģenētiskā analīze ar iPBS PCR metodi parādīja, ka vispiemērotākie iPBS praimeru vasaras kviešu hibrīdu un DH līniju polimorfisma noteikšanai bija praimeru nr. 2083, 2222 un 2230, ar kuriem iespējams noteikt gan polimorfismu viena genotipa ietvaros, gan ģenētisko heterogenitāti (daudzveidību) starp dažādiem genotipiem. Ar praimeriem nr. 2377, 2386 un 2395 bija iespējams noteikt ģenētisko daudzveidību starp dažādiem genotipiem, bet atšķirības viena genotipa ietvaros ar šo praimeru palīdzību netika atrastas.

Ģenētiskās daudzveidības noteikšanas rezultāti parāda, ka darbā izmantotās durum kviešu šķirnes ir ļoti ģenētiski vienvēidīgas (homogēnas). Genotipi 21KD-11, 21KD-16 un 21KD-32 arī ģenētiski bija ļoti līdzīgi, lielākais atšķirību skaits starp DH līnijām bija trīs lokusi. Tika apstiprināts polimorfisms genotipa 21KD-11 ietvaros. Nepietiekama augu-reģenerantu skaita dēļ, genotipos 21KD-16 un 21KD-32 noteikt polimorfismu nebija iespējams. Salīdzinot gēla elektroforēzes rezultātos atrastās atšķirības gan starp dažādiem genotipiem, gan noteiktu genotipu ietvaros, var secināt, ka ar izmantoto praimeru palīdzību bija noteikta retrotranspozonu aktivācija un somaklonāla mainība gēnu nekodējošās secībās – sakarības starp atrastajām ģenētiskām atšķirībām un fenotipiskajām pazīmēm nenovēroja. Tomēr iegūtie rezultāti sakrīt ar citu autoru secinājumiem par polimorfisma un somaklonālās mainības biežo sastopamību kviešos, it īpaši hibrīdos augos (Kraitshtein et al. 2010).

Pēc iegūtajiem rezultātiem, visiem analizējamajiem hibrīdu un DH līniju genotipiem ir zema ģenētiskā daudzveidība. Tas ļauj secināt, ka no genotipa 21KD-11 iegūtā DH līnija ir pietiekami ģenētiski stabila, lai turpinātu izmantot šo genotipu selekcijā.

Izvērtējot rezultātu ticamību, svarīgi uzsvērt, ka putekšņmaciņu metode ir visefektīvākā un vienkāršākā metode dubultoto haploīdu iegūšanai, ko apstiprina daudzi citi pētījumu autori (Logue 1996., El-Hennawy et al. 2011., Першина и др. 2013). Šī iemesla dēļ putekšņmaciņu metode vienmēr tiek uzlabota un papildināta, kas ir šīs metodes pozitīvais aspekts. Ja pareizi izaudzēt donoraugus, darba gaitā ievērot sterilitāti un nodrošināt optimālos kultivēšanas apstākļus, var iegūt pietiekami ticamus rezultātus.

Iespējamie darba trūkumi – nepietiekams izejas materiāla apjoms, kā rezultātā bija nepietiekams iegūto augu-reģenerantu skaits, lai varētu izdarīt pārliecinošus secinājumus par noteiktām likumsakarībām. Arī putekšņmaciņu ievākšanai labāk izmantot mikroskopēšanas metodi, lai noteiktu, kādā stadijā ir putekšņi, nevis novērtēt stadiju vizuāli. Ir nepieciešams uzlabot hromosomu skaitīšanas metodi ploīditātes noteikšanai, lai padarītu to piemērotāku tieši vasaras kviešu paraugiem, jo aprakstītā metodika ir ļoti atkarīga no sakņu cietības.

Iegūtie rezultāti parāda, ka izmantojot starpsugu hibrīdus kā donoraugus putekšņmaciņu kultūras izveidošanai un dubultoto haploīdu iegūšanai, ir iespējams iegūt pietiekami ģenētiski stabilus zaļos augus-reģenerantus (DH līnijas) ar augstu pašploīdizācijas spēju, lai izmantotu tos jaunu kviešu šķirņu izveidei.

5. SECINĀJUMI

1. Genotips ir galvenais androģenēzi limitējošais faktors, iegūstot kviešu zaļos augus-reģenerantus no starpsugu (*Triticum durum* x *Triticum aestivum*) hibrīdiem.
2. Kviešu starpsugu hibrīds ar genotipu 21KD-11 (DC 753-8/12 / Bezenčukskaja) ir potenciāli izdevīgs zaļo augu-reģenerantu un dubultoto haploīdu iegūšanai.
3. Izmantojot plūsmas citometriju, ir iespējams ātri un precīzi noteikt vasaras kviešu hibrīdu (*Triticum durum* x *Triticum aestivum*) un dubultoto haploīdu līniju ploīditāti.
4. Visi darbā izmantotie vasaras kviešu hibrīdi un no tiem iegūtajās dubultoto haploīdu līnijas ir miksoploīdas.
5. Izmantojot uz retrotranspozoniem balstīto iPBS metodi, ir iespējams noteikt polimorfismu ar putekšņmaciņu metodi iegūtajās dubultoto haploīdu līnijās.
6. Pielietojot putekšņmaciņu kultūru, ir iespējams iegūt ģenētiski stabilas dubultoto haploīdu līnijas jaunu kviešu šķirņu izveidei.

PATEICĪBAS

Liels paldies Latvijas Universitātes Bioloģijas institūta Vides ģenētikas laboratorijas kolektīvam par iespēju izstrādāt bakalaura darbu. Īpaši paldies darba vadītājai Dacei Graudai par uzņemšanu kolektīvā, konsultācijām un vērtīgajiem padomiem. Paldies darba konsultantei Andrai Miķeļsonei par padomiem bakalaura darba rakstīšanā un palīdzību metodes izstrādāšanā un ikdienas darbā. Liels paldies Latvijas Biozinātņu un tehnoloģiju universitātes Agroresursu un ekonomikas institūtam par piedāvātajiem materiāliem bakalaura darba izstrādei.

LITERATŪRAS SARAKSTS

1. Anonīms 2022. Kviešu iedalījums. <https://www.yara.lv/augu-meslosana/kviesi/galvenie-fakti-par-kviesu-audzesanu/kvieu-iedaljums/> Skatīts 20.04.2022.
2. Barnabas B. 2003. Protocol for producing doubled haploid plants from anther culture of wheat (*Triticum aestivum* L.) – In: Maluszynski M., Kasha K.J., Forster B.P., Szarejko I. (eds.), Doubled haploid production in crop plants. A manual. The Netherlands. Kluwer Academic Publishers: 65-70.
3. Bohanec B. 2003. Ploidy determination using flow cytometry. – In: Maluszynski M., Kasha K.J., Forster B.P., Szarejko I. (eds.), Doubled haploid production in crop plants. A manual. The Netherlands. Kluwer Academic Publishers: 397-403.
4. Diaz M., Herrero M., Garcia L.A., Quiros C. 2010. Application of flow cytometry to industrial microbial bioprocesses. Biochemical engineering journal. Volume 48(3): 385-407.
5. Durante M., Lenucci M.S., Rescio L., Mita G., Caretto S. 2012. Durum wheat by-products as natural sources of valuable nutrients. Phytochemistry Reviews. Volume 11: 255–262.
6. El-Hennawy M.A., Abdalla A.F., Shafey S.A., Al-Ashkar I.M. 2011. Production of doubled haploid wheat lines (*Triticum aestivum* L.) using anther culture technique. Annals of agricultural sciences. Volume 56, 2: 63-72.
7. Ferreira M.d.S., Rocha A.d.J., Nascimento F.d.S., Oliveira W.D.d.S., Soares J.M.d.S., Reboucas T.A., Morais Lino L.S., Haddad F., Ferreira C.F., Santos-Serejo J.A.d., Fernandez J.S., Amorim E.P. 2023. The role of somaclonal variation in plant genetic improvement: a systematic review. Agronomy. 13(3):730.
8. Flood R.G. and Halloran G.M. 1986. Genetics and physiology of vernalization response in wheat. Advances in agronomy. Volume 39: 87-125.
9. Gill B.S., Appels R., Botha-Oberholster A.M., Buell C.R., Bennetzen J.L., Chalhoub B., Chumley F., Dvorak J., Iwanaga M., Keller B., Li W., McCombie W.R., Ogihara Y., Quetier F., Sasaki T. 2004. A workshop report on wheat genome sequencing: international genome research on wheat consortium. Genetics. Volume 168(2): 1087–1096.
10. Grauda D., Žagata K., Lanka G., Strazdina V., Fetere V., Lisina N., Krasnevska N., Fokina O., Mikelsons A., Ornicans R., Belogradova I., Rashal I. 2016. Genetic diversity of wheat (*Triticum aestivum* L.) plants-regenerants produced by anther culture. Vavilov journal of genetics and breeding. 20(4):537-544.

11. Guha S. and Maheshwari S.C. 1964. *In vitro* production of embryos from anthers of *Datura*. Nature. 204: 497.
12. Jain S.M., Brar D.S., Ahloowalia B.S. 1998. Somaclonal variation in crop improvement. Current plant science and biotechnology in agriculture. Springer Netherlands. 32: 203-204.
13. Jacquard C., Nolin F., Hecart C., Grauda D., Rashal I., Dhondt-Cordelier S., Sangwan R.S., Devaux P., Mazeyrat-Gourbeyre F., Clement C. 2009. Microspore embryogenesis and programmed cell death in barley: effects of copper on albinism in recalcitrant cultivars. Plant cell rep. 28:1329–1339.
14. Kalendar R., Antonius K., Smykal P., Schulman A.H. 2010. iPBS: a universal method for DNA fingerprinting and retrotransposon isolation. Theoretical and applied genetics. 121: 1419–1430.
15. Kalendar R.N., Aizharkyn K.S., Khapilina O.N., Amenov A.A., Tagimanova D.S. 2017. Plant diversity and transcriptional variability assessed by retrotransposon-based molecular markers. Vavilov journal of genetics and breeding. 21(1):128-134.
16. Kraitshtein Z., Yaakov B., Khasdan V., Kashkush K. 2010. Genetic and epigenetic dynamics of a retrotransposon after allopolyploidization of wheat. Genetics.186(3):801-812.
17. Li S.-F., Su T., Cheng G.-Q., Wang B.-X., Li X., Deng C.-L., Gao W.-J. 2017. Chromosome evolution in connection with repetitive sequences and epigenetics in plants. Genes. 8(10):290.
18. Liu C.Y., Shepherd K.W., Rathjen A.J. 1996. Improvement of durum wheat pastamaking and breadmaking qualities. Review. Cereal chemistry. 73(2):155-166.
19. Logue S.J. 1996. Genetic stability in microspore-derived doubled haploids. – In: Jain S.M., Sopory S.K., Veilleux R.E. (eds.), *In vitro* haploid production in higher plants. Volume 2. The Netherlands. Kluwer Academic Publishers: 1-51.
20. Maluszynski M., Szarejko I., Sigurbjornsson B. 1996. Haploidy and mutation techniques. – In: Jain S.M., Sopory S.K., Veilleux R.E. (eds.), *In vitro* haploid production in higher plants. Volume 1. The Netherlands. Kluwer Academic Publishers: 67-93.
21. McKinnon K.M. 2018. Flow cytometry: an overview. Current protocols in immunology. 120:5.1.1-5.1.11.
22. Otto S.P. 2007. The evolutionary consequences of polyploidy. Cell. Volume 131(3): 452-462.
23. Rebāne A., Grauda D., Rancāne S., Jansons A., Rashal I. 2020. Use of Flow Cytometry for Producing Tetraploids in Red Clover. Proceedings of the Latvian Academy of Sciences. Section B. Natural, Exact, and Applied Sciences. 74: 344-346.

24. Rieseberg L.H. and Carney S.E. 1998. Tansley Review No. 102. Plant hybridization. Dept of biology, Indiana University, Bloomington, USA. *New phytologist*. 140: 599-624.
25. Sall A.T., Chiari T., Legesse W., Ahmed S., Ortiz R., van Ginkel M., Bassi F.M. 2019. Durum wheat (*Triticum durum* Desf.) origin, cultivation, and 2 potential expansion in sub-Saharan Africa. *Agronomy*. 9: 263.
26. Shapiro H. 2010. A history of flow cytometry and sorting. – In: Kim J.S. and Ligler F.S. (eds.), *The microflow cytometer*. Jenny Stanford publishing. 1st edition: 1-24.
27. Sopory S.K. and Munshi M. 1996. Anther culture. – In: Jain S.M., Sopory S.K., Veilleux R.E. (eds.), *In vitro* haploid production in higher plants. Volume 1. The Netherlands. Kluwer Academic Publishers: 145-176.
28. Soriano M., Cistue L., Valles M.P., Castillo A.M. 2007. Effects of colchicine on anther and microspore culture of bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 91: 225–234.
29. Strazdiņa, V. 2012. Development of new winter and spring wheat varieties in Latvia. *Proceedings of the Latvian Academy of Sciences. Section B. Natural, Exact, and Applied Sciences*: 66(1-2) 48-53.
30. Švarta A., Vigovskis J., Liniņa A., Katamadze M., Sarkanbārde D., Stanka T. 2020. Minerālmēsļu efektivitāte vasaras kviešiem atkarībā no dažādiem mēslošanas plāniem. LLU Zemkopības institūts. Zinātniski praktiskā konference ‘Līdzsvarota lauksaimniecība’: 21-25.
31. Valsts augu aizsardzības dienests. Latvijas augu šķirņu katalogs. <http://registri.vaad.gov.lv/reg/skirnes.aspx> Skatīts 04.05.2022.
32. Vasil I.K. and Vasil V. 1999. Transgenic cereals: *Triticum aestivum* (wheat). – In: Vasil I.K. (ed.), *Molecular improvement of cereal crops*. Printed in Great Britain. Kluwer Academic Publishers: 133-147.
33. Wang H.Y., Liu D.C., Yan Z.H., Wei Y.M., Zheng Y.L. 2005. Cytological characteristics of F2 hybrids between *Triticum aestivum* L. and *T. durum* Desf. with reference to wheat breeding. *Applied Genetics* 46. 4:365-369.
34. Yan W., Jin X., Jiang B., Qi X., Chen Y., Li X., Liu X., Ren Y., Cui L., Song Q., Li H., Friebe B., Li J., Zhang Y. 2020. Development and molecular cytogenetic characterization of cold-hardy perennial wheatgrass adapted to Northeastern China. *Frontiers in Plant Science*. 11:582.
35. Zariņa L. 2011. Priekuļu pētniecības centra vēsture. <https://www.arei.lv/lv/priekulu-petniecibas-centra-vesture> Skatīts 28.04.2022.

36. Zadiņš A., Strazdiņa V., Fetere V., Maļeckā S., Damškalne M. 2017. Vasaras cieto kviešu (*Triticum durum* Desf.) šķirņu izvērtējums Ziemeļkurzemē. Evaluation of spring wheat (*Triticum durum* Desf.) varieties in North-Western region of Latvia. Ražas svētki 'Vecauce – 2017': Lauksaimniecības zinātne Latvijas simtgades gaidās, 93 lpp.
37. Zheng M.Y. 2003. Microspore culture in wheat (*Triticum aestivum*) – doubled haploid production via induced embryogenesis. Plant cell, tissue and organ culture. 73: 213-230.
38. Žagata K. 2013. Ģenētiskās izmaiņas ziemas kviešu putekšņu maciņu kultūrās. Maģistra darbs. Rīga, Latvijas Universitāte, 51.lpp.
39. Бабаева К.Э. 2017. Межвидовая гибридизация пшеницы и её роль в селекции. Азербайджан, Гянджа, Азербайджанский Государственный Аграрный Университет. Agriculture. Volume 1. 9(18): 36-38.
40. Гончаров Н.П. и Кондратенко Е.Я. 2008. Происхождение, доместикация и эволюция пшениц. Вестник ВОГиС, Том 12, № ½: 159-176.
41. Дубровная О.В. 2017. Селекция *in vitro* пшеницы на устойчивость к абиотическим стрессовым факторам. Физиология растений и генетика. 49:279-292.
42. Кунах В.А. 1980. Геномная изменчивость соматических клеток растений и факторы, регулирующие этот процесс. Цитология и генетика. Том 14, №1: 73-81.
43. Першина Л.А., Осадчая Т.С., Бадаева Е.Д., Белан И.А., Россеева Л.П. 2013. Изучение особенностей андрогенеза в культуре пыльников сортов и перспективной формы яровой мягкой пшеницы западносибирской селекции, различающихся наличием или отсутствием пшенично-чужеродных транслокаций. Вавиловский журнал генетики и селекции. 17:40-49.

PIELIKUMI

Indukcijas barotnes AMC+Cu un reģenerācijas barotnes 190-2 sastāvs
 Induction medium AMC + Cu and regeneration medium 190-2 content

	Reaģents	Koncentrācija mg/l	
		<u>AMC+Cu</u>	<u>190-2</u>
<i>Makroelementi</i>	KNO ₃	1000	1000
	(NH ₄) ₂ SO ₄	100	200
	MgSO ₄ *7H ₂ O	125	200
	Ca(NO ₃) ₂ *4H ₂ O	100	100
	KH ₂ PO ₄	200	300
	KCl	35	40
	KI	0,8	0,5
	H ₃ BO ₃	1,6	3
	<i>Mikroelementi</i>	MnSO ₄ *1H ₂ O	3,3
ZnSO ₄ *7H ₂ O		1,5	3
CuSO ₄ *5H ₂ O		2,5	0,5
<i>Dzelzs avots</i>	FeSO ₄ *7H ₂ O	27,8	27,8
	Na ₂ EDTA	37,3	37,3
<i>Vitamīni</i>	tiamīna HCl	-	1
	piridoksīna HCl	-	0,5
	nikotīnskābe	-	0,5
	mioinozitols	-	100
<i>Citi komponenti</i>	2,4-D	1,5	-
	L glutamīns	1000	-
	L serīns	100	-
	kinefīns	0,5	0,5
	glicīns	-	2
	NAA	-	0,5
	saharoze	-	30000
	Plant agar	-	6000
	<i>pH</i>	5,8	5,8

Informācija par darbā izmantotajiem reaģentiem

Information about reagents used in this work

Reaģenti	Reaģenta sastāvs	Ražotājs	Ražotāja valsts
KNO ₃	>99% potassium nitrate	Duchefa biochemie B.V.	Nīderlande
(NH ₄) ₂ SO ₄	>99,5% ammonium sulphate	Carl Roth GmbH & Co. Kg	Vācija
MgSO ₄ *7H ₂ O	>98% magnesium sulphate 7-hydrate	Carl Roth GmbH & Co. Kg	Vācija
Ca(NO ₃) ₂ *4H ₂ O	>99% calcium nitrate 4-hydrate	Carl Roth GmbH & Co. Kg	Vācija
KH ₂ PO ₄	>99% di-potassium hydrogen phosphate	Carl Roth GmbH & Co. Kg	Vācija
KCl	>99,5% potassium chloride	Carl Roth GmbH & Co. Kg	Vācija
KI	>99% potassium iodide	Duchefa biochemie B.V.	Nīderlande
H ₃ BO ₃	>99,8% boric acid	Carl Roth GmbH & Co. Kg	Vācija
MnSO ₄ *1H ₂ O	>98% manganese(II)-sulfate monohydrate	Carl Roth GmbH & Co. Kg	Vācija
ZnSO ₄ *7H ₂ O	>99,5% zinc II sulphate 7-hydrate	Carl Roth GmbH & Co. Kg	Vācija
CuSO ₄ *5H ₂ O	>99,5% zopper II sulphate 5-hydrate	Carl Roth GmbH & Co. Kg	Vācija
FeSO ₄ *7H ₂ O	>99% iron II sulphate 7-hydrate	Carl Roth GmbH & Co. Kg	Vācija
Na ₂ EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid Tetrasodium salt, Dihydrate H ₂ O content 8,7%	Sigma-Aldrich	Vācija
tiamīna HCl	Thiamine hydrochloride 98,5-101,5%	Acros Organics B.V.B.A.	Beļģija
piridoksīna HCl	Pyridoxine hydrochloride 99,0-101,0%	Acros Organics B.V.B.A.	Beļģija
nikotīnskābe	>99,5% nicotinic acid	Carl Roth GmbH & Co. Kg	Vācija
mioinozitols	1,2,3,5/4,6-hexahydroxycyclohexane; meso-Inositol; i-Inositol	Sigma-Aldrich	Ķīna
2,4-D	2,4-dichlorophenoxyacetic acid, minimum 98%	Sigma-Aldrich	Vācija
L glutamīns	>99% L-Glutamine	Duchefa biochemie B.V.	Nīderlande
L serīns	>98,5% L-Serine	Carl Roth GmbH & Co. Kg	Vācija

Informācija par darbā izmantotajiem reaģentiem

Information about reagents used in this work

Reaģenti	Reaģenta sastāvs	Ražotājs	Ražotāja valsts
kinetīns	Kinetin solution 6-Furfurylaminopurone, N6-Furfuryladenine. Conc.: 1mg/ml	Sigma-Aldrich	Lielbritānija
glicīns	>98,5% glycine	Carl Roth GmbH & Co. Kg	Vācija
NAA	1-naphthylacetic acid Conc.: 1mg/ml	Sigma-Aldrich	Lielbritānija
Tween 80	Polyethylene glycol sorbitan monooleate	Sigma-Aldrich	Vācija
Ace classic	Aqua, Sodium Hypochlorite, Sodium Hydroxide, Sodium Carbonate, hybrid co-polymer of maltodextrin and acrylates	Fater Central Europe SRL	Rumānija
saharoze	α -D-glucopyranosyl β -D-fructofuranoside	Sigma-Aldrich	ASV
agars	Plant agar Gel strenght: >1100 g/cm ²	Duchefa biochemie B.V.	Nīderlande
kālija permanganāts	100% potassium permanganate	AS "Rīgas farmaceitiskā fabrika"	Latvija
karmīns	100% carmine	-	-
TopVision agaroze	100% agarose	Thermo Fisher Scientific	Lietuva
Tris bāze	2-amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol	Sigma-Aldrich	ASV
SDS (Sodium dodecyl sulfate)	>98,5% sodium dodecyl sulfate	Sigma-Aldrich	Lielbritānija
EDTA	>99,0% ethylenediamine tetraacetic acid	Carl Roth GmbH & Co. Kg	Vācija
C ₂ H ₃ KO ₂	>99,0% potassium acetate	Sigma-Aldrich	ASV
NaCl	>99,5% sodium chloride	Sigma-Aldrich	ASV
ledus etiķskābe	99,8-100,5% acetic acid	Sigma-Aldrich	ASV
Etīdija bromīds	1% 3,8-diamino-5-ethyl-6-phenylphenanthridinium bromide	Carl Roth GmbH & Co. Kg	Vācija
izopropanols	70% isopropanol	Sigma	Vācija
etanols	96% ethanol	SIA Kalsnavas Elevators	Latvija
HCl	37% hydrochloric acid	Sigma-Aldrich	ASV
Molekulārais ūdens	H ₂ O	Sigma	Vācija

Informācija par darbā izmantotajiem reaģentiem

Information about reagents used in this work

Reaģenti	Reaģenta sastāvs	Ražotājs	Ražotāja valsts
Ribonukleāze A	10 mg/mL Rnase	Thermo Fisher Scientific	Lietuva
CyStain UV Ploidy	Staining solution	Sysmex	Vācija
Rainbow Calibr Particles, 8 peaks, 3.0-3.4 μm	Rainbow Calibration Particles are in deionized water with 0.02% sodium azide and 0.01% NP-40. 10 ⁷ particles per ml.	BioLegend	ASV
10xDreamTaq green buffer	Nonidet P40 Ethylphenolpoly(ethyleneglycolether), Polyethylene glycol, Sucrose, includes 20 mM MgCl ₂	Thermo Fisher Scientific	Lietuva
dNTP mix	>99% dNTPs	Thermo Fisher Scientific	Lietuva
iPBS praimeru	-	Thermo Fisher Scientific	Lietuva
DreamTaq HS DNS polimerāze	40 μL DreamTaq Hot Start DNA Polymerase (5 U/μL) 1.25 mL 10X DreamTaq Buffer (includes 20 mM MgCl ₂)	Thermo Fisher Scientific	Lietuva
6x DNA loading Dye Buffer Double Blue	bromophenol blue, xylene cyanol FF	Thermo Fisher Scientific	Lietuva
1 kb DNA Ladder Ready to Load	Xylene Cyanol FF, Bromophenol Blue, Orange G Size range: 250 bp to 10000 bp	Thermo Fisher Scientific	Lietuva

PCR amplifikācijas apstākļi
PCR amplification conditions

Process	Temperatūra, °C	Ilgums, min	
Sākotnējā denaturācija	95	3	
Denaturācija	95	35 cikli	0,33
Praimeru pievienošanās	51		1
Elongācija	68		1
Beigu elongācija	72	10	
Uzglabāšana	4	∞	

4.pielikums

TAE buferšķīduma sastāvs

TAE buffer solution

Reāģenti	50x TAE	1x TAE
Tris bāze	2 M 242,2 g/L	40 mM 4,844 g/L
Ledus etiķskābe	1 M 57,1 ml/L	20 mM 1,21 ml/L
EDTA (Etilēndiamīntetraetiķskābe)	50 mM 18,612 g/L	1 mM 0,372 g/L
Molekulārs ūdens	-	-

Agarozes gēla pagatavošanas proporcijas.

Agarose gel preparation proportions.

Gēla izmērs, cm	1xTAE buferšķīduma tilpums, ml	Agarozes daudzums, g				Kabatiņu skaits
		1%	1,5%	1,7%	3%	
10x7	50	0,5	0,75	0,85	1,5	16
10x10	70	0,7	1,05	1,19	2,1	16x2
15x7	70	0,7	1,05	1,19	2,1	20
15x10	90	0,9	1,35	1,53	2,7	20; 20x2
15x15	135	1,35	2,025	2,295	4,05	20x2; 30x2
20x10	120	1,2	1,8	2,04	3,6	20; 25; 30; 36; 40; 50
20x20	240	2,4	3,6	4,08	7,2	20; 25; 30; 36; 40; 50

Bakalaura darbs „Vasaras kviešu hibrīdu (*Triticum durum* x *Triticum aestivum*) gametisko šūnu *in vitro* kultūru izveidošana un dubultoto haploīdu iegūšana un analīze” izstrādāts LU Bioloģijas fakultātē.

Ar savu parakstu apliecinu, ka pētījums veikts patstāvīgi, izmantoti tikai tajā norādītie informācijas avoti un LUISā iesniegtā darba elektroniskā kopija atbilst izdrukai un/vai e-studijās iesniegtai darba elektroniskai versijai.

Autore: Jana Kiseļova

paraksts

23.05.2023.

Rekomendēju darbu aizstāvēšanai

Vadītāja: Dr.biol., asoc. prof. Dace Grauda

paraksts

23.05.2023.

Recenzents:

paraksts

Mg.biol. Kārlis Žagata

Darbs iesniegts LU Bioloģijas fakultātē 23.05.2023.

Studiju metodiķe: *paraksts*

Darbs aizstāvēts Bioloģijas bakalaura gala pārbaudījuma komisijas sēdē

prot. Nr. _____, vērtējums

Komisijas sekretārs/e: