

ПРАКТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ АНДРОГЕНЕЗА IN VITRO
ОЗИМОЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ

Н.В. ЛАВРОВА

(Кафедра хранения, переработки
и товароведения продукции растениеводства)

Приводятся практические основы культивирования генеративных структур озимой мягкой пшеницы, а именно изолированных пыльников и микроспор в культуре *in vitro*, разработаны вопросы эмбриодогении, указаны возможные принципы разработанных автором методических подходов получения гаплоидов. Акцент делается на выявление критической стадии развития пыльника озимой пшеницы, являющейся оптимальной для переключения программы развития с гаметофитной на спорофитную и получение гаплоидных растений-регенерантов мягкой озимой пшеницы посредством различных путей морфогенеза (эмбриодогенез, гемморизогенез и др.); приводятся составы синтетических питательных сред, индуцирующих эмбриодогенез и регенерацию в культуре микроспор *in vitro*. Внимание уделяется также изложению перспектив использования гаплоидии в селекционных целях.

Важнейшей задачей селекции по-прежнему остается сокращение сроков создания новых сортов. Создание сортов озимой пшеницы традиционными методами требует длительного времени и огромных масштабов работы. Так, для получения одного районированного сорта озимой пшеницы необходимо проработать сотни гибридных комбинаций и изучить десятки тысяч селекционных номеров, что требует от селекционера обычно не менее 10 лет работы [5]. Внедрение новых клеточных технологий в сочетании с методами классической генетики и селекции открывает большие перспективы как для использования, так и для решения фундаментальных проблем генетики, биотехнологии, физиологии и биохимии злаковых растений.

Из семейства Мятликовые (*Poaceae*) в структуре зерновых площадей России наиболее распространена мягкая пшеница (*Triticum L.*). Большой теоретический и практический интерес для селекции этой культуры представ-

ляет использование гаплоидии. Гаплоиды используются для получения стабильных гомозиготных линий. В традиционной селекции гомозиготность может быть достигнута с помощью нескольких схем инбридинга, однако по времени этот процесс достаточно длительный. Самым быстрым путем к достижению гомозиготности является удвоенная гаплоидия, и поэтому гаплоиды очень привлекательны для многих ученых и селекционеров. Быстрое достижение гомозиготных линий особенно важно при работе с озимыми культурами. Применение гаплоидной биотехнологии в селекции пшеницы, особенно озимого типа, позволяет быстрее найти нужную комбинацию скрещивания и сократить время на создание сортов до 1~2 лет [1].

Для получения гаплоидов методами биотехнологии в культуре *in vitro* злаковых применяют несколько методов: метод селективной элиминации хромосом в гибридном зародыше с последующей эмбриокультурой [6], культиви-

рование неоплодотворенных завязей и семяпочек [7], культивирование изолированных пыльников и микроспор [1, 8].

Наиболее интересны в этой связи методы культивирования изолированных пыльников и микроспор, основанные на использовании явления андрогенеза *in vitro*. Андрогенез в системе *in vitro* рассматривается как особый метод размножения растений, позволяющий ускоренно получать полностью гомозиготные растения-регенеранты при гомозиготизации гаплоидных растений, выращенных из микроспор гибридных форм в культуре изолированных пыльников. Несмотря на перспективы метода культивирования изолированных пыльников и микроспор, использование его на злаковых культурах все еще ограничено. Это связано с тем, что до настоящего времени не разработана эффективная система получения гаплоидов при культивировании пыльников различных генотипов зерновых культур, особенно мягкой пшеницы с озимым типом развития.

Целью нашей работы было разработать систему получения гаплоидов с помощью культуры изолированных микроспор для ряда сортов озимой пшеницы селекции НИИСХ ЦРНЗ.

Объекты и методы исследований

Растительный материал. Растения-доноры 5 сортов озимой пшеницы: Немчиновская 24, Галина, Инна, Московская 39 и Памяти Федина выращивали в поле на экспериментальных делянках НИИСХ ЦРНЗ (Московская обл.). Коллекция изучаемых сортов озимой пшеницы в течение ряда лет исследовалась на скороспелость и приспособляемость к условиям Нечерноземной зоны России, а также на устойчивость к грибным болезням, продуктивность, качество зерна и наследование количества белка [3], т. е. оценивались те признаки, которые в условиях Центрального Нечерноземья являются лимитирующими и представляют интерес для селекции этой культуры.

Отбор колосьев. Колосья с сорто-доноров первоначально отбирали в различных фазах онтогенеза растений по морфологическим признакам: размеру и цвету пыльника, степени плотности чешуй колоса. В этом случае микроспоры в пыльниках находились на оптимальной для индукции андрогенеза *in vitro* стадии развития пшеницы — фазе сильновакуолизированной микроспоры. Необходимо отметить, что указанные морфологические критерии часто различаются в зависимости от сорта и климатических условий года выращивания растений, поэтому детально стадию развития микроспор в нашем эксперименте анализировали под микроскопом на давленных препаратах по методу З.П. Паушевой [4].

Холодовая предобработка. Из литературных источников [6] известно, что режимы Холодовой предобработки пыльцы способствуют возникновению меристематических очагов в каллусах и определяют дальнейший ход органогенеза в них на средах для регенерации растений. Колосья стерилизовали (вместе с листовой оберткой) раствором гипохлорита Na, отмывали в нескольких объемах стерильной дистиллированной воды, после чего у них удаляли ости и раскрывали колосковые чешуи. Стерильные колосья помещали на агаризованные питательные среды по прописи MS, не содержащие регуляторов роста, и выдерживали в холодильной камере при температуре 2-5°C в течение 4-17 сут. Выдерживание стерильных колосьев на питательной среде (а не в стерильной воде) полностью исключало затраты труда на подрезание подгнивающих стеблей и, как было доказано нами позднее [2], продлеvalo жизнеспособность и «готовность» микроспор к высипанию на поверхность жидкой индукционной среды, что полностью исключало их механическое выделение и травмирование.

Культура пыльников. После предобработок пониженными положительными температурами колосья дополнительно обрабатывали 70%-м этанолом.

Подбор условий стерилизации колосьев-доноров в нашем эксперименте позволил получить 97 — 100% неинфицированных эксплантов, что обеспечило возможность культивирования как пыльников, так и целых цветков *in vitro* на жидких и агаризованных питательных средах (рис. 1).



Рис. 1. Холодовая предобработка стерильных колосьев с пыльниками на агаризованной среде МС без регуляторов роста — эффект «голодания»

Извлечение цветков (вместе с пыльниками) проводили в стерильных условиях ламинарного бокса. Пыльники извлекали из нижних цветков средней части одного колоса глазами хирургическими иглами. В одну биологическую пробирку (или чашку Петри) помещали до 30 эксплантов, размещая их равномерно по всей поверхности среды. Штативы с пробирками и чашки Петри на 4—7-е сут помещали в темноту при температуре 32~33°C, затем культивирование продолжали при температуре 27°C до образования эмбрионов и каллусов.

Культура микроспор. В плавающих пыльниках, помещенных на жидкую среду, происходил спонтанный выход микроспор в среду для культивирования (рис. 2). Микроскопические исследования, проведенные нами, показали, что в первые дни культивирования стенки гнезда пыльника открываются из-за повышения тургора и старения эндотеция, что способствует

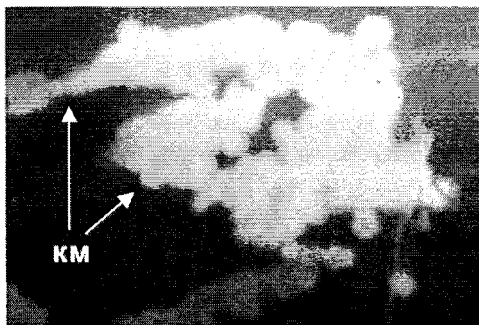
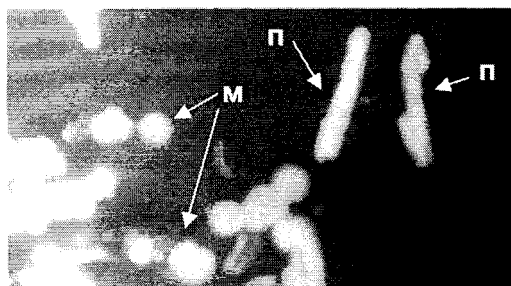


Рис. 2. Разрыв стенки пыльника и «самопроизвольный» выход микроспор из камер гнезда пыльника на индукционную среду (15-17-е сут культивирования): П — пыльник; М — микроспора; КМ — колония «самопроизвольно» вышедших на среду микроспор

«высыпанию» микроспор на поверхность питательной среды.

Образование эмбрионов. Андрогенные образования появлялись через 28-30 дней с момента инокуляции пыльников и имели сферическую форму (рис. 3).



Рис. 3. Образование первичной каллусной ткани сферического типа в культуре изолированных микроспор озимой мягкой пшеницы (30-е сут от начала культивирования)

Регенерация растений. Эмбриониды переносили на агаризованные среды для регенерации растений: Potato 11, Блейдса без 2,4-Д, содержащие половинную концентрацию макросолей и хелата железа. Далее эмбриониды культивировали при температуре 9—11°C, 16-часовом фотопериоде и освещенности 20 тыс. лк до образования растений-регенерантов. Развившиеся растения (гаплоиды) укореняли на жидкой среде до образования хорошей корневой системы. Расте-

ния-регенеранты, достигшие фазы 3 листьев, яровизировали в холодильной камере при температуре 2—4°C не менее 60 дней, затем колхичинировали по методу Енсена в течение 5 ч на свету в растворе, содержащем 0,2% колхичина и 0,03% папаина. Диплоидизированные растения-регенеранты озимой пшеницы высаживали в почву, а затем в условия подогреваемой теплицы НИИСХ ЦРНЗ для доращивания и получения колосьев (рис. 4).

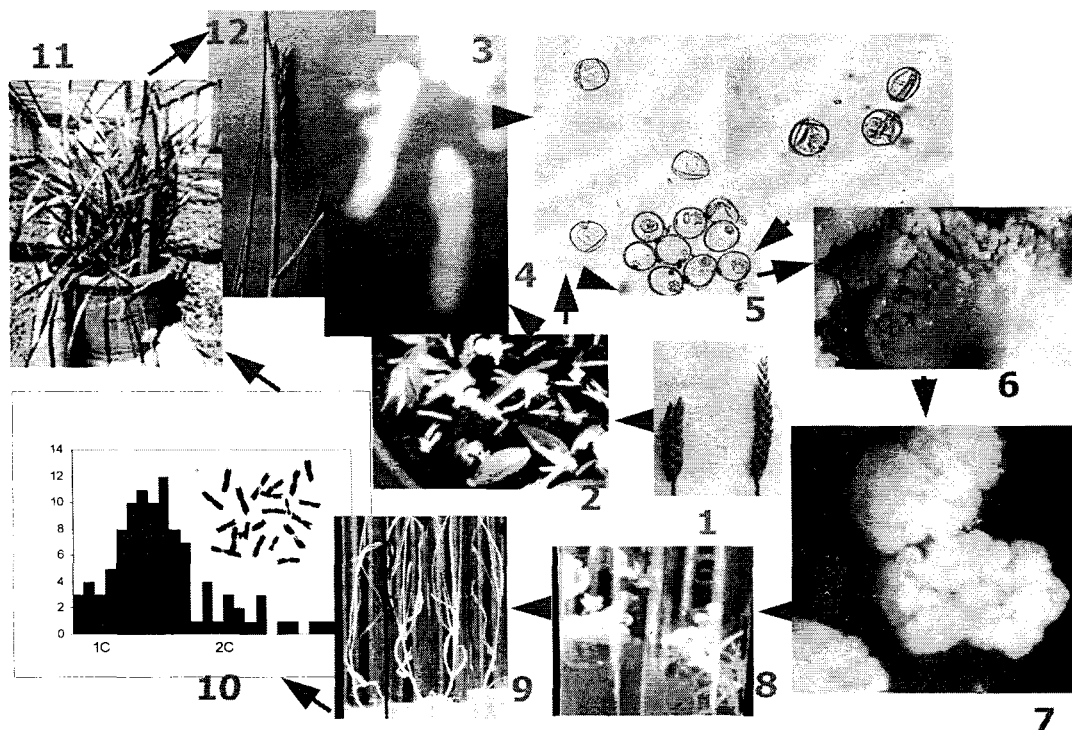


Рис. 4. Гаплоидная биотехнология создания форм озимой мягкой пшеницы:

1-й этап — полевой отбор колосьев остистых и безостистых сортов-доноров озимой пшеницы по комплексу морфологических признаков в фазу сильновакуолизированной микроспоры (1); подготовка колосьев к стерилизации (обрезка остей и колосковых чешуй); стерилизация цветков и/или выделение пыльников (2); 2-й этап — эксплантация цветков, пыльников и семян в жидкой индукционной среде: разрыв стенки пыльника и «самопроизвольный» выход микроспор в среду (3), оседание микроспор центрифугированием и определение стадии развития микроспор под микроскопом (4); 3-й этап — культивирование микроспор на средах для эмбриодогенеза до образования многоклеточных комплексов (5) и пыльников до образования каллусирующих гаплоидных структур сферического типа (6), последовательный отбор плотных эмбриоидоподобных структур и пересадка их на среды для регенерации; 4-й этап — органогенез в культуре андрогенной каллусной ткани и получение растений-регенерантов (8); 5-й этап — укоренение регенерантов *in vitro* (9); 6-й этап — цитологический и цитофотометрический контроль пloidности регенерантов (10) и яровизация андрогенных гаплоидов при температуре 2—4°C в течение 60 дней; 7-й этап — диплоидизация регенерантов колхичином, пересадка в почву и доращивание (в зависимости от сезона) в поле или в условиях подогреваемой теплицы (11) до получения колосьев (R0); (12) — R1 и R2 поколений; 8-й этап — размножение растений-регенерантов R1 и R2 поколений методами биотехнологии: андрогенез или эмбриокультура зародыша.

Результаты исследований

На примере культивирования изолированных пыльников и микроспор 5 сортов озимой пшеницы мы оценивали длительность воздействия низкими положительными температурами на колосья донорных растений и способ их стерилизации (подбор компонента стерилизации и его экспозиции). При этом учитывалось время, прошедшее от момента срезания колосьев до инокуляции пыльников на питательные среды (табл. 1).

В результате проведенных исследований было отмечено, что холодовая предобработка колосьев у всех изучаемых сортов озимой пшеницы не оказывала существенного влияния на выход новообразований (калусов и эмбриоидов), но сохраняла жизнеспособность микроспор в изолированной культуре от 2 недель до 3 мес в зависимости от генотипа. Мы считаем, что холодовое воздействие на экспланты перед инокуляцией их на питательные среды является для микроспор стрессовым фактором. Результаты проведенных нами экспериментов свидетельствуют, что деление ядер микроспор происходит только в тех из них, которые отрываются от орбикул и «выпадают» в полость гнезда пыльника, а те микроспоры, которые остаются прикрепленными к орбикулам и через них — к стенке гнезда пыльника, и микроспоры, находящиеся на средней фазе микроспоро-

генеза и прикрепленные к тапетуму, к делению не приступают.

Особенностью микроспорогенеза поздней сильновакуолизированной стадии развития является появление делящихся клеток, в основном двуядерных, с равными и неравными ядрами. Наши исследования убеждают в том, что холодовая предобработка колосьев растений-доноров озимой пшеницы напрямую не влияет на продуктивность эмбриоидогенеза *in vitro*, и ее назначение заключается только в том, чтобы направить развитие микроспоры по спорофитному пути развития. Та часть микроспор, у которых не наступила синтетическая фаза клеточного цикла перед первым митозом, и реализует программу спорофитного пути развития — равное деление (рис. 5).

У пыльников, микроспоры которых находятся на ранних фазах микрогаметогенеза, отсутствуют фиброзные утолщения, поэтому даже холодовая предобработка не приводит к делению таких микроспор. Они как бы «застывают» в своем развитии. Фенотипически эту фазу развития можно определить по соотношению растения между предпоследним листом и лигулой флагового листа. Если кончик колоса в трубке находится в середине вышеназванного состояния, то это соответствует ранней, невакуолизированной фазе микрогаметогенеза. Кроме того, в культуре «самопроизвольно» вышедших микроспор деление и развитие их на-

Таблица 1

Влияние продолжительности воздействия пониженной положительной температурой на частоту индукции андрогенеза *in vitro* у озимой мягкой пшеницы

Сорт	Продолжительность воздействия, сут									
	0		4		9		15		17	
	П, шт.	Н, шт./%	П, шт.	Н, шт./%	П, шт.	Н, шт./%	П, шт.	Н, шт./%	П, шт.	Н, шт./%
Немчиновская 24	500	60/12,0	500	59/11,8	500	58/11,6	500	55/11,0	500	42/8,4
Галина	500	35/7,0	500	29/5,8	500	27/5,4	500	21/4,2	500	18/3,6
Инна	500	75/15,0	500	60/12,0	500	53/10,6	500	47/9,4	500	40/8,0
Московская 39	500	115/23,0	500	102/20,4	500	100/20,0	500	82/16,4	500	82/16,4
Памяти Федины	500	50/10,0	500	49/9,8	500	50/10,0	500	37/7,4	500	29/5,8

Примечание. П — пыльников высажено; Н — новообразований получено.

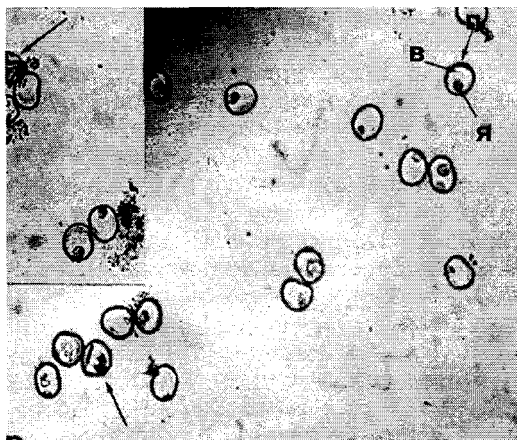


Рис. 5. Равное деление ядра микроспор озимой мягкой пшеницы: Я — ядро; В — вакуоль; П — пора

чинается еще до выхода их из полости камер пыльника. Это обусловлено новыми, подобранными нами условиями выдерживания стерильных колосьев-доноров на средах при низких положительных температурах, вызывающих низкотемпературный стрессовый шок для содержащихся внутри колосьев пыльников.

В экспериментах изучали также различные концентрации углеводов — глюкозы, сахарозы и мальтозы. Результаты исследований показали преимущество питательной среды, содержащей сахарозу или мальтозу в концентрации 0,26 М (табл. 2).

В научной литературе встречаются сообщения, что с помощью манипули-

Таблица 2

Влияние состава углеводов в питательной среде на продуктивность эмбриоидогенеза *in vitro*, %

Сорта	Глюкоза (0,26 М)	Глюкоза (0,52М)	Сахароза (0,26М)	Мальтоза (0,26М)	НСР ₀₅
Галина	1,7	0,5	20,3	19,7	0,13
Инна	1,3	0,3	18,3	26,2	0,82
Московская 29	1,7	0,4	29,5	23,3	0,79
Памяти Федина	1,2	0,5	5,9	7,8	0,2
Немчиновская 24	0,7	0,2	3,7	4,7	0,31

рования концентрациями сахарозы можно получать растения пшенично-пырейных гибридов, у которых листья имеют вид «зебры», т. е. идет чередование зеленых и белых полос [6].

Большинство исследователей придерживается мнения о том, что культивирование инокулированных на питательные среды пыльников необходимо проводить в темноте [2, 8]. Однако есть и другая точка зрения, согласно которой культивируемые пыльники нуждаются в ежедневном 16-часовом освещении. Проведенный нами анализ влияния света и его качества на продуктивность морфогенеза в культуре изолированных пыльников и микроспор озимой мягкой пшеницы показал, что **при культивировании на свету** большинство микроспор не приступает к равному спорофитному делению, а продолжает выполнение гаметофитной

программы развития, что выражается также в прорастании пыльцевых трубок у микроспор и образовании спермиев. В результате такого неравного митоза появляется множество 3-клеточных пыльцевых зерен, а случаи, когда образуются многоклеточные образования или эмбриониды — единичны (0,04% от общего числа культивируемых пыльников). Поэтому пыльники и микроспоры всех исследуемых сортов озимой мягкой пшеницы до образования эмбрионидов культивировали в темноте.

Заключение

В результате проведенных исследований показано, что выдерживание стерильных колосьев озимой пшеницы в культуре *in vitro* на агаризованных питательных средах при низких положительных температурах (2~4°C) способ-

ствуется сохранению жизнеспособности микроспор до 3 мес и более. Частота формирования андроклиновых структур в культуре *in vitro* зависит от комплекса взаимосвязанных факторов: условий стерилизации донорных растений, предобработки низкими положительными температурами и выдерживания на средах МС без регуляторов роста, а также от стадии развития микроспор и состояния стенок гнезда пыльника в момент инокуляции микроспор на индукционные среды.

В культуре изолированных пыльников и микроспор озимой мягкой пшеницы на индукционных средах с кетонами в концентрации не менее 0,26 М образуются эмбриоиды, морфогенные и неморфогенные каллусы нового типа, отличающиеся по морфологическим свойствам, и имеющие сферическое строение.

ЛИТЕРАТУРА

1. **Лаерова Н.В.** Технологические аспекты создания андрогенных гаплоидов озимой мягкой пшеницы. Монография. М.: ФГОУ ВПО РГАУ - МСХА имени К.А. Тимирязева, 2006. — 2. **Лаерова Н.В.** Разработка биотехнологии получения гаплоидных растений озимой пшеницы (Triticum aestivum L.) // Третий Московский Международный Конгресс: «Биотехнология: состояние и перспективы развития», 14—18 марта 2005. С. 264-265. — 3. **Марченкова Л.А., Сандухадзе Б.И., Чавдарь Р.Ф.** Источники устойчивости к мучнистой росе для селекции озимой пшеницы. Принципы и методы селекции и семеноводства зерновых и зернобобовых культур в Нечерноземье // Сб. 25 лет Московскому селекцентру. М., 1996. С. 81-90. — 4. **Паушева З.П.** Практикум по цитологии растений. М.: Колос, 1988. С.66-102. — 5. **Сандухадзе Б.И., Рыбакова М.И., Морозова З.А.** Научные основы селекции озимой пшеницы в Нечерноземной зоне России. М.: МГИУ, 2003 — 6. **Чистякова В.Н.** Гаплоиды неполных пшенично-пырейных амфидиплоидов, мягкой пшеницы и ячменя: получение и использование. М.: МАКС-Пресс, 2000. — 7. **Чистякова В.Н., Неттевич Э.Д., Гуляев Г.В.** Возможности генотипа в повышении эффективности метода *Bulbosum*. Генетика, 1994. Т. 30. — 8. **Эльконин Л.А.** Морфогенез и стабильная регенерация растений в каллусных культурах // Ботанич. журнал, 1989. № 74.

SUMMARY

Practical generative structures of soft winter wheat cultivation basis is given in the article, isolated anthers and microspores in the cultivar *in vitro*. Revealing critical stage of winter wheat anther development is focused on, being optimum for switching development programme from gametophyte to sporophyte to obtain haploid regenerative plants of soft winter wheat by means of various ways of morphogenesis, embryogenesis, hemmoryzogenesis etc. Perspectives of haploidization use in selection are also shown in the article.