

**КРУГЛОВА Н.Н., СЕЛЬДИМИРОВА О.А., КАТАСОНОВА А.А.,  
ЗАЙЦЕВ Д.Ю., КРУГЛОВА А.Е.**

*Институт биологии Уфимского НЦ РАН,  
Россия, 450054, Уфа, пр. Октября, 69, e-mail: [Kruglova@anrb.ru](mailto:Kruglova@anrb.ru)*

## **БИОТЕХНОЛОГИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ АНДРОКЛИННОЙ ГАПЛОИДИИ ЯРОВОЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ *IN VITRO* НА ОСНОВЕ КОМПЛЕКСА ЦИТОЭМБРИОЛОГИЧЕСКИХ И ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ДАННЫХ**

Пыльник представляет собой фертильную часть тычинки, в гнездах которого клетки спорогенной ткани формируют микроспороциты, которые претерпевают мейотические деления и дают начало гаплоидным микроспорам. Микроспоры прорастают в пыльцевые зерна – мужские гаметофиты [Банникова, Хведынич, 1982]. Однако в строго определенных контролируемых условиях культуры *in vitro*, как правило, под действием стрессовых факторов можно изменить программу развития гаплоидной микроспоры на путь формирования гаплоидного растения-спорофита. Это процесс получил название «андроклиния» (от греч. *ανδρος* – мужской, *κλίνοσ* – имеющий склонность) [Хохлов, 1976; Круглова, 2001; Круглова с соавт., 2005; Батыгина с соавт., 2008]. В западной литературе широко распространен термин «андрогенез *in vitro*» [Androgenesis and haploid plants, 1998; и др.]. Таким образом, суть феномена андроклинии состоит в переключении программы развития морфогенетически компетентной гаплоидной клетки-микроспоры с обычного гаметофитного пути (образование пыльцевого зерна) на иной путь – спорофитный (образование гаплоидного растения) в условиях культуры *in vitro*. Полученные гаплоидные растения представляют собой клоны, сохраняющие генотип исходных хозяйственно ценных донорных растений. Основное преимущество их использования состоит в возможности быстрого получения гомозиготных линий, что облегчает селекцию фенотипов по качественным и количественным признакам. Все это имеет, безусловно, большое значение в биотехнологических исследованиях яровой мягкой пшеницы – основного хлебного злака.

### **Материалы и методы**

Материалом для исследования послужили 7 сортов (Саратовская 55, Башкирская 24, Скала, Жница, Московская 35, Симбирка, Казахстанская 10) и гибридная линия Фотос яровой мягкой пшеницы. Данные сорта отобраны из 178 сортов яровой мягкой пшеницы, активно используемых в селекционных программах Башкирского НИИ СХ РАХН (г. Уфа). Критерием отбора послужила относительно высокая отзывчивость пыльников на условия культуры *in vitro* (более 10 % инокулированных пыльников формируют андроклинные структуры – эмбриониды и каллусы).

В работе использованы: метод культуры *in vitro* пыльников яровой мягкой пшеницы с учетом эмбриологических данных [Круглова, Батыгина, 2002], методы световой микроскопии [Круглова с соавт., 2008], метод иммунофлюоресцентного анализа растительных образцов [Кудоярова с соавт., 1986, 1989], метод иммунолокализации фитогормонов [Веселов с соавт., 1999]. Постоянные препараты окрашивали по методике тройного окрашивания [Камелина с соавт., 1992] и просматривали и документировали с применением цифрового микроскопа проходящего света серии Микровизор  $\mu$ Vizo-100. Статистическую обработку полученных результатов вели с применением программы Excel, учитывая основные статистические параметры.

### **Результаты и обсуждение**

Экспериментально выявлено, что инициальными клетками андроклинии у яровой мягкой пшеницы являются микроспоры в сильновакуолизированной фазе (по периодизации [Круглова, 1999]). Фенотипические признаки донорных растений яровой

мягкой пшеницы, содержащих пыльники с сильновакуолизированными микроспорами, таковы: кончик колоса, находящегося в листовой обертке, располагается строго на  $1/4$  расстояния от основания флагового листа до основания предпоследнего снизу листа (VII этап органогенеза, по [Куперман, 1977]). Такие фенотипические признаки служат морфологическими маркерами для экспресс-диагностики донорных растений и тем самым оптимизации биотехнологии получения гаплоидов. В результате экспериментальных исследований установлено, что индукции андроклинии способствует стрессовое воздействие холодом в эмпирически выявленном режиме ( $+4^{\circ}\text{C}$ , 7 сут) на пыльники перед их размещением на индукционную питательную среду *in vitro*.

После холодной предобработки пыльники инокулировали в условия *in vitro* на индукционную питательную среду Potato II [Chuang, Ouyang, 1978], а затем на среду для регенерации [Blaydes, 1966], обе – в собственной модификации [Круглова, Батыгина, 2002]. Установлено, что в условиях культуры *in vitro* морфогенез сильновакуолизированных микроспор проходит различными путями (геммогенез, ризогенез, гемморизогенез, эмбриоидогенез). Сопоставление данных цитоэмбриологического анализа и иммуноферментного анализа позволило установить, что индукция конкретного пути морфогенеза *in vitro* сильновакуолизированных микроспор определяется балансом между концентрацией экзогенного ауксина 2,4-Д в модифицированной индукционной питательной среде Potato II и содержанием эндогенного ауксина ИУК в пыльнике в момент инокуляции. Для каждого сорта пшеницы баланс будет своим. Подбор такого баланса позволяет управлять процессом морфогенеза сильновакуолизированных микроспор в культуре *in vitro*, способствуя ускорению получения андроклиных растений яровой мягкой пшеницы при биотехнологических исследованиях.

Выявлено, что биотехнологически оптимальными путями морфогенеза, приводящими к образованию полноценных гаплоидных регенерантов (без процедуры многократных пересадок на питательные среды различного состава), в условиях выполненных экспериментов являются эмбриоидогенез и гемморизогенез.

Эмбриоидогенез состоит в формировании из сильновакуолизированной микроспоры эмбриоида (греч. εμβριον – зародыш, εἶδος – образ) – зародышеподобной структуры (синоним: соматический зародыш). Преимущество эмбриоидогенеза заключается в том, что по данным цитоэмбриологического анализа, единицей репродукции в данном случае является зачаток целого организма - зародышеподобная структура со всеми характерными для зародыша пшеницы органами. В случаях, когда цель конкретной технологии – получить растения-регенеранты, минимизировав соматическую изменчивость, одноклеточное происхождение эмбриоида из микроспоры (и тем самым сохранение генетической однородности) является основой для биотехнологически оптимального способа клонирования полноценных плодоносящих гибридов яровой мягкой пшеницы с закрепленным гетерозисным эффектом. Для массового тиражирования растений-регенерантов, а также для повышения соматической изменчивости, например, в целях клеточной селекции, целесообразна регенерация через каллусную культуру. В этом случае оптимален гемморизогенез – сопряженное формирование на морфогенном (способным к регенерации растений-регенерантов) каллусе множественных почек и корней.

Установлены этапы развития инициальной сильновакуолизированной микроспоры до сформированного эмбриоида на индукционной питательной среде Potato II. Показано, что развитие микроспорального эмбриоида *in vitro* принципиально сходно с развитием зиготического зародыша донорного растения пшеницы в естественных условиях.

Выявлены основные этапы развития морфогенного каллуса на индукционной питательной среде Potato II до достижения критической массы. При этом установлен

новый тип каллуса – потенциально морфогенный, способный при определенных условиях развиваться по тем же путям морфогенеза *in vitro*, что и морфогенный каллус. Показано, что способность морфогенного и потенциально морфогенного каллусов к развитию *in vitro* различными путями морфогенеза определяется наличием в их составе так называемых меристематических очагов, состоящих из клеток, обладающих морфогенетическими потенциями. Это подтверждается данными по иммулолокализации эндогенных фитогормонов в каллусах: показано, что ауксины и цитокинины локализуются преимущественно в клетках меристематических очагов. Присутствие этих гормонов характерно для зон роста с активно делящимися меристематическими клетками. Таким образом, локализация гормонов в клетках меристематических очагов подтверждает статус этих клеток как обладающих морфогенетическим потенциалом для дальнейшего развития и являющихся инициальными при индукции различных путей морфогенеза *in vitro* в морфогенных/потенциально морфогенных каллусах.

Сформированные эмбриониды и морфогенные/потенциально морфогенные каллусы, достигшие критической массы, переносили на среду для регенерации. Полученные андроклинные растения выращивали в пробирках до фазы кушения. Далее растения извлекали из пробирок и с помощью цитогенетического контроля отбирали только гаплоидные особи. Их обрабатывали смесью для дигаплоидизации (состав know how). После цитогенетического контроля дигаплоидизированные андроклинные растения переносили в почву, где они развивались до фазы полной спелости зерна. Лабораторная и полевая оценка показали высокую всхожесть полученных семян андроклинных растений. Качество семян подтверждено данными эмбриологического анализа.

#### **Выводы**

Биологический феномен андроклинии лежит в основе метода культуры *in vitro* изолированных пыльников – биотехнологического приема, перспективного в современных генетико-селекционных исследованиях растений.

Конкурентные преимущества разработанной на основе использования комплексных цитоэмбриологических и физиологических исследований биотехнологии андроклинной гаплоидии у яровой мягкой пшеницы состоят в получении за сравнительно короткое время гомозиготных константных гаплоидных гибридов 1-го поколения, сохраняющих в генотипе хозяйственно-ценные признаки родительских форм. Использование гаплоидных гибридов облегчает и отбор ценных генотипов, возникающих в результате рекомбинации генетических данных родительских форм. Такой отбор дает возможность ускорить оценку перспективности полученных гибридов. Перевод гаплоидов в дигаплоидное состояние позволяет получать полноценные семена таких растений.

Исследования поддержаны РФФИ (гранты 99-04-48496, 05-04-97911, 05-04-08114, 08-04-97045) и программой «Ведущие научные школы Российской Федерации» (гранты НШ 2148.2003.4, НШ 4834.2006.4).

#### **Литература**

1. Банникова В.П., Хведынич О.А. Основы эмбриологии растений. – Киев. – 1982. – 164с.
2. Хохлов С.С. Общие вопросы гаплоидии // Гаплоидия и селекция. – М. – 1976. – С.5-14.
3. Круглова Н.Н. Андроклиния с позиции экспериментальной эмбриологии растений: унификация терминологии // Вестник БГУ. – 2001. – Т. I, № 2. – С.135-137.
4. Круглова Н.Н., Батыгина Т.Б., Горбунова В.Ю., Титова Г.Е., Сельдимирова О.А. Эмбриологические основы андроклинии пшеницы. – М. – 2005. – 99с.
5. Батыгина Т.Б., Круглова Н.Н., Горбунова В.Ю., Егорова О.В., Титова Г.Е., Сельдимирова О.А. От микроспоры к сорту. – М. – 2008. – 134с.

6. *Androgenesis and haploid plants*. – Berlin, Heidelberg, New York. – 1998. – 297p.
7. Круглова Н.Н., Батыгина Т.Б. Методические рекомендации по использованию морфогенетического потенциала пыльника в биотехнологических исследованиях яровой мягкой пшеницы. – Уфа – 2002. – 22с.
8. Круглова Н.Н., Егорова О.В., Сельдимирова О.А. Световой микроскоп как инструмент в биотехнологии растений – Уфа. – 2008. – 122с.
9. Кудоярова Г.Р., Веселов С.Ю., Еркеев М.И. Иммуноферментное определение содержания индолилуксусной кислоты в семенах кукурузы с использованием меченых антител // Физиол. раст. – 1986. – Т. 33, № 6. – С.1221-1227.
10. Кудоярова Г.Р., Веселов С.Ю., Каравайко Н.Н. Иммуноферментная тест-система для определения цитокининов // Физиол. Раст. – 1989. – Т. 37, № 1. – С. 80-89.
11. Веселов С.Ю., Вальке Р.С., Ван Онкелен Х., Кудоярова Г.Р. Содержание и локализация цитокининов в листьях исходных и трансгенных растений табака // Физиол. Раст. – 1999. – Т. 46, № 1. – С.34-40.
12. Камелина О.П., Проскурина О.Б., Жинкина Н.А. К методике окраски эмбриологических препаратов // Ботан. журн. – 1992. – Т. 77, № 4. – С.93-96.
13. Круглова Н.Н. Периодизация развития пыльника злаков как методологический аспект изучения андрогенеза *in vitro* // Известия РАН. Серия биол. – 1999. – № 3. – С.275-281.
14. Куперман Ф.М. Морфофизиология растений. – М. – 1977. – 256 с.
15. Chuang Ch.-Ch., Ouyang T.-W. A set of potato media for wheat anther culture // Proc. Sympos. Plant Tissue Culture. – Peking – 1978. – P.51-56.
16. Blaydes D.F. Interaction of kinetin and varioris inhibitors in the growth of soybean // Physiol. Plant. – 1966. – V. 19, № 13. – P.748-753.

#### **Резюме**

Приводятся и анализируются основные этапы биотехнологии андроклиной гаплоидии у яровой мягкой пшеницы. Биотехнология оптимизирована на основе использования комплексных цитоэмбриологических и физиологических исследований.

The main stages of biotechnology of androclinic haploidy of spring soft wheat are resulted and analyzed. The biotechnology is optimized on the basis of employment of complex cytoembryological and physiological investigations.

**КУЦЯБА В.І., ПИНЯГА Ю.В., БОРЕЦЬКИЙ Ю.Р., ГОНЧАР М.В., ФЕДОРОВИЧ Д.В., СИБІРНИЙ А.А.**

*Інститут біології клітини НАН України*

*Україна, 79005, м. Львів, вул. Драгоманова 14/16, e-mail: vasylkutsiaba@yahoo.com*

#### **РОЗРОБКА СИСТЕМИ ГЕНЕТИЧНОЇ ТРАНСФОРМАЦІЇ ДЛЯ ІДЕНТИФІКАЦІЇ РЕГУЛЯТОРНИХ ГЕНІВ БІОСИНТЕЗУ РИБОФЛАВІНУ У ДРІЖДЖІВ *PICHA GUILLIERMONDII***

Клонування регуляторних генів біосинтезу рибофлавіну (РФ) флавіногенних дріжджів *Pichia guilliermondii* є важливим етапом при дослідженні молекулярних механізмів регуляції цього процесу, а також є основою для робіт у галузі метаболічної інженерії – конструюванні надсинтетиків РФ нового покоління. Відома нуклеотидна послідовність геному цих дріжджів не завжди дозволяє клонувати регуляторні гени біосинтезу РФ за допомогою методу інсерційного мутагенезу, тому залишається актуальною розробка ефективних систем для клонування таких генів методом функціональної комплементациї.