

УДК 633.171:581.143.5

ЭМБРИОГЕНЕЗ В КУЛЬТУРЕ ИЗОЛИРОВАННЫХ ПЫЛЬНИКОВ ПРОСА

С.В. БОБКОВ, кандидат сельскохозяйственных наук
ГНУ ВНИИ зернобобовых и крупяных культур

В культуре in vitro изучали эмбриогенную активность подвергнутых стрессовым воздействиям клеток пыльников проса. Установили, что стресс повышает эффективность эмбриогенного каллусогенеза не только в результате спорофитной активности микроспор, но и при усилении активности соматических клеток стенки пыльников. Наибольшее число растений-регенерантов получили из соматических клеток пыльника.

Ключевые слова: просо, культура пыльников, микроспоры, соматические клетки, эмбриогенная активность клеток, каллусы, происхождение растений-регенерантов.

С высокой частотой эмбриогенные каллусные ткани и растения-регенеранты проса *Panicum miliaceum* L. получены в культурах изолированных зиготических зародышей, соцветий, стеблей, листьев и корней [1, 2]. В культуре пыльников проса каллусы и растения-регенеранты также инициированы, но первоначально с низкой частотой [3]. Воздействие на изолированные пыльники тепловым стрессом (+32°C) приводило к заметному увеличению частоты формирования эмбриогенных каллусов [3]. При работе с культурой пыльников очень важно, какие клетки, соматические или микроспоры, проявляют эмбриогенную активность [4]. Растения-регенеранты, происходящие из микроспор гетерозиготных гибридов, дают чистолинейное потомство с различными наборами аллелей и непосредственно служат кандидатами в сорта. Регенерантные растения, полученные из соматических клеток, таким свойством не обладают. Цель настоящих исследований - определение влияния стрессовых воздействий на эмбриогенную активность микроспор и соматических клеток пыльников.

Материалы и методы

Семена гибридов проса F₂ - Могарообразные веточки 1904 х Благодатное, Могаро-

образные веточки 1904 х Соргообразное 2171, Соргообразное 2171 х Могарообразное 2172 высевали в пластиковые сосуды с почвой. Растения проса выращивали в тепличном боксе при 27°C днем и 18°C ночью с длиной светового дня 16 ч. Пыльники изолировали с пыльцой на средней одноядерной - ранней двуядерной стадиях развития. Использовали гибриды F₂ с маркерными генами в гетерозиготном состоянии, определяющими тип метелки. Развесистый тип контролировался доминантными аллелями. Компактная могоарообразная метелка, а также её тип могоарообразные веточки находились под контролем рецессивного аллеля *mp* в гомозиготном состоянии [6]. Соргообразная метелка контролировалась рецессивным аллелем *sd*. Пыльники брали с растений генотипов *+sd+mp*; *+mp*.

Активность клеток пыльников выявляли с помощью микроскопа OPTON в режиме фазового контраста. Чтобы определить происхождение растений-регенерантов и, следовательно, установить активность клеток, оценивали семьи регенерантов R₁ по маркерным генам. Отсутствие расщепления в семьях указывало на происхождение из микроспор. Расщепляющиеся семьи получали из соматических клеток пыльников.

Стрессовой обработке теплом (+32°C) в течение суток подвергали изолированные пыльники, высаженные на среду 2КС, холодом (+4°C) - срезанные метелки. Пыльники в контрольном варианте изолировали из свежесрезанных цветков и не подвергали стрессу.

Каллусогенную среду 2КС приготовили согласно протоколу MSB: среда MS [7] с витаминами B5 [8] содержала 0,12 М сахарозы и 9 µМ 2,4-Д (2,4-дихлофеноксисукусная кислота). Компактные эмбриогенные каллусы, полученные на среде 2КС, переносили на среду R1: MSB + 2-5 µМ НУК (α -нафтилуксусная

кислота) и 45 µМ БАП (6-бензиламинопурин) для инициации регенерационного процесса [9]. Каллусные ткани с перманентным процессом регенерации субкультивировали на среде MSB без регуляторов роста.

Результаты

После посадки изолированных пыльников проса на среду 2КС формировались маленькие полупрозрачные мягкие каллусы. Затем на их поверхности появлялись компактные эмбриогенные ткани (рис. 1). После переноса на среду R₁ начиналась регенерация растений (рис. 2а и б).

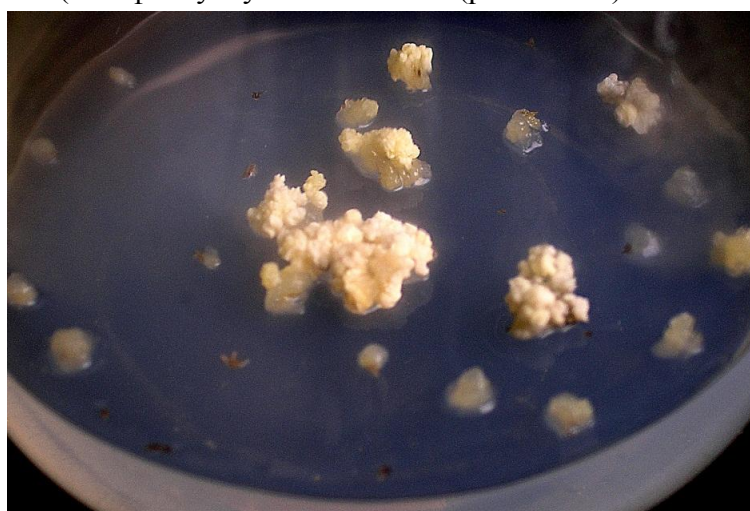
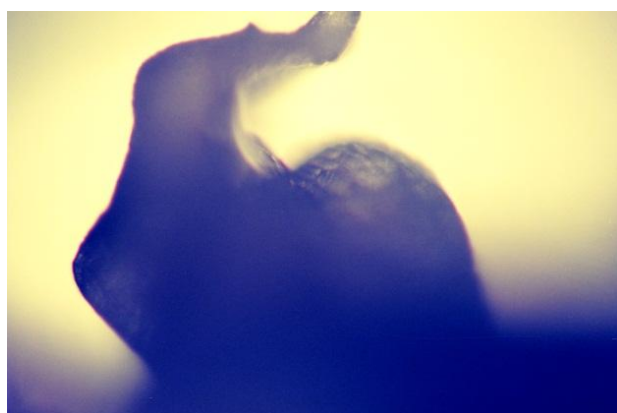
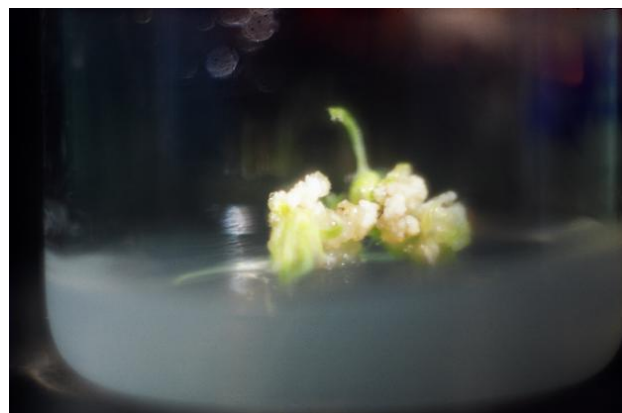


Рисунок 1. - Эмбриогенные каллусные ткани в культуре пыльников гибрида F₂ Могарообразные веточки 1904 х Благодатное после преобработки теплом (+32°C) на среде 2КС



а



б

Рисунок 2. - Стимулирование регенерационного процесса после переноса эмбриогенной каллусной ткани со среды 2КС на среду R1: а) прорастающий эмбрионид (микроскопия в режиме фазового контраста), б) регенерирующий побег

Стрессовые воздействия повышали эффективность эмбрионного каллусогенеза. Лучший вариант - обработка теплом (+32°C) пыльников гибрида Могарообразные веточки 1904 х Благодатное в течение суток с 13,3% эмбрионных каллусов от числа высаженных пыльников [10]. Число растений-регенерантов напрямую зависело от числа эмбрионных каллусных тканей. Среди растений-регенерантов в вариантах со стрессовыми воздействиями и в контроле обнаружили альби-

носы и зеленые растения. Наибольшее число растений-регенерантов были зелеными (рис. 3а). В некоторых каллусных тканях одновременно регенерировали альбиносы и зеленые растения (рис. 3б). Число альбиносов при обработке холодом оказалось меньше, чем в контроле и в варианте с воздействием теплом. В целом больше всего зеленых растений-регенерантов получили при тепловой обработке (2,8 растения на 1 высаженный пыльник).



а

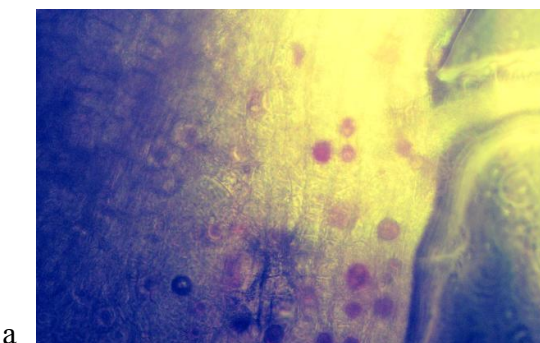


б

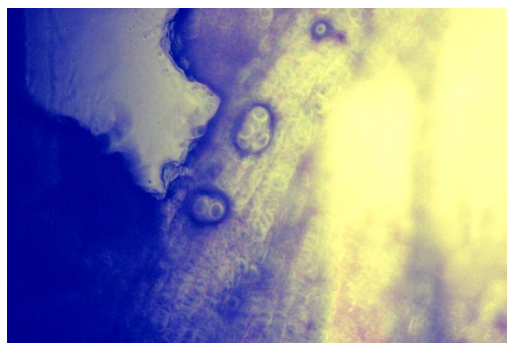
Рисунок 3. - Регенерация растений проса после переноса эмбрионных каллусных тканей со среды R1 на среду MSB: а) зеленые растения-регенеранты, б) регенерация альбиносов и зеленых растений из ткани, иницированной на одном пыльнике

Микроспоры и пыльцевые зерна проса расположены на внутренней поверхности стенок пыльника. В режиме фазового контраста они просматривались через стенку пыльника (рис. 4а). После семи дней культивирования на среде 2КС на поверхности пыльника появлялись выступающие над поверхностью круп-

ные клетки, которые делились с образованием проэмбриональных многоклеточных структур (рис. 4б). В связи с близостью расположения микроспор и соматических клеток стенок пыльников трудно выяснить, из какого типа клеток формируются крупные эмбрионные клетки.



а



б

Рисунок 4. - Культура изолированных пыльников проса в условиях агаризованной питательной среды в присутствии 2,4-Д: а) микроспоры на внутренней стороне стенки пыльника, б) крупные клетки и многоклеточные проэмбрио на поверхности стенки пыльника (микроскопия в режиме фазового контраста)

Чтобы определить происхождение клеток пыльников с эмбриогенной активностью, а также растений-регенерантов, проанализировали 163 семьи регенерантов R₁ из 14 пыльников с использованием маркерных аллелей [11]. Расщепление отсутствовало в 20 семьях (число растений в семьях 10...20), что составило

12,3% общего числа семей растений-регенерантов. Наибольшее число расщепляющихся семей выявили в варианте с тепловой обработкой. Обнаружено интересное явление, когда у одного пыльника получали как расщепляющиеся, так и нерасщепляющиеся семьи (таблица).

Таблица. – Семьи растений-регенерантов R₁, происходящие из одного пыльника

Гибрид F ₂	Генотип соматических клеток пыльника	Число семей			Генотип дигаплоидов
		всего	с расщеплением	без расщепления	
Соргообразное 2171 x Могарообразное 2172 (контроль)	<i>+sd+mp</i>	8	1	7	++++
Могарообразные веточки 1904 x Соргообразное 2171 (холод)	<i>+sd+mp</i>	15	2	13	++++
Могарообразные веточки 1904 x Соргообразное 2171 (тепло)	<i>+sd+mp</i>	3	1	2	<i>sdsdmpmp</i>

Среди восьми семей гибридной комбинации Соргообразное 2171 x Могарообразное 2172 (генотип *+sd+mp*, вариант без стрессовых воздействий), полученных из одного пыльника, семь не расщеплялись (генотип ++++), а одна семья расщеплялась. Из пятнадцати семей гибрида Могарообразные веточки 1904 x Соргообразное 2171 (генотип *+sd+mp*, обработка холодом) только две расщеплялись, другие тринадцать не расщеплялись и имели развесистый тип метелки (генотип ++++). Из трех семей гибридной комбинации Могарообразные веточки 1904 x Соргообразное 2171 (генотип *+sd+mp*, обработка теплом) одна семья расщеплялась, а в двух нерасщепляющихся семьях растения предположительно имели генотип *sdsdmpmp*.

Обсуждение

Переключение микроспор с гаметофитного на спорофитный путь развития и получение гаплоидных растений-регенерантов -

главная цель культуры изолированных пыльников или микроспор. Однако часто вместо дигаплоидов из микроспор регенерируют растения с более высокими уровнями пloidности. В культуре пыльников диплоидные растения-регенеранты могут происходить из соматических клеток стенок пыльников. На происхождение клеток из микроспор или пыльцевых зерен косвенно могут указывать регенеранты-альбиносы, которые встречались во всех вариантах, включая контроль.

Микроскопическое исследование показало, что после семи дней культивирования пыльников на среде 2КС на поверхности стенок пыльника дифференцировались крупные клетки. По внешнему виду они напоминали апоспоровые зачатки, которые обычно образуются в нуцеллярной ткани растений рода *Panicum* и развиваются в нередуцированные зародышевые мешки [12]. Но *in vitro* в присутствии 2,4-Д они отклоняются от характер-

ной для *Panicum* апоспории и развиваются по типу адвентивной эмбрионии, характерной для рода *Citrus*, образуя многоклеточные проэмбрио. Вполне вероятно, что многоклеточные проэмбрио - родоначальники компактных эмбриогенных тканей (проэмбриогенных клеточных масс - ПЕМ).

Микроскопические исследования не прояснили вопрос, какие клетки (соматические или микроспоры) предшествуют крупным клеткам многоклеточных проэмбрио. Для решения проблемы происхождения растений-регенерантов использовали генетические маркеры, детерминирующие тип метелки. Наибольшее число (87,7%) семей растений-регенерантов R₁ расщеплялось, что указывало на их происхождение из соматических клеток пыльников. Только 12,3% семей регенерантов R₁ не расщеплялись, что указывало на их происхождение из микроспор. Нерасщепляющиеся семьи с большей частотой получили в контрольном варианте и после обработки цветков холодом. Следовательно, стрессовые воздействия теплом, наряду с микроспорами, усиливают эмбриогенную активность соматических клеток.

Известно, что образование материнских клеток мегаспор и апомиктических клеток происходит только в нуцеллярной ткани семяпочек [9]. Появление крупных клеток, напоминающих по внешнему виду апоспоровые (*Panicum*) и нуцеллярные (*Citrus*) зачатки на поверхности стенок пыльников - интересный феномен. Исходя из данных по расщеплению в семьях растений-регенерантов R₁, можно предположить, что проэмбрио формируются как из микроспор, так и соматических клеток стенок пыльников. Следовательно, специализированные клетки стенок пыльников обладают свойствами клеток нуцеллуса. В присутствии 2,4-Д часть соматических клеток развивается по пути апоспории. Отдельные микроспоры, в свою очередь, претерпевают репро-

граммирование с гаметофитного на эмбриогенный путь развития. Крупные клетки являются промежуточным вариантом развития для обоих типов клеток.

В опытах отмечалось, что обработка теплом увеличивает число крупных клеток и многоклеточных структур. Развитие соматических клеток стенок пыльников по пути апоспории, по всей видимости, вступает в конкурентные отношения с процессом переключения микроспор с гаметофитного на эмбриогенный путь развития. В результате в вариантах с тепловым стрессом уменьшается частота растений-регенерантов, ведущих происхождение из микроспор.

Литература

1. Heyser J.W., Nabors M.W. Regeneration of proso millet from embryogenic calli derived from various plant parts // Crop Science. -1982. -V.22. -№5. -P.1070-1074.
2. Rangan T.S., Vasil I.K. Somatic embryogenesis and plant regeneration in tissue cultures of *Panicum miliaceum* L. and *Panicum miliare* Lamk. // Z. Pflanzenphysiologie. -1983. -V.109. -P.49-53.
3. Бобков С.В. Получение корнесобственных регенерантов в культуре пыльников проса // Вестник РАСХН. -2000. -№5. -С.41-43.
4. Бобков С.В. Влияние стресса на эффективность эмбриогенного каллусогенеза и регенерации растений в культуре пыльников проса // Доклады РАСХН. -2007. -№1. -С.13-14.
5. Бобков С.В. Эмбриогенная активность клеток пыльников проса *in vitro* // Вестник РАСХН. -2008. -№2. -С.42-45.
6. Sidorenko V.S., Bobkov S.V. Influence of mutant genes on productivity of millet (*Panicum miliaceum* L.) // Vortrage fur Pflanzenzuchtung. Poster abstracts of Mendel Centenary Congress. Brno, Czech Republic. -2000. -P.71.
7. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. -1962. -V.15. -№13. -P.473-497.
8. Gamborg O., Eveleigh D.E. Culture methods and detection of gluconases in cultures of wheat and barley // Can. J. Biochem. -1968. -V.46. -№5. -P.417-421.
9. Бобков С.В. Получение корнесобственных регенерантных растений в культурах незрелых соцветий и пыльников проса *Panicum miliaceum* L. // Сельскохозяйственная биология. -2002. -№5. -С.65-68.
10. Бобков С.В. Влияние стресса на эффективность эмбриогенного каллусогенеза и регенерации растений в

культуре пыльников проса Доклады РАСХН. -2007. - №1. -С.13-14.

11. Bobkov S.V., Sidorenko V.S., Zotikov V.I., Kaverin M.V. Marker assisted selection of dihaploids derived from millet *Panicum miliaceum* L. anther culture // Proceedings of International Congress of Genetics. Berlin, Germany, July 12-17, 2008. -P.78. 061/02/A.

12. Koltunow A.M. Apomixis: embryo sacs and embryos formed without meiosis or fertilization in ovules // The Plant Cell. -1993. -V.5. -P.1425-1437.

EMBRYOGENESIS IN ANTHHER CULTURE ISOLATED MILLET

S.V. Bobkov

The All-Russia Research Institute
of Legumes and Groat Crops

In anther culture of millet embryogenic activity of their cells was studied. It was determined that stress increases somatic cells activity. The most number of regenerants was derived from somatic cells of anthers.

Key words: millet, anther culture, microspores, somatic cells, emryogenic activity of cells, calli, origin of regenerants.

УДК 635.656:581.143

ВЛИЯНИЕ ОСМОТИЧЕСКОГО СТРЕССА НА ПРОЦЕССЫ РОСТА И МОРФОГЕНЕЗА В ДЛИТЕЛЬНО ПАССИРУЕМЫХ КАЛЛУСНЫХ КУЛЬТУРАХ ГОРОХА (*Pisum sativum* L.)

Г.В. СОБОЛЕВА, кандидат сельскохозяйственных наук
ГНУ ВНИИ зернобобовых и крупяных культур

Изучена возможность использования длительно пассируемых каллусов гороха для тестирования устойчивости к осмотическому стрессу и отбора резистентных линий. Проведен анализ роста каллусов на средах с ПЭГ и процессов регенерации побегов. Установлено, что длительно культивируемые каллусные ткани более чувствительны к осмотическому стрессу.

Ключевые слова: *Pisum sativum* L., осмотический стресс, каллус, полиэтиленгликоль, морфогенез.

Горох – основная зернобобовая культура в нашей стране широко возделываемая в различных почвенно-климатических условиях. Классическая селекция, основанная на методах внутривидовой гибридизации, позволила создать сорта, обладающие высоким потенциалом продуктивности. Однако производство зерна гороха до сих пор остается нестабильным по годам. Современные сорта формируют высокий урожай лишь в благоприятных погодных условиях [1]. Среди природных факторов, оказывающих наибольшее отрицательное воздействие на все физиологические процессы роста и развития растений гороха и, в конечном счете, приводящих к потерям урожая, является водный стресс, вызванный засу-

хой. Ожидается, что в связи с глобальным потеплением климата периодичность повторения засух по годам будет только усиливаться. Важно учитывать, что за период с 1980 по 2012 годы в России участилось проявление весенних засух, что особенно отрицательно сказывается на получении высоких урожаев гороха [2]. В этой связи, одним из современных инновационных направлений, позволяющих расширить спектр исходного материала и активизировать селекционный процесс, направленный на создание высокопродуктивных засухоустойчивых сортов, являются биотехнологии и, в частности, клеточная селекция *in vitro*. Генетическое варьирование в этом случае отличается более широким спектром, а