

## РЕПРОГРАММИРОВАНИЕ ИЗОЛИРОВАННЫХ МИКРОСПОР ГОРОХА НА ЭМБРИОГЕННЫЙ ПУТЬ РАЗВИТИЯ

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

*Горох (*Pisum sativum* L.) является видом, для которого не разработаны надежные методики получения гаплоидных растений. Разработка методов репрограммирования изолированных микроспор гороха на эмбриогенный путь развития является способом решения этой проблемы. С этой целью были использованы стрессовые обработки бутонов холодом (+4 °С) и изолированных микроспор теплом (+35 °С). Проведено изучение культуры изолированных микроспор 6 генотипов гороха в условиях 23 вариантов питательных сред КМ, NLN и MSB с различным содержанием регуляторов роста, витаминов, сахаров, глутамина и гидролизата казеина. Показано, что стрессовая обработка бутонов гороха холодом и определённые составы жидких питательных сред способны поддерживать эмбриогенное развитие микроспор. В условиях двух вариантов питательных сред КМ и MSB были инициированы микрокалусы (эмбриоиды).*

**Ключевые слова:** горох, бутоны, стресс, *in vitro*, питательная среда, изолированные микроспоры, репрограммирование, микропласт, микрокалус, эмбриоид.

Преимущество использования дигаплоидов в селекции сельскохозяйственных культур определяется тем, что полностью гомозиготные растения с различными комбинациями аллелей могут быть получены в течение одной генерации. Методы классической селекции позволяют достигнуть достаточно высокого уровня гомозиготности (99,2%) в результате самоопыления растений в течение 7 генераций.

Горох (*Pisum sativum* L.) является видом, для которого не разработаны надежные методики получения гаплоидных растений. Применение дигаплоидных растений-регенерантов в селекции гороха позволит значительно уменьшить затраты времени и материальных средств на выведение нового сорта. Дигаплоиды можно использовать на различных этапах селекционного процесса, оценивать в качестве линий или вовлекать в скрещивания. Одним из направлений исследований по получению дигаплоидов гороха является репрограммирование микроспор с гаметофитного на эмбриогенный путь развития в культуре *in vitro* с последующей регенерацией растений. В настоящее время работа ведется с изолированными пыльниками и микроспорами.

Культивирование изолированных пыльников гороха часто приводит к регенерации растений из соматических клеток [1, 2, 3]. Поэтому культура изолированных микроспор является более предпочтительным способом получения гаплоидов. В настоящее время не разработаны воспроизводимые методы получения гаплоидов гороха, в том числе и в культуре изолированных микроспор. В мировых научных центрах работы по стимулированию эмбриогенного развития в культуре изолированных микроспор проводятся с использованием температурного и осмотического стрессов, а также электропорации [4, 5].

Цель настоящих исследований состояла в поиске условий для репрограммирования изолированных микроспор со спорофитного на эмбриогенный путь развития в культуре *in vitro*.

### Материалы и методы

Культивировали изолированные микроспоры сортов гороха Стабил, Готик, Фараон, Визир, Спартак и селекционной линии 1096. Всего изучили 23 варианта питательных сред. Использовали стрессовые воздействия теплом и холодом на микроспоры. Изолированные бутоны стерилизовали в течение 10 минут в 0,5% растворе хлоргексидин-глюконата натрия [6]. После стерилизации бутоны трижды ополаскивали в дистиллированной воде и помещали в чашки Петри со стерильной фильтровальной бумагой. Для получения культуры изолированных микроспор стерильные бутоны гороха гомогенизировали в фарфоровой ступке в 2-3 мл среды **В** [7] с 0,3 М маннитола (табл. 1).

Таблица 1 - Химический состав среды **В**

Вещество	Концентрация, мг/л
KCl	1490
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	250
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	140
CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O	110
Маннитол 0,3 М	54700

Гомогенат пропускали через нейлоновый фильтр (Millipore, USA) с диаметром пор 40 мкм. Суспензию микроспор для отделения мелких частиц промывали на сите с диаметром пор 15 мкм. Суспензию трижды центрифугировали при 100 g в течение 15 минут в пробирках 1,5 мл. Осадок ресуспендировали в 1 мл жидких питательных средах в стаканчиках 10x35 мм. Изолированные микроспоры культивировали на стационарной поверхности с плотностью 10<sup>5</sup> микроспор/мл [5]. При определении стадии развития микроспор в качестве красителя использовали 4% пропионовый кармин. Классификацию стадий развития микроспор проводили по Telmer et al. [8]. Жизнеспособность микроспор определяли окрашиванием в 4% ацетокармине. Окрашивание микроспор являлось признаком жизнеспособности. Исследования проводили с использованием микроскопа Axioskop 40 (Karl Zeiss, Германия). Микроспоры изолировали на одноядерных стадиях развития.

Экспланты и каллусные ткани в условиях питательных сред культивировали на свету (1,5 тыс. лк) при 16-часовом световом дне и 25°C.

### Результаты исследований

Исследования эмбриогенеза в культуре изолированных микроспор гороха на современном этапе характеризуются выраженной поисковой составляющей. Поэтому настоящие исследования направлены на испытание широкого набора критических факторов (генотип, питательная среда, регуляторы роста, стрессовые воздействия и др.) для репрограммирования микроспор на эмбриогенный путь развития и идентификацию удачных вариантов.

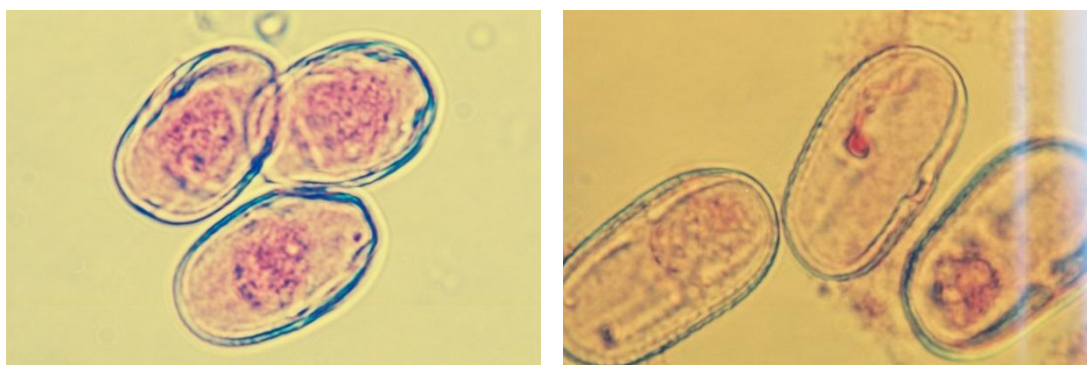
Проведено изучение культуры изолированных микроспор 6 генотипов гороха с использованием вариантов трех известных питательных сред Kao&Michaluk (KM) [9], NLN [10] и MSB [11, 12, 13]. Всего оценивали 23 варианта питательных сред. Оценивали 18 вариантов среды KM, 3 варианта NLN и 1 вариант MSB (табл. 2). Все варианты среды KM содержали витамины B5 [12] и кроме глицина не содержали других аминокислот, заявленных в протоколе.

Таблица 2 – Варианты питательных сред и стрессовых воздействий

Сорт, линия	Вариант среды	Стрессовые воздействия		Результат
		холод (+4 <sup>0</sup> С), сутки	тепло (+35 <sup>0</sup> С), часы	
Стабил	КМ-ANBM	14	-	
	КМ-A5	21	-	
	КМ-A5	15	-	
	КМ-A8	-	18	
	КМ-A8	1	18	
	MNL-M1M2	12	-	
	MSB-M3	10	-	микрокаллусы/эмбриониды
Готик	КМ-A5au	13	-	
	КМ-A5	14	-	
	КМ-A8	4	-	
	КМ-A81	9	-	
	MNL-M1M2	12	-	
	MNL-M1M2	7	-	
Визир	КМ-A5au	19	-	
Фараон	КМ-A5	18	-	эмбриогенные микроспоры
	MNL-M1M2	18	-	
Спартак	КМ-A5au	20	-	
1096	КМ-ap1	16	-	микрокаллусы/эмбриониды 0,5-1 мм
	КМ-ap1	19	-	
	КМ-ap1	28	-	
	КМ-A9	2	18	
	КМ-A9	6	18	
	КМ-A9	4	-	

Выбор питательных сред определялся эффективностью использования в культурах изолированных микроспор и протопластов. Питательная среда NLN эффективна для культивирования изолированных микроспор и получения гаплоидов у вида *Brassica napus* L. Выбор минеральной основы среды КМ определялся тем, что эта среда была разработана для культивирования изолированных протопластов бобовой культуры люцерны. Среда MSB широко используется для культивирования *in vitro* тканей и клеток гороха. Варианты питательных сред различались по наличию и количеству регуляторов роста (2,4-Д - 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота, ИМК - индолилмасляная кислота, БАП - 6-бензиламинопуридин, НУК - α-нафтилуксусная кислота), витаминов (тиамин, никотиновая кислота, пиридоксин, биотин, фолиевая кислота), антиоксидантов (глутатион), сахаров (сахароза, мальтоза, маннитол), глутамина и гидролизата казеина. Для ремоделирования клеток мужского гаметофита на эмбриогенный путь развития использовали стрессовые обработки различной продолжительности - изолированных бутонов холодом (+4<sup>0</sup>С) и изолированных микроспор в условиях среды В теплом (+35<sup>0</sup>С).

В питательных средах ресуспендировали изолированные микроспоры на различных одноядерных стадиях развития (рис. 1 а и б).



а

б

*Рис. 1 – Одноядерные микроспоры гороха на а) ранней и б) поздней вакуолизированной стадиях развития*

В условиях отдельных вариантов жидкой среды КМ (КМ-А5, КМ-А5аи, КМ-ар1, MSB-М3) наблюдали характерные изменения формы микроспор сортов Стабил, Готик, Фараон и линии 109б, которые являются маркерными признаками перехода на эмбриогенный путь развития [14]. Например, у микроспор на поздней одноядерной стадии развития в условиях питательных сред происходила деградация вакуоли (рис. 2 а). Микроспоры приобретали округлую форму, ядро перемещалось к центру, увеличивалась интенсивность окраски цитоплазмы (рис. 2 б). У отдельных эмбриогенных микроспор наблюдали выпячивание микропласта через поры за пределы экзины (рис. 2 в).



а

б

в

*Рис. 2 – Эмбриогенные микроспоры гороха: а) деградация вакуоли в микроспорах гороха в условиях среды КМ-А5 (сорт Фараон), б) микроспора с густой цитоплазмой и центральным положением конденсированного ядра, в) выпячивание микропласта через поры за пределы экзины*

Микрокаллусы (эмбриониды) получены в культуре изолированных микроспор сорта Стабил и селекционной линии 109б в результате культивирования в жидких средах MSB-М3, КМ-ар1, соответственно.

Бутоны гороха сорта Стабил перед изолированием микроспор подвергали обработке холодом (+4<sup>0</sup>С) в течение 10 суток. Изолированные микроспоры культивировали в жидкой питательной среде MSB-М3. Среда MSB-М3 являлась вариантом среды MSB и дополнительно содержала 500 мг/л глутамина, 100 мг/л гидролизата казеина, 0,5 мг/л 2,4-Д и 0,5 мг/л БАП. Через 17 суток культивирования микроспор в среде MSB-М3 появилась белая взвесь. Культуру разбавляли свежей средой в соотношении 1:1. Через 6 суток в толще среды появились белые микрокаллусы или эмбриониды (рис. 2 а).

Микроспоры селекционной линии 109б изолировали после стрессовой обработки бутонов холодом (+4<sup>0</sup>С) в течение 16 суток. Изолированные микроспоры культивировали в жидкой питательной среде КМ-ар1. Среда КМ-ар1 содержала соли среды КМ, витамины В5, 100 мг/л мио-

инозитола, 2 мг/л глицина, 500 мг/л глутамина, 500 мг/л гидролизата казеина, 0,25 мг/л НУК и 0,2 мг/л БАП, а также сахарозу. На 34 сутки культивирования изолированных микроспор после разбавления свежей средой в соотношении 1:1 было отмечено появление множественных микрокалусов (эмбриоидов) размером 0,5-1 мм (рис. 3 б).

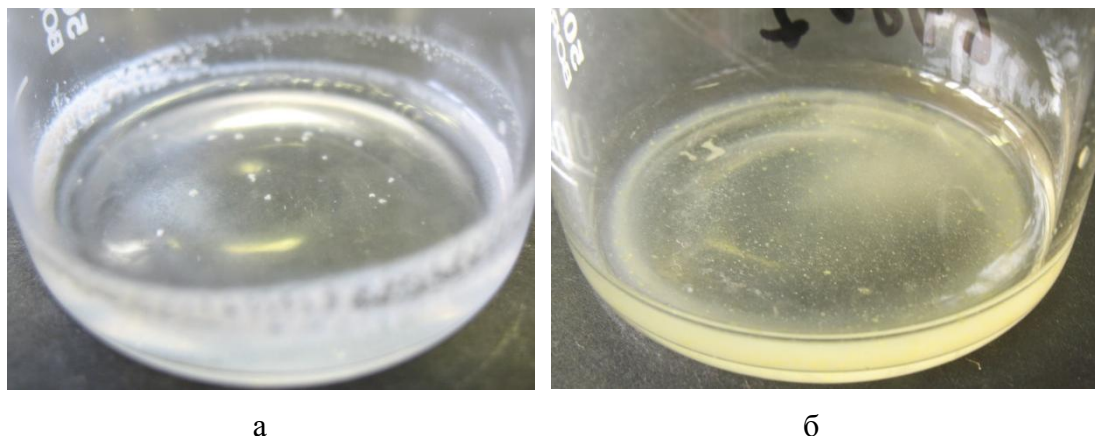


Рис. 3 – Микрокалусы (эмбриоиды) в культуре изолированных микроспор гороха  
а) сорта Стабил и б) селекционной линии 109 б.

### Заключение

Горох (*Pisum sativum* L.) является видом, для которого не разработаны надежные методики получения гаплоидных растений. Культивирование изолированных пыльников часто сопровождается инициацией каллусных тканей и регенерацией растений гороха из соматических клеток пыльников. Поэтому культура изолированных микроспор является более предпочтительным методом получения гаплоидов. Проведено изучение культуры изолированных микроспор 6 генотипов гороха с использованием температурного стресса и 23 вариантов известных питательных сред КМ, NLN и MSB с различным содержанием регуляторов роста, витаминов, антиоксидантов, сахаров, глутамина и гидролизата казеина. Определены стрессовые воздействия и варианты питательных сред, поддерживающие эмбриогенный путь развития микроспор. Микроспоры гороха с эмбриогенным развитием приобретали округлую форму, ядро перемещалось к центру клетки, увеличивалась интенсивность окраски цитоплазмы. У отдельных эмбриогенных микроспор наблюдали выпячивание микропласта через поры за пределы экзины. В культуре изолированных микроспор гороха с использованием вариантов питательных сред КМ и MSB были иницированы микрокалусы (эмбриоиды). Результаты исследований могут быть использованы для разработки методов получения жизнеспособных гаплоидных эмбриоидов и растений-регенерантов гороха.

### Литература

1. Бобков С.В. Использование улучшенных вариантов среды №6 в культуре пыльников гороха // Аграрная наука. - 2005. - № 8. - С. 23-25.
2. Бобков С.В. Культура изолированных пыльников гороха // Доклады РАСХН. -2010. - № 6. - С. 19-21.
3. Bobkov S.V. Isolated pea anther culture // Russian Agricultural Sciences. -2010. -V.36. - №6. - P.413-416.
4. Croser J., Lulsdorf M., Davies P., Clarke H., Wilson J., Sidhu P., Grewal R., Allen K., Dament T., Warkentin T., Vandenberg A., Siddique K. Haploid embryogenesis from chickpea and field pea – progress towards a routine protocol // Proceedings of the Australian Branch of the IAPT& / Perth, Western Australia, 21-24th September, 2005. - P. 71-82.
5. Ochatt S., Pech C., Grewal R., Coreux C., Lulsdorf M., Jacas L. Abiotic stress enhances androgenesis from isolated microspores of some legume species (Fabaceae) // Journal of plant physiology. - 2009. - V. 166. - P. 1314-1328.

6. Бобков С.В. Культура *in vitro* изолированных пыльников и микроспор гороха (методические рекомендации). - Орел, 2011. - 20 с.
7. Kyo M., Harada H. Control of the developmental pathway of tobacco pollen *in vitro* // *Planta*. - 1986. – V.168. – P.427-432.
8. Telmer C.A., Simmonds D.H., Newcomb W. Determination of development stage to obtain high frequencies of embryogenic microspores in *Brassica napus* // *Physiologia plantarum*. -1992. - V. 84. - P. 417-424.
9. Kao K.N. and Michayluk M.R. Plant regeneration from mesophyll protoplasts of alfalfa // *Z. Pflanzenphysiol.* - 1980. - V. 96. - P. 135-141.
10. Lichter R. Induction of haploid plants from isolated pollen of *Brassica napus* // *Z. Pflanzenphysiol.* - 1982. - V. 105. - P. 427-434.
11. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiology of plant*. - 1962. - V. 15. - №13. - P. 473-497.
12. 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.
13. Griga M., Tejklova E., Novak F.J., Kubalaková M. *In vitro* clonal propagation of *Pisum sativum* L. // *Plant cell tissue organ culture*. - 1986. - V. 6. - P. 95-104.
14. Touraev A., Vicente O. and Heberle-Bors E. Initiation of microspore embryogenesis by stress // *Trends in Plant Science*. - 1997. - V. 2. - P. 285-323.

## **REPROGRAMMING OF ISOLATED MICROSPORES OF PEA ONTO EMBRYOGENIC PATHWAY OF DEVELOPMENT**

**S.V. Bobkov**

State Scientific Institution the All-Russia Research Institute of Legumes and Groat Crops

**Abstract:** *Pea (Pisum sativum L.) is recalcitrant species for haploid plants producing Reprogramming of isolated microspores onto embryogenic pathway of development is a tool for solution of this problem. For this purpose stress treatments with cold (+4 °C) and heat (+35 °C) were applied to pea buds and isolated microspores, respectively. Isolated microspore cultures derived from 6 genotypes were cultivated in conditions of 23 variants of KM, NLN and MSB liquid nutrient media with different content of growth regulators, vitamins, sugars, glutamine, and casein hydrolysate. Stress treatments and composition of nutrient media supporting embryogenic pathway of microspore development were determined. Microcalli (embryoids) were produced in conditions of two nutrient media variants based on KM and MSB protocols.*

**Keywords:** pea, buds, stress, *in vitro*, nutrient medium, isolated microspores, reprogramming, microplast, microcalli, embryo.