



Н.Н. Круглова, О.А. Сельдиминова

**РЕГЕНЕРАЦИЯ ПШЕНИЦЫ
IN VITRO И *EX VITRO***

ГИЛЕМ

**РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
УФИМСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР
ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ**

**АКАДЕМИЯ НАУК РЕСПУБЛИКИ БАШКОРТОСТАН
ОТДЕЛЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ, МЕДИЦИНСКИХ И
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ НАУК**

Н.Н. Круглова, О.А. Сельдимирова

**РЕГЕНЕРАЦИЯ ПШЕНИЦЫ
IN VITRO И *EX VITRO*:
ЦИТО-ГИСТОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ**

Уфа «Гилем» 2011

ББК 28.54
К 84
УДК 633.11:581.143.5

Н.Н. Круглова, О.А. Сельдимирова. Регенерация пшеницы *in vitro* и *ex vitro*: цитогистологические аспекты. Уфа: Гилем, 2011. 124 с.

Показана необходимость и эффективность цито-гистологических исследований на каждом этапе биотехнологий получения растений-регенерантов яровой мягкой пшеницы в условиях *in vitro* и *ex vitro*.

Предназначена для биотехнологов, научных работников, а также преподавателей, аспирантов, магистрантов и студентов факультетов биологического профиля.

Рисунков 84, таблиц 2, приложений 2.

ISBN 978-5-7501-0938-8

Исследования поддержаны РФФИ (99-04-48496, 01-04-06565, 02-04-48701, 02-04-06132, 03-04-06213), РФФИ-Агидель (02-04-97907, 05-04-97911), РФФИ-Поволжье (08-04-97045), ФЦП «Интеграция» (ЯО 128/1644), Академией наук Республики Башкортостан (проекты по Государственным научно-техническим программам 1999-2001, 2002-2004, 2005-2007 гг.)

*Издано при финансовой поддержке
Фонда фундаментальных исследований
Академии наук Республики Башкортостан*

Ответственный редактор:

доктор биологических наук, профессор,
академик Академии наук Республики Башкортостан В.А. Вахитов

Рецензенты:

доктор биологических наук, профессор Г.Р. Кудоярова
доктор биологических наук И.В. Максимов

При оформлении обложки использована фотография В.Н. Балабанова, с любезного разрешения автора.

© Круглова Н.Н., Сельдимирова О.А., 2011

© Издательство «Гилем», 2011

© Учреждение Российской академии наук
Институт биологии Уфимского научного центра РАН, 2011

ВВЕДЕНИЕ

Современные активно развивающиеся инновационные биотехнологии растений во многом базируются на данных клеточной биологии и клеточной инженерии. Необходимость и эффективность использования данных цито-гистологических исследований демонстрирует каждый этап биотехнологий растений, основанных на использовании методов культуры *in vitro* клеток, тканей и органов. Действительно, понять и правильно оценить сложную структуру клеток, тканей и органов растений и их изменение в динамике культивирования *in vitro* можно только путем детального цито-гистологического анализа. Без светового микроскопа невозможно выявить тонкие механизмы реализации морфогенетического потенциала клеток растений в экспериментальных условиях культуры *in vitro*. Именно детальные цито-гистологические исследования лежат в основе понимания тонких закономерностей морфогенеза растений *in vitro*.

В данной монографии отражены итоги многолетних исследований сотрудников лаборатории экспериментальной эмбриологии растений в области цито-гистологических аспектов регенерации растений яровой мягкой пшеницы в культуре *in vitro* репродуктивных (пыльник) и эмбриональных (зародыш) структур и в условиях *ex vitro* с привлечением современных световых микроскопов [Световой микроскоп как инструмент в биотехнологии растений, 2008]. Цель таких исследований – разработка биотехнологий получения полноценных растений для использования в селекционных программах.

Все исследования проводились в тесном творческом сотрудничестве с лабораторией эмбриологии и репродуктивной биологии Ботанического института им. В.Л.Комарова РАН (зав. лабораторией – чл.-корр. РАН Т.Б.Батыгина), лабораторией селекции и семеноводства яровой пшеницы Башкирского НИИ СХ РАСХН (зав.

лабораторией – к.с.-х.н. В.И.Никонов) и кафедрой биохимии и биотехнологии Башкирского государственного университета (зав. кафедрой – проф. И.Ф.Шаяхметов). Кроме того, в данном издании отражен опыт работы сотрудников лаборатории экспериментальной эмбриологии растений со студентами базовой кафедры биотехнологии растений и микроорганизмов Башкирского государственного университета.

В главе 1 приведены цито-гистологические данные, полученные при разработке биотехнологии андроклиной гаплоидии яровой мягкой пшеницы [Круглова, 2001; Батыгина, Круглова, 2001; Круглова, Батыгина, 2002; Эмбриологические основы ..., 2005; Kruglova, Batygina, 2006; Круглова, 2007; Круглова с соавт., 2007; От микроспоры к сорту, 2008]. За основу биотехнологии взят метод культуры *in vitro* пыльников пшеницы, разработанный сотрудниками кафедры генетики Саратовского государственного университета (зав. кафедрой – проф. В.С. Тырнов) [Суханов, Тырнов, 1976; Суханов, 1983]. Начало исследованиям андроклинии пшеницы в Институте биологии УНЦ РАН было положено д.б.н. проф. В.Ю.Горбуновой [Горбунова, 1993].

Глава 2 посвящена результатам цито-гистологических исследований эмбриокультуры *in vitro* яровой мягкой пшеницы с целью оптимизации биотехнологии получения растений-регенерантов [Катасонова, Шаяхметов, Круглова, 2006; Круглова с соавт., 2006]. За основу взяты разработки сотрудников кафедры генетики Саратовского государственного университета [Суханов, Папазян, 1983] в модификации И.Ф.Шаяхметова [1999, 2001, 2007]. Глава написана при участии научного сотрудника лаборатории экспериментальной эмбриологии растений к.б.н. А.А. Катасоновой и зав.кафедрой биохимии и биотехнологии Башкирского государственного университета проф. И.Ф. Шаяхметова.

Исследования сотрудников лаборатории экспериментальной эмбриологии растений по теме монографии поддержаны РФФИ (99-04-48496, 01-04-06565, 02-04-48701, 02-04-06132, 03-04-06213), РФФИ-Агидель (02-04-97907, 05-04-97911), РФФИ-Поволжье (08-04-97045), а также выполнялись в рамках проектов по ФЦП «Интеграция» (ЯО 128/1644) и проектов по ГНТП АН РБ 1999-2001, 2002-2004, 2005-2007 гг. Сотрудники принимали и принимают участие в выполнении исследований по теме монографии по программе «Ведущие научные школы РФ» (НШ 2148.2003.4, НШ 4834.2006.4, НШ 2096.2008.4, лидер Школы – чл.-корр. РАН Т.Б. Батыгина) и проекту РФФИ-офи (05-04-08114, совместно с Ботаническим институтом им. В.Л. Комарова РАН и ВНИИ растениеводства им. Н.И.Вавилова, руководитель – чл.-корр. РАН Т.Б. Батыгина).

Авторы выражают глубокую благодарность академику АН РБ д.б.н. проф. В.А. Вахитову – ответственному редактору издания, а также рецензентам – заведующей лабораторией физиологии растений Института биологии Уфимского НЦ РАН д.б.н. проф. Г.Р. Кудояровой и заведующему лабораторией биохимии иммунитета растений Института биохимии и генетики Уфимского НЦ РАН д.б.н. И.В. Максимову.

Слова самой искренней благодарности авторы адресуют чл.-корр. РАН Т.Б. Батыгиной и к.б.н. Г.Е.Титовой (Ботанический институт им. В.Л.Комарова РАН, г. Санкт-Петербург) за всемерную поддержку исследований и ценные консультации. Авторы благодарят к.с.-х.н. В.И.Никонова (Башкирский НИИ СХ РАСХН) и проф. И.Ф.Шаяхметова (Башкирский государственный университет) за многолетнее плодотворное сотрудничество.

Авторы признательны сотрудникам лаборатории экспериментальной эмбриологии растений Института биологии Уфимского НЦ РАН Д.Ю. Зайцеву и А.Е. Кругловой за большую

помощь в подготовке рукописи к изданию, а также В.Н. Балабанову (Украина) за любезно предоставленную фотографию, использованную при оформлении обложки монографии.

Глава 1

ЦИТО-ГИСТОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ АНДРОКЛИННОЙ ГАПЛОИДИИ *IN VITRO* У ПШЕНИЦЫ

Разработка биотехнологических подходов культивирования *in vitro* генеративных структур растений – перспективное и приоритетное направление современных биологических исследований.

Одно из таких направлений – биотехнология андроклинной гаплоидии, основанная на феномене андроклинии. Суть интереснейшего феномена андроклинии состоит в переключении программы развития морфогенетически компетентных гаплоидных клеток пыльника с обычного гаметофитного пути (образование пыльцевого зерна – мужского гаметофита) на иной путь – спорофитный (образование гаплоидного растения-регенеранта). При этом образование растения-регенеранта происходит посредством главным образом двух путей морфогенеза *in vitro* – эмбриоидогенез и гемморизогенез [Эмбриологические основы..., 2005; и мн.др.].

Открытие явления андроклинии у растений [Guha, Maheshwari, 1964] можно охарактеризовать как одно из самых значительных в биологии растений за последние годы. Для обозначения этого явления в литературе используются различные термины: «пыльцевой эмбриогенез» («pollen embryogenesis»), «пыльцевой андрогенез» («pollen androgenesis»), «микроспориальный эмбриогенез» («microsporial embryogenesis»), «андрогенный эмбриогенез» («androgenic embryogenesis»), «экспериментальный андрогенез» («experimental androgenesis»), «гаплоидный андрогенез» («haploid androgenesis») и наиболее часто – «андрогенез *in vitro*» («androgenesis *in vitro*»).

Мы будем придерживаться предложенного С.С.Хохловым [1976] термина «андроклиния» (*от греч. андрoς – мужской, κλινος – имеющий склонность*) как наиболее верно отражающего суть явления. Применять

же распространенный термин «андрогагенез *in vitro*» для обозначения процесса образования растений из микроспор или клеток пыльцевого зерна некорректно [Батыгина с соавт., 1992, 1994]. Действительно, согласно существующей терминологии, биолог (как ботаник, так и зоолог) подразумевает под андрогагенезом (мужским партеногагенезом) развитие нового организма из гаметы – спермия [Поддубная-Арнольди, 1976; Токин, 1987; Komma, Endow, 1995]. Кроме того, термин «андрогагенез *in vitro*» многословен, зачастую слова «*in vitro*» опускаются, что приводит к путанице двух понятий – «андрогагенез *in vitro*» и собственно «андрогагенез» [Тырнов, 1986]. Немаловажно и то, что андрогагенез в его классическом значении связан с аллоплазматическим состоянием организма (особь имеет материнскую цитоплазму и отцовское ядро), тогда как при так называемом андрогагенезе *in vitro* новый организм имеет ядро и цитоплазму только одной особи [Тырнов, Хохлов, 1974; Тырнов, 1998, 2003, 2005].

Гаплоиды 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. Всё это имеет, безусловно, большое значение в селекционно-генетических исследованиях хозяйственно ценных зерновых злаков [Kasha *et al.*, 1977; Haploids of higher plants *in vitro*, 1986; Батыгина, 1987; Молканова с соавт., 1990; Рахимбаев с соавт., 1992; Белинская с соавт., 1993; Белоусов с соавт., 1998; Зибарова с соавт., 1998; Androgenesis and haploid plants, 1998; Heberle-Bors, 1998; Anther and pollen, 1999; Wang *et al.*, 2000; Анапияев, 2001; Орлов с соавт., 2001; Сатарова, 2002; Игнатова, 2004; Haploids in higher plants, 2006; Бишимбаева, 2007; Білінська с соавт., 2007; Белинская, 2007, 2008].

В лаборатории экспериментальной эмбриологии растений Института биологии Уфимского НЦ РАН в творческом содружестве с лабораторией эмбриологии и репродуктивной биологии Ботанического института им. В.Л.Комарова РАН и лабораторией селекции и семеноводства яровой пшеницы Селекционного центра по растениеводству Башкирского НИИ СХ РАСХН разработана биотехнология стабильного получения в культуре *in vitro* хозяйственно ценных и конкурентно способных гибридных дигаплоидных растений яровой мягкой пшеницы [Горбунова, Круглова, 1988; Горбунова, 1993; Круглова, 2001, Батыгина, Круглова, 2001; Круглова, Батыгина, 2002; Kruglova, Batygina, 2006; Эмбриологические основы..., 2005; Круглова, 2007; Круглова с соавт., 2007; От микроспоры к сорту, 2008].

Принципиальная особенность биотехнологической разработки заключается в комплексном использовании данных цито-гистологии и цитофизиологии. Именно такой подход ведет к максимально полной реализации морфогенетического потенциала инициальных клеток андроклинии в условиях *in vitro* и стабильному получению плодоносящих андроклинных растений-регенерантов яровой мягкой пшеницы. За основу взят метод культуры *in vitro* пыльников яровой мягкой пшеницы, разработанный сотрудниками кафедры генетики Саратовского государственного университета [Суханов, Тырнов, 1976; Суханов, 1983].

Предварительно провели оценку 189 перспективных для зоны Южного Урала сортов, линий и гибридов яровой мягкой пшеницы. Для 73 из них были получены положительные ответы по способности изолированных пыльников к индукции спорофитных путей морфогенеза в культуре *in vitro*. Из них в качестве основных объектов исследования отобрали 8 сортов и гибридную линию, интенсивно используемые в селекционных программах Башкирского НИИ СХ РАСХН (рис. 1).

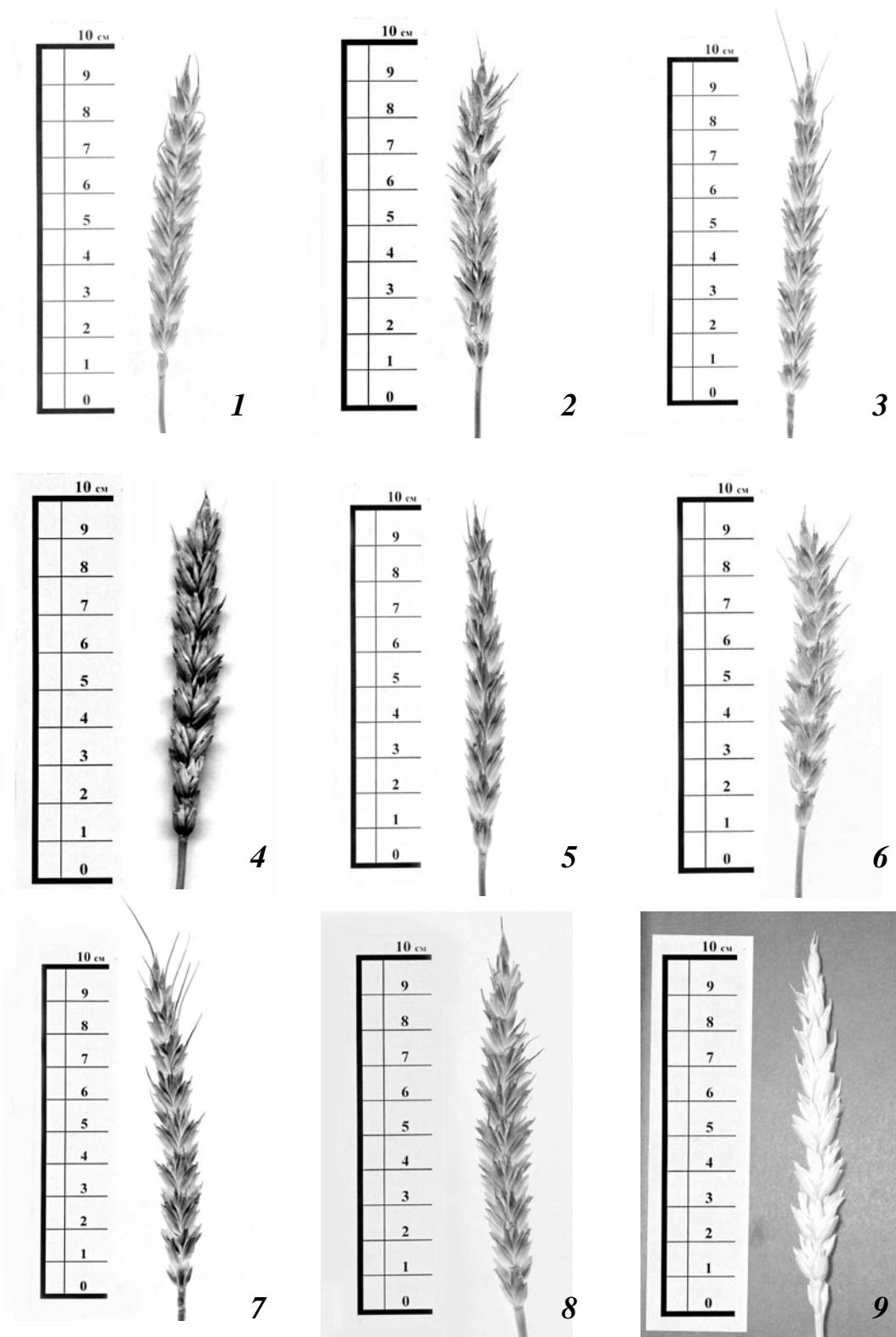


Рис. 1. Сорты и гибридная линия яровой мягкой пшеницы – основные объекты исследования: 1 – Саратовская 55, 2 – Башкирская 24, 3 – Московская 35, 4 – Казахстанская 10, 5 – Симбирка, 6 – Скала, 7 – Жница, 8 – Sonalika, 9 – Фотос (гибрид Московская 35 x Жница). Макросъемка

Семена изучаемых сортов и линии были любезно предоставлены лабораторией селекции яровой пшеницы Башкирского НИИ СХ РАСХН согласно Договорам о творческом сотрудничестве, а также ВНИИ растениеводства им. Н.И.Вавилова РАСХН (г. Санкт-Петербург).

Растения выращивали в течение 2003-2007 гг. в полевых условиях на экспериментальных участках научного стационара Института биологии УНЦ РАН (Уфимский район).

Разработанная биотехнология андроклиной гаплоидии яровой мягкой пшеницы состоит из нескольких этапов (рис. 2).

В условиях in vivo (посевы в поле): фенотипический отбор донорных растений, содержащих пыльники с преобладающим количеством инициальных клеток андроклинии – сильновакуолизированных микроспор (фенофаза стеблевания).

В условиях in situ (холодильная камера): стрессовая обработка изолированных колосьев отобранных донорных растений холодом (3-5°C) в течение 7 сут.

В условиях in vitro (чашки Петри и пробирки): инокуляция изолированных пыльников *in vitro* на индукционную питательную среду Potato II, получение андроклиных структур (эмбриоидов и морфогенных каллусов), перенос андроклиных структур на среду для регенерации Blaydes, получение гаплоидных растений-регенерантов в фазе кущения.

В условиях ex vitro (вегетационные сосуды): дигаплоидизация растений-регенерантов путем колхицинирования, выращивание андроклиных растений-регенерантов по фенофазы полной спелости зерна и получение семян.

Рассмотрим цито-гистологические аспекты каждого из этапов биотехнологии андроклиной гаплоидии яровой мягкой пшеницы.

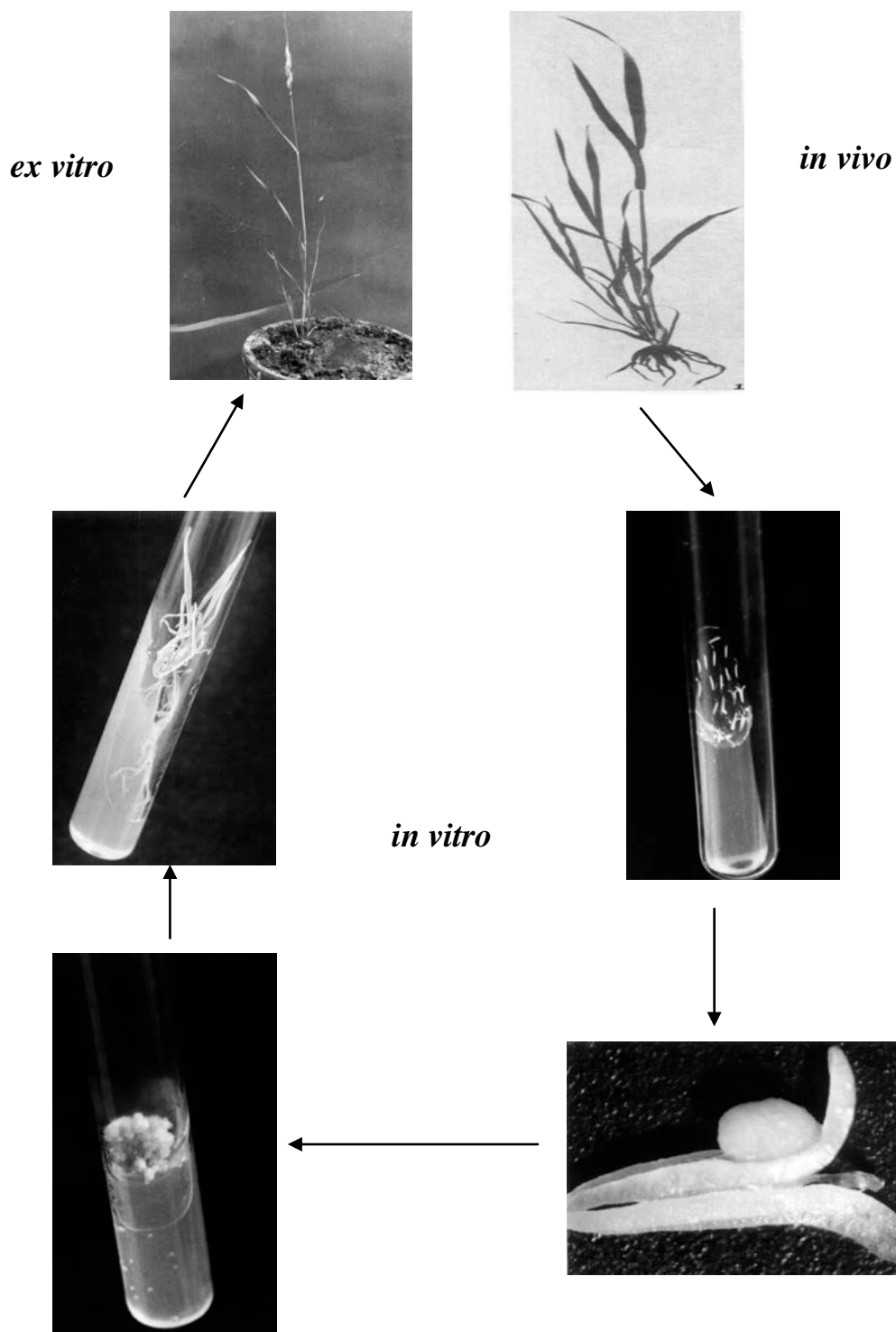


Рис. 2. Основные этапы биотехнологии андроклиной гаплоидии яровой мягкой пшеницы (схема).

В условиях in vivo: фенотипический отбор донорного растения; *в условиях in vitro:* инокуляция пыльников на питательную среду, получение андроклиных структур и растений-регенерантов; *в условиях ex vitro:* выращивание растений-регенерантов

1.1. Отбор донорного растения

Цито-гистологический анализ развития пыльника пшеницы

Пыльник – фертильная часть тычинки, в микроспорангиях которой осуществляется микроспорогенез, образуются и созревают пыльцевые зерна [Камелина, 1994] (рис. 3).



Рис. 3. Зрелые пыльники пшеницы линии Фотос.
Макросъемка, х5

Пыльник – специализированный целостный орган, состоящий из высокоспециализированных тканей общего происхождения, основная функция которого в естественных условиях связана с формированием мужских гамет – спермиев. Ряд исследователей [Батыгина, 1974, 1987; Резникова, 1984; Круглова, 1999, 2001] показали необходимость системного подхода к генезису пыльника.

В ходе цито-гистологических исследований получены данные о развитии пыльника изучаемых сортов и линии яровой мягкой пшеницы от момента заложения тычиночного бугорка до зрелого пыльника.

Изученные сорта и линия яровой мягкой пшеницы *и сорт озимой ржи* различались по темпам индивидуального развития, развития колоса, колосков, цветков, пыльников. Кроме того, эти темпы зависели и от метеорологических условий вегетационного сезона. Однако в целом этапы органогенеза, во время которых происходит развитие колоса, колосков, цветков и пыльников, а также последовательность дифференциации колосков (начало – в средней части колоса и далее акропетально и базипетально) совпадали у всех изученных объектов и

соответствовали данным, хорошо известным для яровой мягкой пшеницы (например [Куперман с соавт., 1955; Батыгина, 1974, 1987; Куперман, 1977; Челак, 1991]).

На рис. 4 приведена схема развития колоса, колоска и цветка изученных сортов и линии яровой мягкой пшеницы.

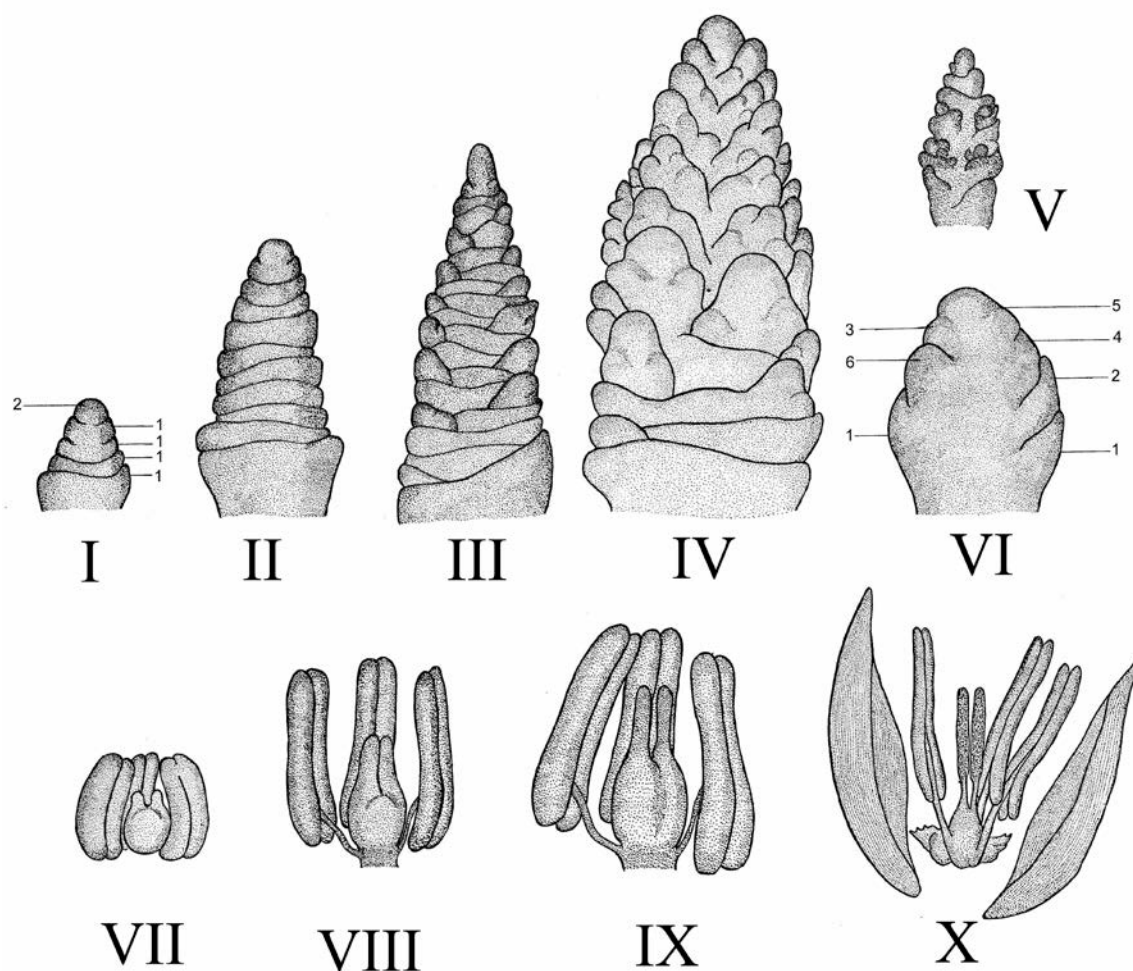


Рис. 4. Развитие колоса, колоска и цветка изученных сортов и линии яровой мягкой пшеницы (схема).

I-III – развитие апекса побега: I – вегетативный апекс побега (1 – примордии листьев, 2 – апекс); II – переходный апекс побега; III – дифференциация осей 2-го порядка; IV-V - морфогенез колоса: IV – дифференциация осей 3-го порядка; V – дифференциация колосков; VI-IX – морфогенез колоска и генеративных структур: VI – морфогенез 1-го колоска (1 – примордии колосковых чешуй, 2 – примордий нижней цветковой чешуи, 3 – примордий верхней цветковой чешуи, 4 – тычиночный бугорок, 5 – бугорок завязи, 6 – примордий 2-го колоска); VII-IX – развитие тычинок и пестика, X – зрелый цветок

Важная методологическая проблема биотехнологии андроклиной гаплоидии пшеницы, связанная с использованием данных цито-гистологических исследований, – разработка периодизации развития пыльника как сложной интегрированной системы.

На основании цитоморфологического и цитохимического анализа развития как спорогенных клеток и их производных, так и клеток различных слоев стенки гнезда пыльника С.А. Резникова [1984] выделяет премейотический, мейотический и постмейотический периоды в развитии пыльника. R. Goldberg *et al.* [1993], изучая генетическую регуляцию развития пыльника покрытосеменных, выделяют две фазы развития пыльника: первая – закладка тычиночного бугорка и дифференциация тканей, вторая – деградация ряда тканей и вскрывание пыльника.

Мы предлагаем свой вариант периодизации развития пыльника пшеницы, основанный на детальных цито-гистологических исследованиях [Круглова, 1999; 2001]. Учитывая процессы формирования, дифференциации и специализации как тканей стенки гнезда, так и спорогенной ткани, в генезисе пыльника как целостной генеративной структуры выделяются *периоды* развития (формирования пыльника, сформированного пыльника, созревания пыльника, зрелого пыльника), тогда как в генезисе спорогенной клетки – *стадии* развития (стадия микроспороцита, стадия микроспоры, стадия пыльцевого зерна; стадия «микроспора» подразделяется на *фазы* невакуолизированной, слабовакуолизированной и сильновакуолизированной микроспоры, стадию «пыльцевое зерно» – на *фазы* двухклеточного и трехклеточного пыльцевого зерна) (табл. 1.).

Приведем оригинальные цито-гистологические данные по развитию пыльника яровой мягкой пшеницы с применением указанной периодизации развития пыльника.

**Периодизация развития пыльника пшеницы
как сложной интегрированной системы**

<i>Цито-гистологические события, происходящие в пыльнике</i>		<i>Название периода</i>
Заложение тычиночного бугорка; дифференциация тычиночного бугорка на пыльник и тычиночную нить; выделение в субэпидермальном слое лопасти пыльника клеток археспория, из которых формируются спорогенная ткань и ткани стенки гнезда пыльника		Период формирования пыльника
<i>Цитологические события, происходящие в спорогенной клетке и ее производных</i>	<i>Цито-гистологические события, происходящие в тканях стенки гнезда пыльника</i>	
Формирование спорогенной ткани в результате периклиналиных делений клеток археспория	Формирование тканей стенки гнезда пыльника	
Формирование и развитие микроспороцита; мейотические деления микроспороцита	Сформированные ткани стенки гнезда пыльника	Период сформированного пыльника
Формирование тетрады микроспор; развитие тетрады микроспор; распад тетрады микроспор; формирование и развитие невакуолизированной микроспоры; формирование и развитие слабовакуолизированной микроспоры; формирование и развитие сильновакуолизированной микроспоры; митотическое деление микроспоры; формирование и развитие двуклеточного пыльцевого зерна; митотическое деление генеративной клетки; формирование и развитие трехклеточного зерна	Развитие и специализация тканей стенки гнезда пыльника Дегенерация клеток тапетума и среднего слоя; кутинизация оболочек клеток экзотеция; формирование фиброзных утолщений в оболочках клеток эндотеция	Период созревания пыльника
Зрелое пыльцевое зерно	Кутинизированный экзотеций, эндотеций с фиброзными утолщениями, тапетальная оболочка с орбукулами	Период зрелого пыльника

Период формирования пыльника

Начало развития пыльника связано с заложением тычиночного бугорка в примордии цветка, активными митотическими делениями его клеток и выделением клеток однослойного **археспория** в субэпидермальном слое меристемы. Визуально выделить клетки археспория из окружающей меристемы можно лишь незадолго до отделения ими клеток париетального слоя по морфологическим показателям: значительное увеличение в размерах, интенсивно окрашивающаяся цитоплазма, крупные ядра с 1-2 ядрышками (рис. 5, 6).

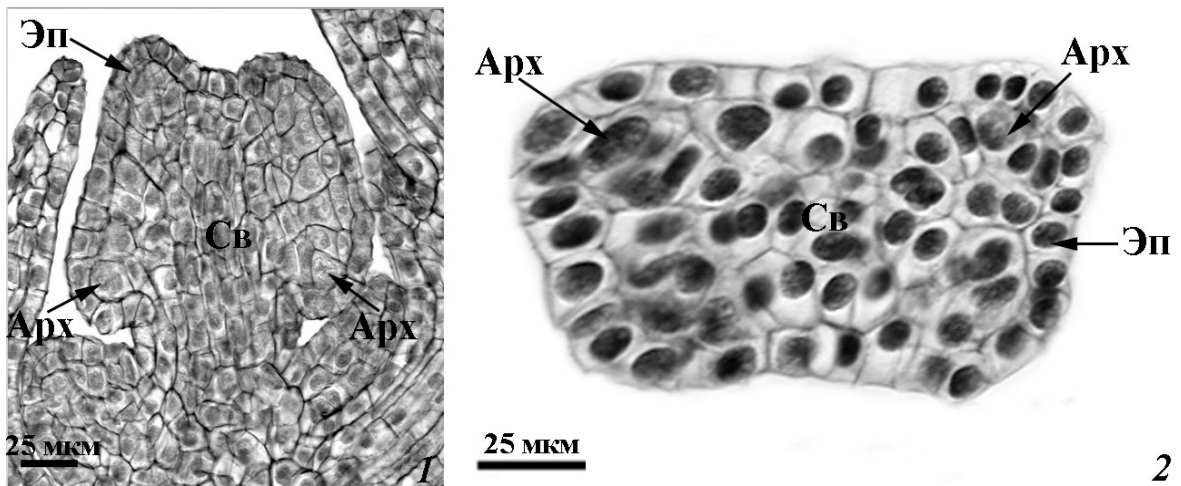


Рис. 5. Выделение клеток археспория в меристеме тычиночного бугорка цветка пшеницы. 1 – продольный срез; 2 – поперечный срез. Условные обозначения: Арх – археспорий, Св – связник, Эп – эпидермис

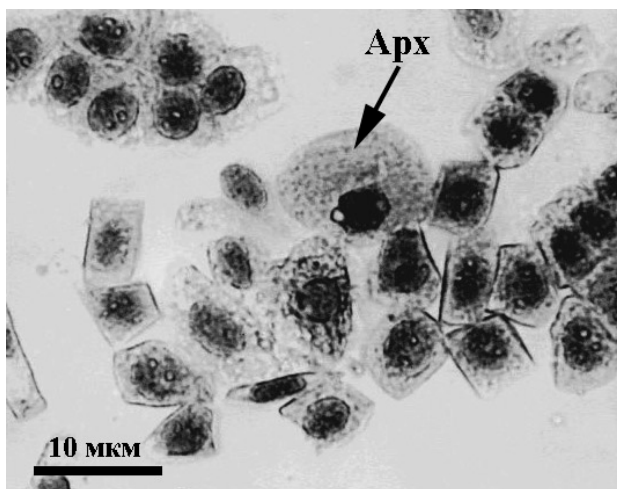


Рис. 6. Клетка археспория среди клеток тычиночного бугорка цветка пшеницы. Временный давленный препарат. Условное обозначение: Арх – археспорий

Клетки археспория в процессе роста всего пыльника претерпевают антиклинальные деления, что ведет к увеличению их количества по длине пыльника (рис. 7). В ходе развития пыльник увеличивается в размерах за счет антиклинальных делений. Общий рост пыльника обеспечивают также многочисленные клеточные деления в связнике.

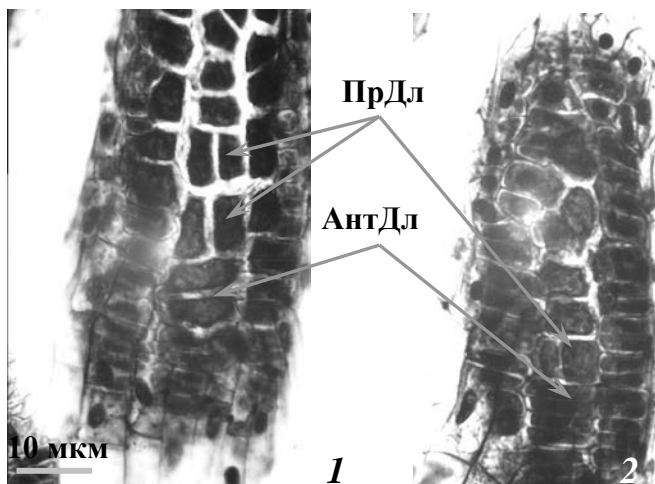


Рис. 7. Периклиальные и антиклинальные деления клеток пыльника пшеницы. 1, 2 – продольные срезы. Условные обозначения: АнтДл – антиклинальные деления, ПрДл – периклиальные деления

В ходе дальнейшего развития каждая клетка археспория делится периклиально (рис. 7), отделяя к центру гнезда пыльника **спорогенную клетку**, а в сторону эпидермиса – клетку парietального слоя. Параллельно со стороны связника некоторые клетки меристемы дифференцируются в парietальные клетки, окружая спорогенные клетки. Таким образом, в ходе развития пыльника в каждой лопасти формируется тяж спорогенных клеток, окруженный кольцом парietальных клеток двойственного происхождения. Тапетум и средний слой представляют собой конечные продукты деления клеток парietального слоя.

На рис. 8 представлены поперечный и продольный срезы пыльника пшеницы с формирующимися как спорогенными клетками, так и клетками тканей гнезда стенки: экзотеций (бывший эпидермис меристематического тычиночного бугорка), эндотеций, средний слой, тапетум. Отдельные спорогенные клетки приведены на рис. 9.

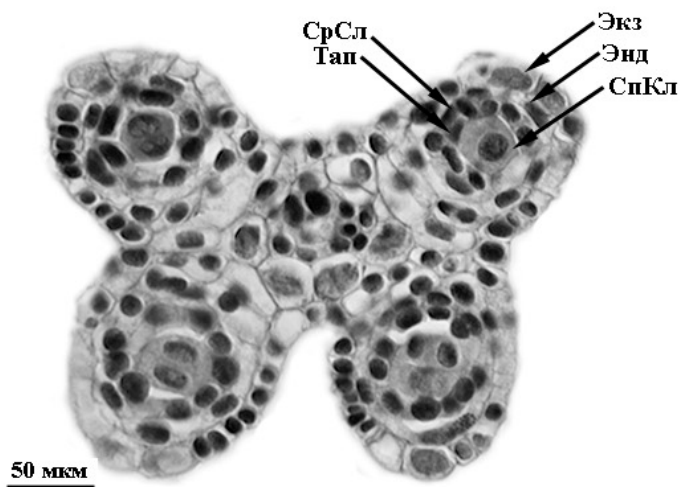


Рис. 8. Формирование спорогенных клеток и клеток тканей стенки гнезда пыльника пшеницы. Поперечный срез. Условные обозначения: СпКл – спорогенная клетка, СрСл – средний слой, Тап – тапетум, Экз – экзотеций, Энд – эндотеций

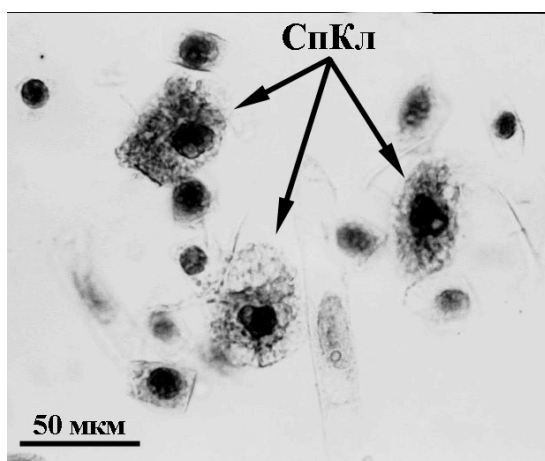


Рис. 9. Спорогенные клетки в пыльнике пшеницы. Временный давленный препарат. Условное обозначение: СпКл – спорогенная клетка

Период сформированного пыльника

В процессе дальнейшего развития спорогенные клетки преобразуются в *микроспороциты* характерной для злаков клиновидной формы, широким основанием плотно прилегающие к тапетуму. Микроспороциты располагаются одним слоем, прилегающим к стенке пыльника.

Спорогенный комплекс пшеницы состоит из 4-6 микроспороцитов. Стенка пыльника при этом характеризуется наличием окончательно сформированных тканей: экзотеций, эндотеций, средний слой, тапетум.

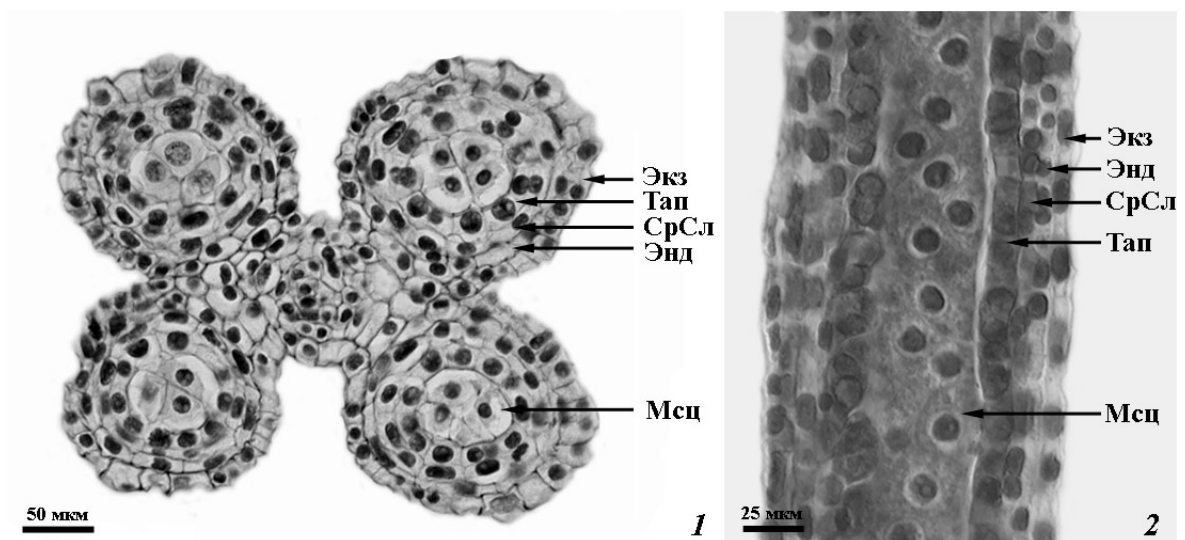


Рис. 10. Пыльник пшеницы со сформированными тканями стенки гнезда, содержащий сформированные микроспороциты. 1 – поперечный срез; 2 – фрагмент продольного среза. Условные обозначения: Мсц – микроспороцит, СрСл – средний слой, Тап – тапетум, Экз – экзотеций, Энд – эндотеций

На рис. 10 и 11 приведены срезы пыльников пшеницы со сформированными тканями стенки, содержащих сформированные микроспороциты. Отдельные сформированные микроспороциты отражены на рис. 12.

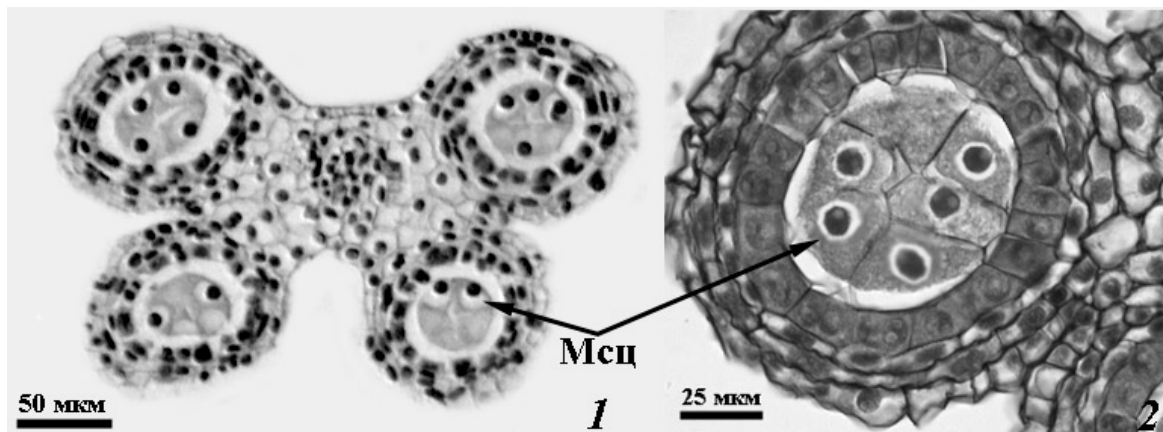


Рис. 11. Пыльник пшеницы, содержащий сформированные микроспороциты. 1 – поперечный срез; 2 – поперечный срез. Условное обозначение: Мсц – микроспороцит

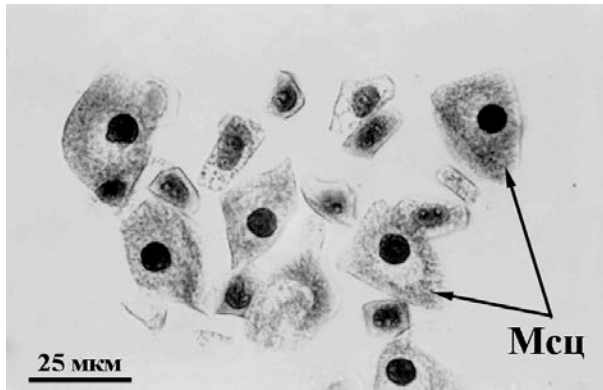


Рис. 12. Сформированные микроспороциты в пыльнике пшеницы. Временный давленный препарат. Условное обозначение: Мсц – микроспороцит

Далее микроспороциты вступают в мейоз, как известно, состоящий из двух делений (I и II), каждое из которых представлено последовательно сменяющимися друг друга фазами.

Наиболее продолжительная фаза мейоза микроспороцитов – профазы I. В стенке гнезда начинаются активные митотические деления клеток тапетума. С этой стадии начинается формирование текальной полости с текальной жидкостью в гнездах пыльника и разрыхление тканей связника.

На рис. 13 представлены продольный и поперечный срезы пыльников пшеницы, содержащих микроспороциты в профазе I. Отдельные микроспороциты в профазе I отражены на рис. 14, 1.

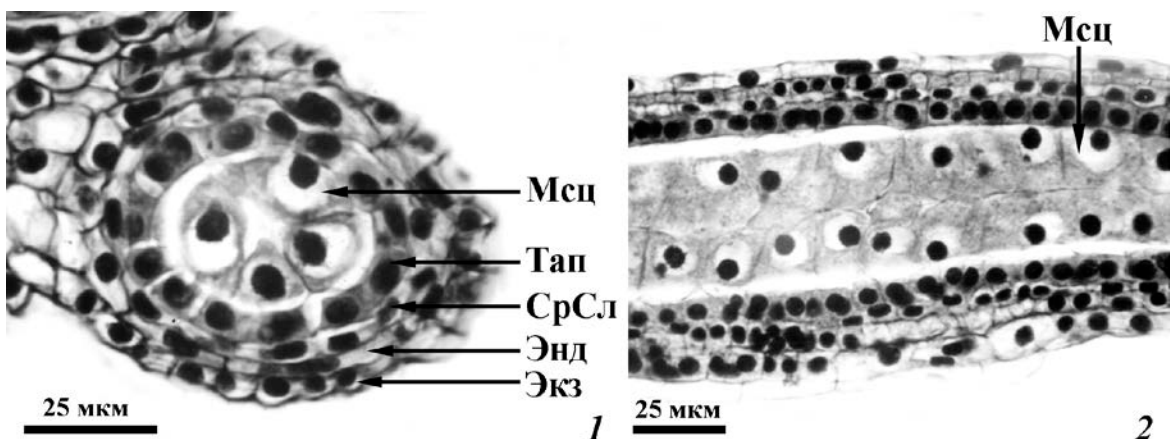


Рис. 13. Пыльник пшеницы, содержащий микроспороциты в профазе I мейоза. 1 – поперечный срез; 2 – фрагмент продольного среза. Условные обозначения: Мсц – микроспороцит, СрСл – средний слой, Тап – тапетум, Экз – экзотеций, Энд – эндотеций

В ядрах микроспороцитов профазы I формируется синаптонемный комплекс – плотный клубок хроматиновых нитей (рис. 14, 2).

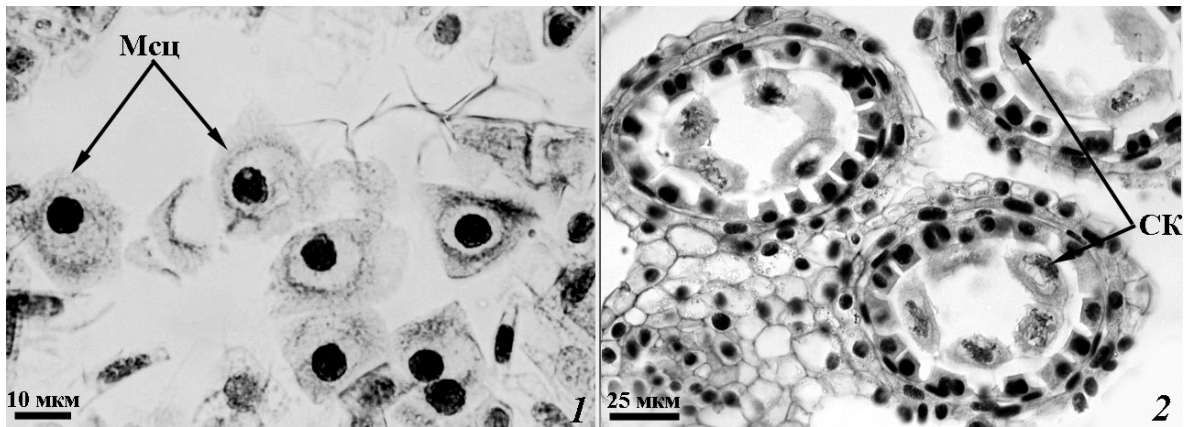


Рис. 14. Микроспороциты пшеницы в профазе I мейоза. 1 – временный давленный препарат; 2 – поперечный срез. Условные обозначения: Мсц – микроспороцит, СК – синаптонемный комплекс

Период созревания пыльника

В результате I деления мейоза микроспороцитов (рис. 15, 1) в пыльнике пшеницы формируются **диады микроспор** характерной для злаков формы: со стороны перегородки их протопласты, прямые, а с противоположной стороны – выпуклые; клетки располагаются в виде двух полулуний, обращенных друг к другу прямой стороной (рис. 15, 2).

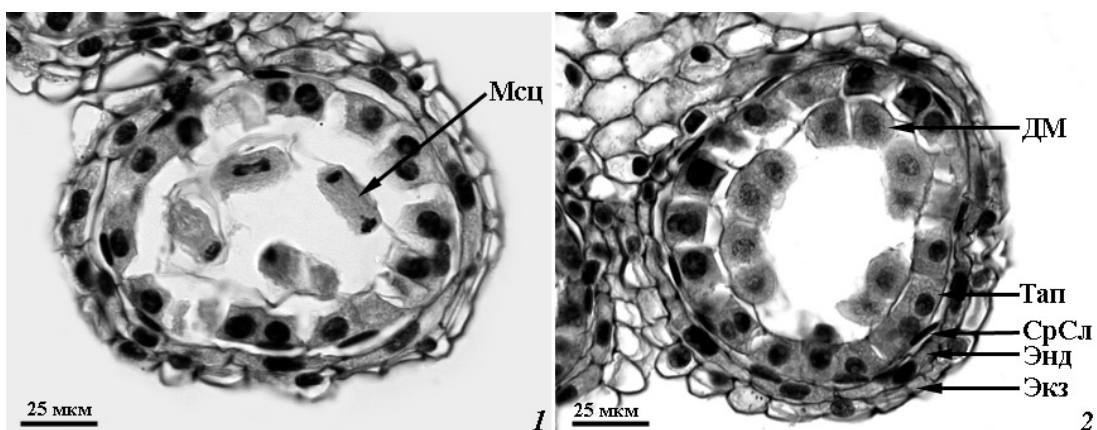


Рис. 15. Формирование диады микроспор. 1 – анафаза I микроспороцитов в пыльнике пшеницы; поперечный срез; 2 – диады микроспор в гнезде пыльника; поперечный срез. Условные обозначения: ДМ – диада микроспор, Мсц – микроспороцит, СрСл – средний слой, Тап – тапетум, Экз – экзотеций, Энд – эндотеций

Далее каждая клетка диады микроспор вступает во II деление мейоза. Веретена деления ориентируются параллельно первой перегородке, вторые клеточные перегородки – перпендикулярно к ней. В результате мейоза из каждого микроспороцита формируется изобилатеральная **тетрада микроспор** (рис. 16), четыре клетки которой находятся в одной плоскости. В пределах одной тетрады морфологических различий между микроспорами не наблюдается. Ядро располагается строго в центре клетки и имеет четко выраженное единственное ядрышко.

Далее в процессе активного роста микроспоры, ранее объединенные в тетраду, отделяются друг от друга, сильно увеличиваются в размерах, заполняют все свободные промежутки, бывшие между тетрадами. Ядра таких еще **невакуолизованных микроспор** (рис. 17, 18) лежат в центре клеток. В них отмечено несколько ядрышек, увеличение числа которых, вероятно, связано с быстрым ростом клетки. Постепенно в невакуолизованных микроспорах формируются экзина и пора прорастания.

В процессе активного роста невакуолизованные микроспоры отделяются друг от друга и значительно увеличиваются в размерах. Начинается вакуолизация микроспор. Образование вакуолей в цитоплазме микроспор происходит равномерно по всему объему клеток.

Формируются **слабовакуолизованные микроспоры**, содержащие крупное ядро с 1-2 ядрышками, которое расположено произвольно относительно поры прорастания. В тапетуме и среднем слое отмечается деформация клеток. Так, клетки среднего слоя сильно удлиняются и уплощаются, их ядрышки становятся аморфными. Цитоплазма клеток тапетума становится менее окрашивающейся, радиальные стенки клеток теряют четкие очертания (рис. 19).

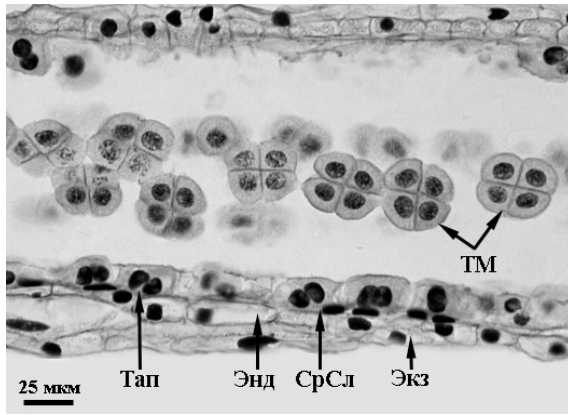


Рис. 16. Пыльник пшеницы, содержащий тетрады микроспор. Фрагмент продольного среза. *Условные обозначения:* СрСл – средний слой, Тап – тапетум, ТМ – тетрада микроспор, Экз – экзотеций, Энд – эндотеций

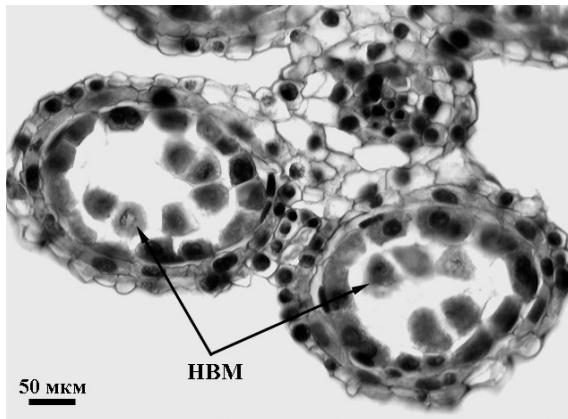


Рис. 17. Пыльник пшеницы, содержащий невакуолизованные микроспоры. Поперечный срез. *Условное обозначение:* НВМ – невакуолизованная микроспора

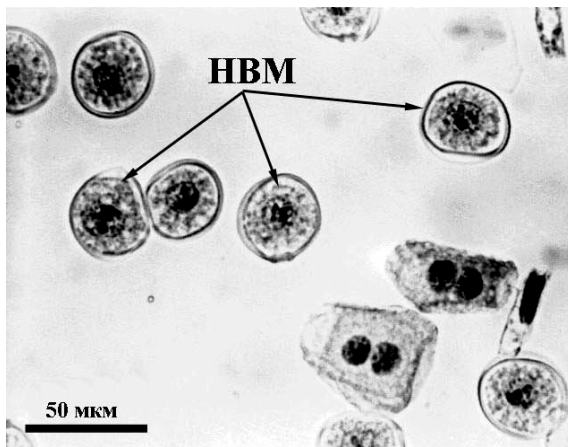


Рис. 18. Невакуолизованные микроспоры в пыльнике пшеницы. Временный давленный препарат. *Условное обозначение:* НВМ – невакуолизованная микроспора

По мере роста и развития микроспор вакуоли сливаются в одну крупную центральную вакуоль, что определяет полярность клетки. Формируются *сильновакуолизованные микроспоры* (рис. 20). Первоначально ядро микроспоры может занимать различное положение по отношению к поре прорастания, однако постепенно, будучи отодвинутым вакуолью, располагается во внутреннем районе клетки, в тонком пристенном слое цитоплазмы напротив поры (рис. 20, 2)

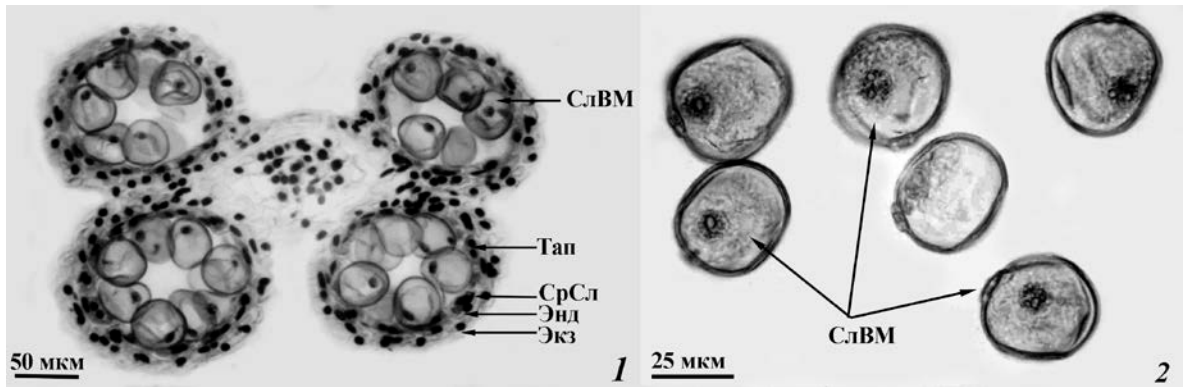


Рис. 19. Слабовакуолизованные микроспоры в пыльнике пшеницы. 1 – поперечный срез; 2 – временный давленный препарат. *Условные обозначения:* СлВМ – слабовакуолизованная микроспора, СрСл – средний слой, Тап – тапетум, Экз – экзотеций, Энд – эндотеций

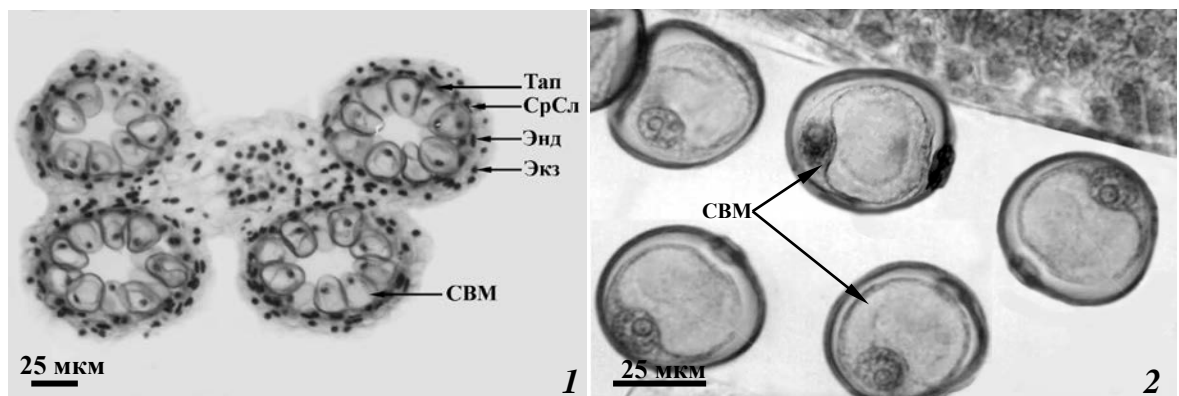


Рис. 20. Сильновакуолизованные микроспоры в пыльнике пшеницы. 1 – поперечный срез; 2 – временный давленный препарат. *Условные обозначения:* СВМ – сильновакуолизованная микроспора, СрСл – средний слой, Тап – тапетум, Экз – экзотеций, Энд – эндотеций

Заканчивается развитие оболочки микроспор.

Экзотеций становится высокоспециализированной покровной тканью: оболочки клеток утолщаются, покрываются шипиками.

Клетки эндотеция увеличиваются в размерах, однако не претерпевают каких-либо значительных изменений. В отдельных клетках начинают формироваться фиброзные утолщения.

Клетки тапетума и среднего слоя дегенерируют.

Дальнейшее развитие сильновакуолизированной микроспоры связано с ее митотическим делением по обычной схеме (рис. 21). В результате формируется система *двуклеточного пыльцевого зерна*, представленная крупной вегетативной и мелкой генеративной клетками (рис. 22, 23).

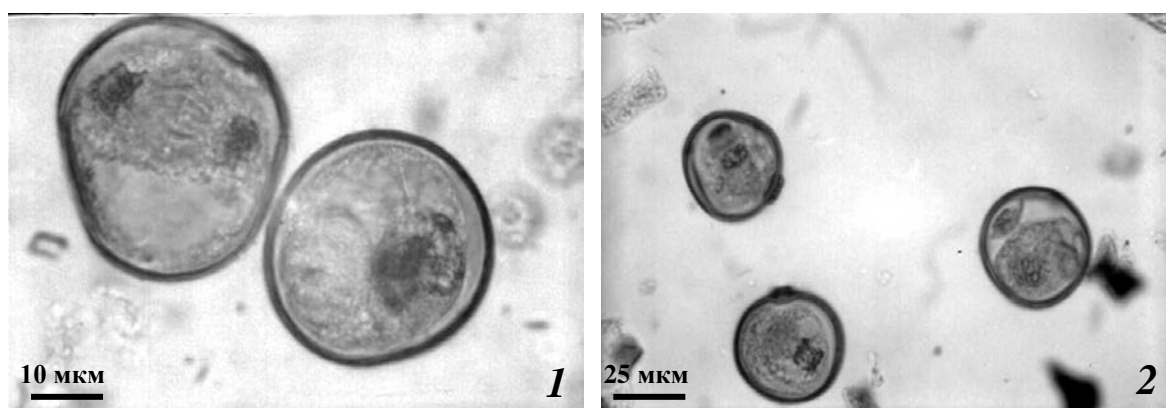


Рис. 21. Митотические деления сильновакуолизированных микроспор.
1, 2 – временные давленные препараты

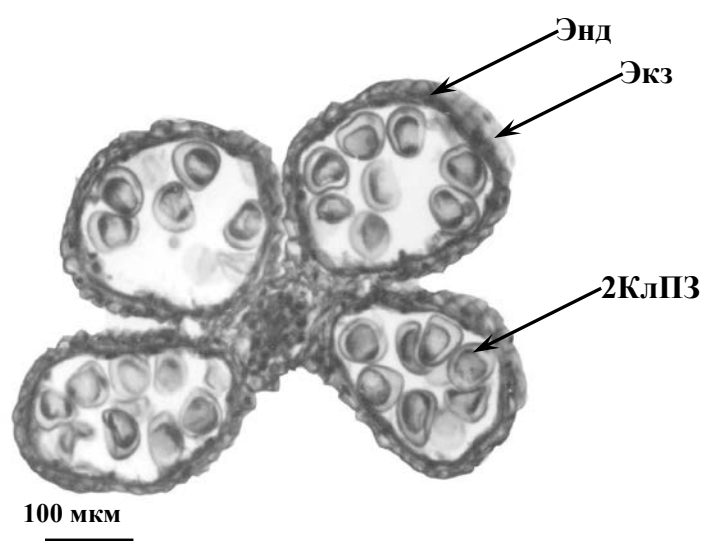


Рис. 22. Пыльник пшеницы, содержащий двухклеточные пыльцевые зерна. Поперечный срез. Условные обозначения: 2КлПЗ – двухклеточное пыльцевое зерно, Экз – экзотеций, Энд – эндотеций

В центре двухклеточного пыльцевого зерна по-прежнему находится крупная вакуоль. Ядро вегетативной клетки значительно увеличивается в размерах (рис. 23, 1,2).

Таким образом, в пыльнике заканчивается процесс микроспорогенеза и начинается процесс микрогаметогенеза.

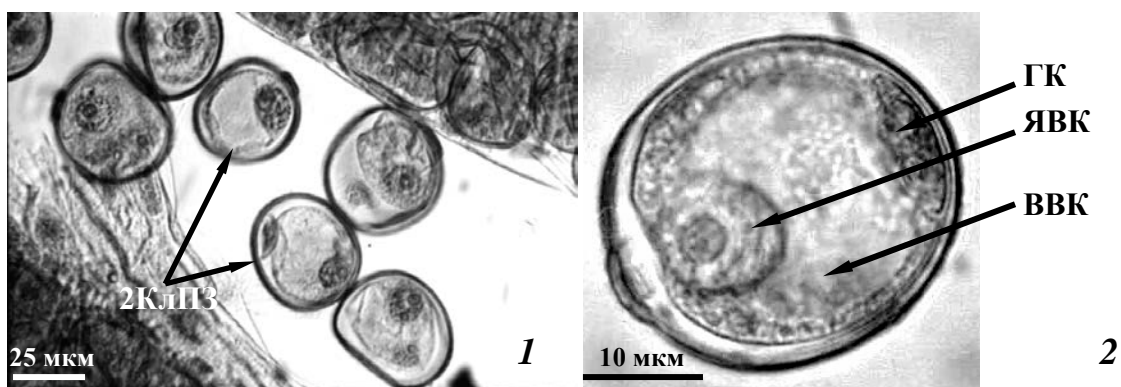


Рис. 23. Двуклеточные пыльцевые зерна в пыльнике пшеницы. 1, 2 – временные давленные препараты. Условные обозначения: 2КлПЗ – двуклеточное пыльцевое зерно, ВВК – вакуоль вегетативной клетки, ГК – генеративная клетка, ЯВК – ядро вегетативной клетки

Образовавшаяся генеративная клетка имеет в профиль характерную линзовидную форму. Основной объем этой клетки занимает ядро. Округлое ядрышко крупное, в ряде случаев число ядрышек увеличено. Цитоплазма этой клетки плотнее цитоплазмы вегетативной клетки (рис. 23, 2). Постепенно генеративная клетка округляется. В цитоплазме вегетативной клетки начинается формирование крахмальных зерен. Вакуоль постепенно уменьшается.

В стенке гнезда пыльника продолжается дегенерация клеток тапетума и среднего слоя. В оболочках всех клеток эндотеция активно развиваются фиброзные утолщения. Продолжается кутинизация оболочек клеток экзотеция.

Период зрелого пыльника

Митотическое деление генеративной клетки (рис. 24) приводит к образованию системы ***трехклеточного пыльцевого зерна***, представленного двумя клетками-спермиями и вегетативной клеткой (рис. 25, 26). Полностью формируются оболочка пыльцевого зерна и пора прорастания – *оперкулум* (рис. 26, 2).

Зрелое пыльцевое зерно пшеницы такого строения готово к процессам опыления и оплодотворения.

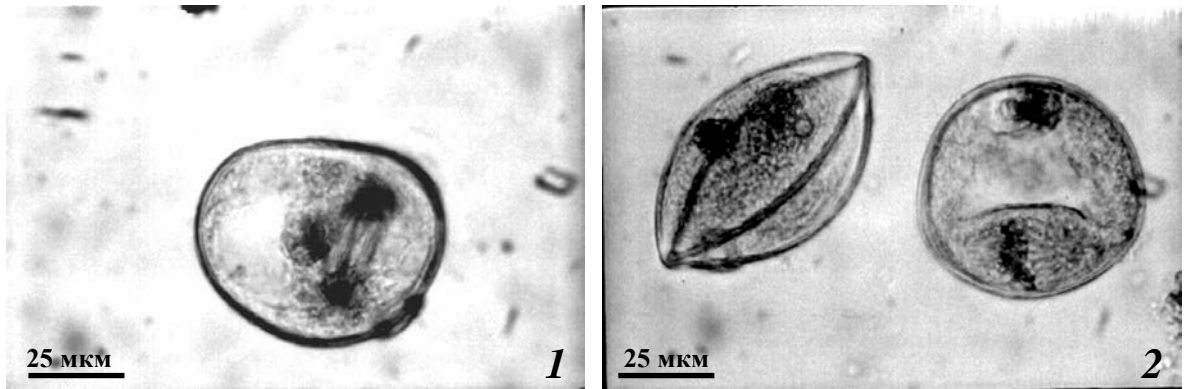


Рис. 24. Митотические деления двухклеточных пыльцевых зерен.
1, 2 – временные давленные препараты

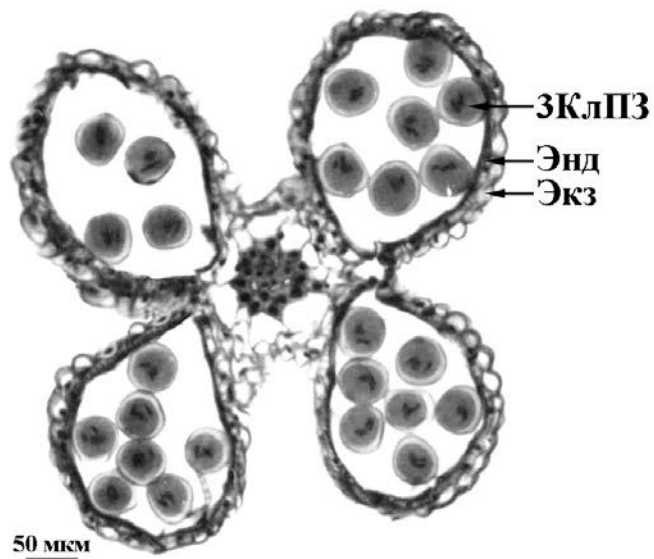


Рис. 25. Зрелый пыльник пшеницы, содержащий трехклеточные пыльцевые зерна. Поперечный срез. Условные обозначения: ЗКлПЗ – трехклеточное пыльцевое зерно, Экз – экзотеций, Энд – эндотеций

В состав стенки зрелого пыльника (рис. 25) входят узкоспециализированные ткани – экзотеций и эндотеций.

Экзотеций, служащий для защиты пыльника, представлен мощным гипертрофированным слоем; основную часть клетки экзотеция занимает крупная вакуоль, ядро располагается в пристенной части клетки; в сильноразвитой оболочке клетки имеются шипики.

В оболочках клеток эндотеция, служащего для вскрывания пыльника, достигают максимального развития фиброзные утолщения.

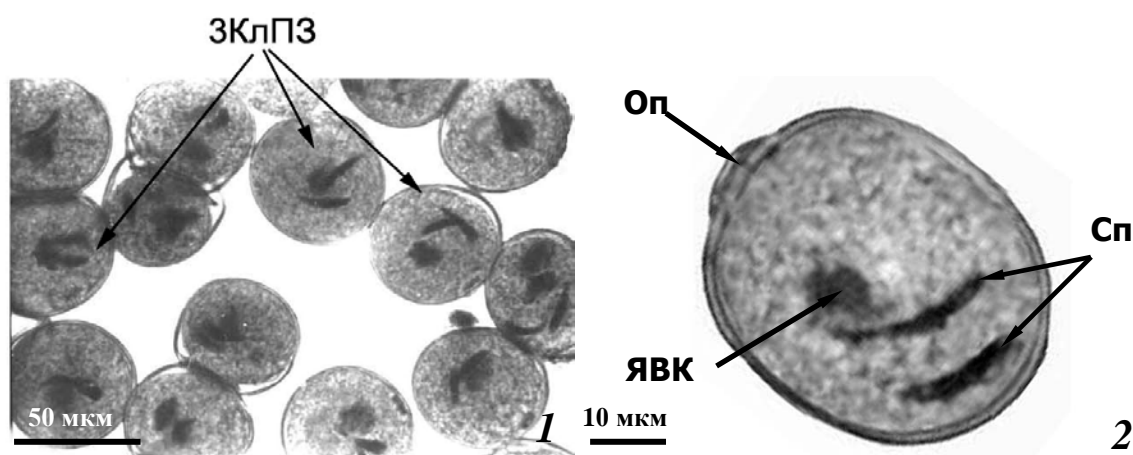


Рис. 26. Трехклеточные пыльцевые зерна в зрелом пыльнике пшеницы.
 1, 2 – временные давленные препараты. Условные обозначения: ЗКлПЗ – трехклеточные пыльцевые зерна, Оп – оперкулум, Сп – спермии, ЯВК – ядро вегетативной клетки

Полученные цито-гистологические данные по развитию пыльника пшеницы еще раз подтверждают необходимость подхода к пыльнику как интегрированной системе. К структурным элементам этой системы следует отнести спорофитные соматические ткани стенки гнезда пыльника (экзотеций, эндотеций, средний слой, тапетум) и спорогенную ткань, в конечном счете дающую начало зрелым трехклеточным пыльцевым зернам-гаметофитам (рис. 27).

Каждая из соматических тканей стенки пыльника и спорогенная ткань, развиваясь, морфологически и структурно достигают высокой специализации, связанной с выполнением основных их функций.

Не вызывает сомнения тот факт, что ход развития спорогенных клеток пыльника по гаметофитной программе, завершающейся формированием пыльцевых зерен, зависит от нормального функционирования каждой ткани стенки, тогда как аномалия в развитии спорогенных клеток или нарушение структуры стенки пыльника на любом из этапов развития могут привести к дегенерации всей системы пыльника.

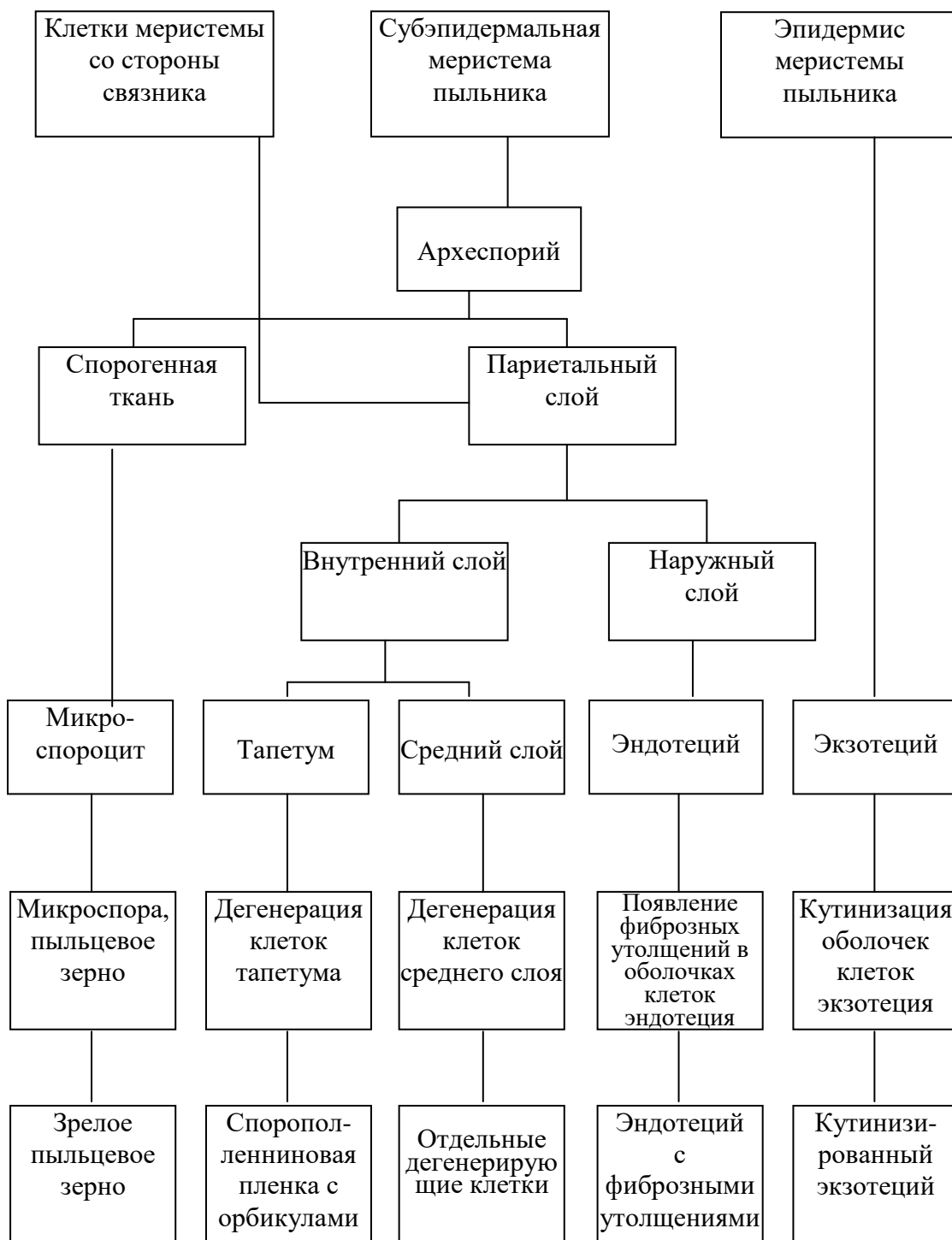


Рис. 27. Схема развития пыльника пшеницы как интегрированной системы (по [Круглова, 2001, 2002])

Инициальная клетка андроклинии

Индукция процесса андроклинии – на наш взгляд, важнейшая проблема из стоящих перед исследователями андроклинной гаплоидии, поэтому анализу этой проблемы хотелось бы уделить особое внимание.

Несмотря на большие успехи, достигнутые в области изучения андроклинии за последние годы, остается не решенным до конца вопрос о том, какие именно спорогенные клетки пыльника являются инициальными клетками андроклинии, иначе говоря, способны к индукции смены гаметофитной программы развития в условиях *in vivo* на спорофитную в условиях *in vitro*.

Под «индукцией» (лат. *inductio* – возбуждение) понимают процессы в клетке, тканях и организме в целом, вызываемые индуктором – веществом-стимулятором этих процессов [Биологический энциклопедический словарь, 1986]. В биологии развития центральное место занимает предложенное и разработанное в 20-е гг. прошлого века Г.Шпеманом учение об эмбриональной индукции – взаимодействии эмбриональных закладок, ведущем к формообразовательному эффекту посредством ткани-мишени, которая становится детерминированной к определенному типу развития; затем это детерминированное состояние реализуется в процесс дифференциации (по: [Корочкин, 1999, 2002]). В контексте проблемы индукции андроклинии в культивируемых пыльниках, на наш взгляд, необходимо разрабатывать важное понятие «мишень», однако в данном случае речь идет не о «ткани-мишени», а о «клетке-мишени» (спорогенной клетке пыльника на определенной стадии развития). В то же время, следует учитывать тот важный момент, что спорогенная клетка-мишень – это часть спорогенной ткани, входящей, в свою очередь, в интегрированную систему тканей пыльника.

Изучение проблемы индукции спорофитной программы развития спорогенной клетки пыльника должно быть также тесно связано с изучением общебиологических проблем компетенции, детерминации и дифференциации.

Как известно, под компетенцией (от лат. *competo* – совместно достигать, соответствовать, подходить) понимают физиологическое состояние реагирующей системы, в котором она способна воспринимать воздействие сигнала индуктора к детерминации и дифференциации [Биологический энциклопедический словарь, 1986].

Детерминация (лат. *determinatio* – ограничение, определение) – возникновение качественных различий между частями развивающегося индивида на стадиях, предшествующих появлению морфологически различимых закладок тканей и органов [Биологический энциклопедический словарь, 1986]. Клеточный материал считается детерминированным, если после переноса в искусственные условия способен развиться в орган, который обычно образуется из него в норме. Детерминация как процесс развития клетки (клеток) предопределена спецификой организма и оценивается как центральное событие в ходе индивидуального развития организма. Клетки реагирующей системы должны пройти определенные фазы развития, прежде чем они приобретут способность к восприятию сигналов индуктора к детерминации (по [Корочкин, 1999, 2002]).

В контексте анализируемой проблемы индукции спорофитной программы развития спорогенной клетки пыльника, на наш взгляд, понятие детерминации относится не столько к единичным спорогенным клеткам пыльника, сколько к их взаимодействию в ходе развития пыльника как системы; «снятие» детерминации поэтому в первую очередь связано с нарушениями межклеточных связей. Иначе говоря, периоды детерминации в морфогенезе пыльника в основном являются

критическими периодами с повышенной чувствительностью к действию агентов внешней среды. Однако это не дает права делать обратное заключение, и само по себе увеличение чувствительности спорогенных клеток пыльника еще не является бесспорным доказательством совершающихся в этот момент процессов детерминации.

Решение проблемы детерминации развития спорогенных клеток пыльника во многом усложняется феноменом чередования поколений в жизненном цикле растений. Как известно, внутри пыльника как специализированного органа спорофитного поколения на определенном этапе морфогенеза формируются пыльцевые зерна – гаметофитное поколение (обзор [Поддубная-Арнольди, 1976]).

J. Heslop-Harrison [1980] и H. Dickinson [1987] связывают спорофитную детерминацию развития спорогенных клеток пыльника с гипотетическими спорофитными детерминантами. Известно, что в течение профазы мейоза в пыльниках содержащаяся в цитоплазме спорогенных клеток информация, имеющая отношение к реализации спорофитной программы, в основном элиминируется при активации гаметофитной информации. По мнению авторов, небольшая часть спорофитной информации сохраняется в цитоплазме в спорофитных детерминантах – капсулах с двойной мембраной, содержащих полисомы со спорофитной мРНК и недифференцированные органеллы. При нормальном гаметофитном развитии спорогенных клеток спорофитные детерминанты, по-видимому, вовлекаются в структуру оболочки пыльцевого зерна, тогда как в экспериментальных условиях *in vitro* участвуют в формировании андроклиных регенерантов.

Возможно, спорофитные детерминанты имеют сходство с информационными частицами, обнаруженными Р. Bell [1979] в гаметофитах папоротников, размножающихся путем апогамии. Такие

информационные частицы сохраняют или реактивируют в гаметофитах спорофитную компетенцию.

На наш взгляд, андроклинию высших растений, по сути представляющую собой спорофитный морфогенез спорогенных клеток пыльника, также можно расценивать как форму апогамии, т.е. своеобразный атавизм – архаическую особенность, проявляющуюся в наследственных структурах, которые в настоящее время потеряли первоначальную функцию, но остаются в скрытом состоянии. Это мнение перекликается с мнением ряда авторов. Так, F. Bonet *et al.* [1998] объясняют пыльцевой эмбриогенез (морфогенез спорогенной клетки по спорофитной программе. – *Авт.*) с позиции эволюции пыльцевого зерна высших растений как результат атавизма в царстве растений, очевидное проявление которого обнаруживается только при определенных стрессовых условиях. Кроме того, эти исследователи предполагают филогенетическую связь спорогенных клеток пыльника со спорами древовидных птеридофитов, предполагаемых предков настоящих цветковых растений. P. Smykal [2000] высказывает мнение о филогенетической связи спорогенных клеток пыльника с мейоспорами зеленых водорослей, что также может объяснить способность к спорофитному морфогенезу спорогенной клетки пыльника.

Уже на ранних этапах работы по изучению андроклинии возникло представление о существовании в пыльниках особой фракции морфогенетически компетентных клеток, способных развиваться по спорофитному пути [Sunderland, 1983; Dunwell, 1985].

Вопрос о том, приобретает ли компетентность спорогенных клеток к спорофитному развитию только в условиях *in vitro* или морфологическим эквивалентом таких компетентных клеток являются

различного рода аномальные* клетки, уже присутствующие в пыльниках *in vivo*, до культивирования, в силу так называемого пыльцевого полиморфизма, пока не решен однозначно (обзоры [Круглова с соавт., 2000; Круглова, Куксо, 2006а]).

Дальнейшими исследованиями показана принципиальная важность стадии развития спорогенной клетки в индукции андроклинии – наличие так называемого морфогенетически компетентного «окна» – ограниченного промежутка времени, в течение которого определенные внешние стрессовые факторы способны индуцировать переключение развития спорогенных клеток на спорофитный путь (обзоры [Круглова с соавт., 2000; Круглова, Батыгина, 2001; Круглова, Куксо, 2006а]).

Экспериментально установлено, что у всех изученных сортов и линии яровой мягкой пшеницы во все года исследования при прочих равных условиях (способ стрессового воздействия, состав индукционной питательной среды) к формированию андроклинных структур (эмбриоидов и морфогенных каллусов) приводила инокуляция пыльников, содержащих абсолютное большинство (92-95 %) сильновакуолизированных микроспор. Таким образом, именно сильновакуолизированную микроспору можно считать инициальной клеткой андроклинии у пшеницы.

Эти данные совпадают с экспериментальными данными, ранее установленными для яровой мягкой пшеницы других сортов и гибридных линий [Суханов, 1983; Горбунова, 1993, 2000; Круглова,

* Как известно, в пыльнике любого злака (как и любого растения) практически во всех периодах развития имеются аномальные спорогенные клетки. Их количество, а также характер и время проявления генетически детерминированы и видоспецифичны (по: [Батыгина, 1987; Круглова, 2006а,б, 2008]). Безусловно, появление аномалий спорогенных клеток обусловлено также и аномалиями клеток стенки гнезда пыльника. Размах модификационной изменчивости аномальных спорогенных клеток достаточно велик, вплоть до изменения сексуализации пыльцевого зерна (так называемый «феномен Немеца») (подробнее об этом [Батыгина, 1994а]).

2001, 2002; Batygina, Vasilyeva, 2003; Эмбриологические основы..., 2005; От микроспоры к сорту, 2008], а также с данными по другим хлебным злакам [Hoekstra *et al.*, 1997; Reynolds, Crawford, 1997; Immonen, Antilla, 1998; Тураев, 1998; Guo, Pulli, 2000; Immonen, Robinson, 2000; Игнатова, 2004; Белинская, 2008].

На рис. 28 приведены морфологические и цито-гистологические данные по пыльнику пшеницы линии Фотос, содержащему инициальные клетки андроклинии – сильновакуолизированные микроспоры.



Рис. 28. Пыльники пшеницы, содержащие сильновакуолизированные микроспоры. 1. Макросъемка, x10; 2. Макросъемка, x90; 3. Поперечный срез гнезда пыльника. Условные обозначения: СВМ – сильновакуолизированная микроспора, СрСл – средний слой, Тап – тапетум, Экз – экзотеций, Энд – эндотеций; an – пыльник, ld – лодичула

С позиции подхода к пыльнику как к сложной интегрированной системе необходимо учитывать состояние всех его тканей в любой момент развития. Особенно важен анализ тканей стенки гнезда пыльника, содержащего морфогенетически компетентные

сильновакуолизированные микроспоры. У яровой мягкой пшеницы такие ткани имеют следующий статус: хорошо развитые экзотеций и эндотеций, дегенеровавшие средний слой и тапетум (рис. 28, 3).

Следует подчеркнуть тот важный факт, что на постоянных препаратах все микроспоры до воздействия *in situ* холодом прикреплены к стенке пыльника, что обеспечивает питание микроспор, определяет их полярность, а в целом в естественных условиях обуславливает развитие микроспор по гаметофитной программе.

Ответ на вопрос о том, почему именно сильновакуолизированная микроспора является инициальной клеткой андроклинии, по-видимому, следует искать в концепции критических периодов развития пыльника [Резникова, 1984; Батыгина, 1987, 1993б, 1994б; Batygina, 2002; Batygina, Vasilyeva, 2003]. Согласно данной концепции, в морфогенезе пыльника отмечаются критические периоды, главным признаком которых следует считать повышение чувствительности спорогенных клеток к действию внешних стрессовых агентов. В контексте анализируемой проблемы критическим следует назвать период развития пыльника, содержащего спорогенные клетки в критической фазе развития, морфогенетически компетентные к переключению гаметофитного пути морфогенеза *in vivo* на спорофитный *in vitro* под действием стрессового воздействия.

Естественно, критический период определяется морфогенетическими особенностями всех тканей пыльника и соотносим с его физиолого-биохимическими показателями. Таким образом, пыльник в критический период развития содержит такие спорогенные клетки, которые находятся в критической стадии и морфогенетически компетентны к переключению программы развития с гаметофитного на спорофитный путь в условиях *in vitro* под действием внешних стрессовых факторов. Во многом такая компетентность определяется тотипотентностью спорогенных клеток.

Понятие «тотипотентность», предложенное G. Haberlandt [1909] и разработанное в цикле работ Р.Г. Бутенко [1964, 1970, 1975а,б, 1990а,б, 1994, 1999] и Т.Б. Батыгиной [1987], кратко сводится к следующему. Тотипотентность – свойство клетки, имеющей все морфогенетические возможности (т.е. весь потенциал), присущие данной особи и реализующиеся различными путями морфогенеза. Конечный результат этого свойства, его способы и формы реализации могут быть различными, они обусловлены степенью тотипотентности клетки (понятие введено Т.Б. Батыгиной [1987]). Степень тотипотентности клеток видоспецифична и определяется совокупностью факторов и в первую очередь системой (ткань, орган, организм), из которой была взята клетка.

С практической точки зрения критический период развития пыльника наиболее благоприятен для получения максимального количества андроклиных гаплоидов из исходно нормально развивающихся спорогенных клеток.

Таким образом, в контексте анализируемой проблемы можно сделать вывод о том, что пыльник в критический период развития содержит такие спорогенные клетки, которые морфогенетически компетентны к переключению программы развития с гаметофитного на спорофитный путь в условиях *in vitro*, а именно – сильновакуолизированные микроспоры.

Способность сильновакуолизированной микроспоры к смене пути развития при воздействии индуцирующего стрессового фактора определяется, по нашему мнению, рядом обстоятельств.

Первое из них – предмитотическое состояние клетки. Такой статус сильновакуолизированной микроспоры ведет к тому, что эта фаза характеризуется меньше всего стабильной дифференциацией (в

терминологии С.А. Резниковой [1984]). Возможно, в данном случае действуют молекулярные механизмы I-го гаплоидного митоза.

Второе – определенное структурное сходство сильновакуолизированной микроспоры и зрелой яйцеклетки (согласно периодизации развития яйцеклетки и зиготы [Батыгина, Васильева, 1997б]): это наличие крупного ядра и хорошо развитой центральной вакуоли, апикально-базальная организация клетки (рис. 29). По-видимому, существует принципиальное сходство морфологии инициальных клеток растений при различных системах репродукции [Батыгина, 2000а].

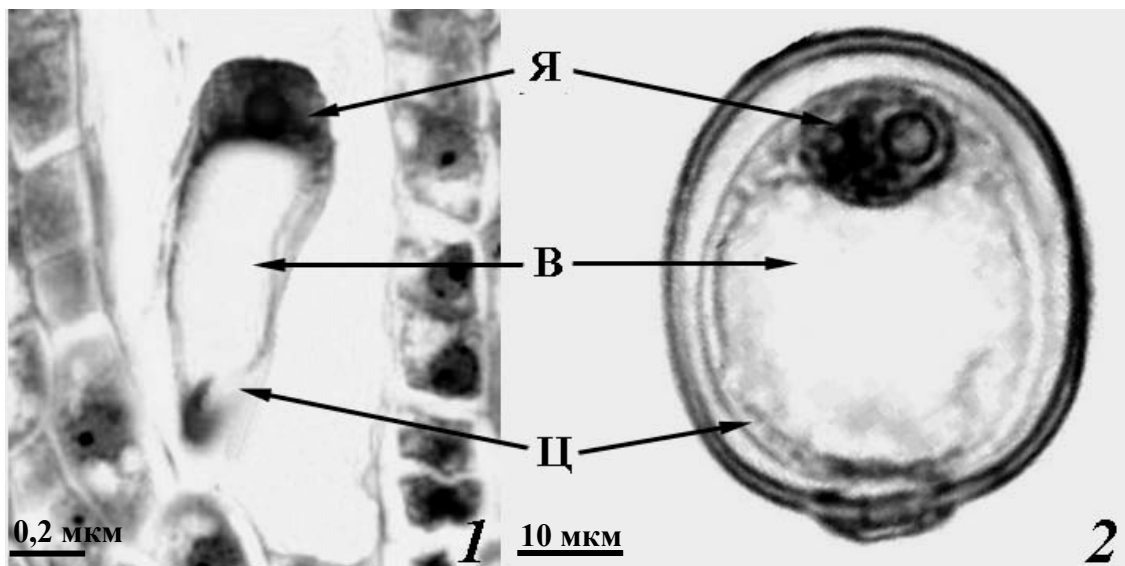


Рис. 29. Структурное сходство зрелой яйцеклетки и сильновакуолизированной микроспоры пшеницы (схема). 1 – яйцеклетка, постоянный препарат; 2 – сильновакуолизированная микроспора, временный давленный препарат. Условные обозначения: В – вакуоль, Ц – цитоплазма, Я – ядро

Все эти обстоятельства характеризуют сильновакуолизированную микроспору как чрезвычайно активную и «напряженную» систему. Действие любого стрессового внешнего фактора способно нарушить «динамическое равновесие» системы и индуцировать нетрадиционное спорофитное развитие такой клетки.

1.2. Холод как триггер спорофитной программы морфогенеза микроспоры *in vitro*

В результате многочисленных исследований на примере представителей различных семейств растений выявлено, что именно стрессовое воздействие на пыльники *in situ*, перед их инокуляцией на питательную среду *in vitro*, способствует индукции андроклинии, иначе говоря, переключению гаметофитной программы развития спорогенных клеток пыльника на спорофитную (обзор [Круглова, Куксо, 2006б]).

В литературе сообщается о различных стрессовых способах индукции андроклинии у злаков (при этом стрессовое воздействие испытывают либо донорные растения в целом, либо изолированные соцветия, цветки, пыльники, микроспоры). Абсолютное большинство исследователей сообщают о принципиальной необходимости предварительного стрессового воздействия на пыльники донорных растений низкими положительными температурами (от +3⁰С до +7⁰С) в течение определенного времени – так называемая холодовая предобработка (cold pretreatment) [Белинская, 2005; Білінська, 2006; обзор [Круглова, Куксо, 2006б]).

Холодовая предобработка пыльников составляет важный этап и разработанной нами биотехнологии массового получения растений-регенерантов андроклинного происхождения у яровой мягкой пшеницы [От микроспоры к сорту, 2008]. Особенно большое значение придается продолжительности холодового воздействия на изолированные колосья пшеницы *in situ*, поскольку превышение такого воздействия ведет к появлению альбиносных регенерантов, крайне нежелательных в селекционно-генетической практике [Галиева, 2001; Галиева с соавт., 2002, 2005; Галиева, Круглова, 2005].

Экспериментально выявлено, что индукции андроклинии способствует стрессовое воздействие холодом *in situ* на пыльники перед

их размещением на питательной среде *in vitro* в экспериментально подобранном режиме ($+4\pm 1^{\circ}\text{C}$, 7 сут).

Единое мнение о цито–гистологических изменениях в пыльниках, подверженных стрессовому воздействию *in situ* для индукции андроклинии *in vitro*, в литературе отсутствует. Возможно, отсутствие единства мнения в данном случае во многом обусловлено тем, что сама природа стрессового эффекта на клеточном и тканевом уровнях пока полностью не объяснена.

Согласно данным цито-гистологического анализа, стрессовое воздействие холодом провоцирует отрыв микроспор от стенки пыльника пшеницы (рис. 30, 1), тем самым нарушая целостность пыльника как интегрированной системы и морфогенетические корреляции между тканями стенки пыльника и микроспорами. Кроме того, отрыв приводит к нарушению полярности микроспоры (рис. 30, 2). Таким образом, в «оторвавшихся» микроспорах подавляется экспрессия гаметофитной программы развития и нарушается детерминация нормального развития трехклеточного пыльцевого зерна (гаметофита).

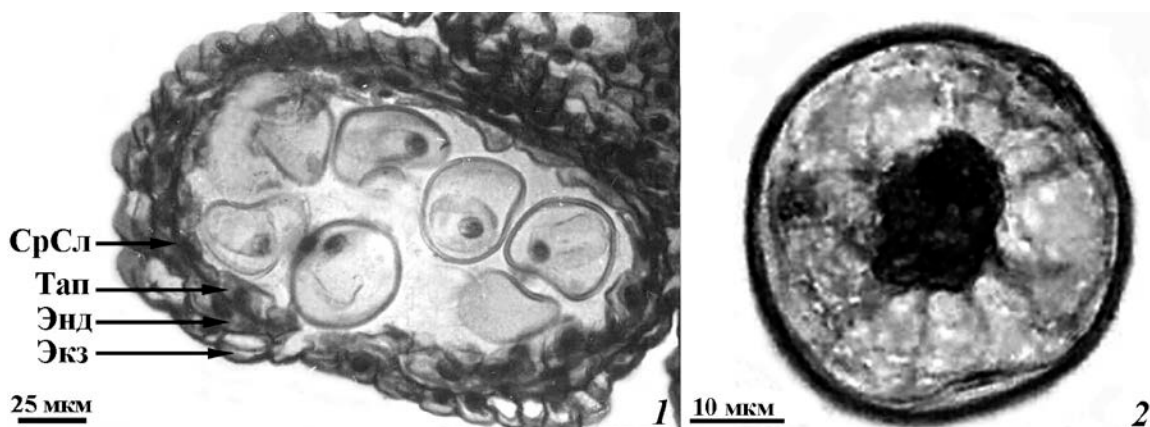


Рис. 30. Изменение статуса пыльника пшеницы и сильновакуолизированной микроспоры после холодового воздействия *in situ* в режиме $+4\pm 1^{\circ}\text{C}$, 7 сут. 1 – отрыв сильновакуолизированных микроспор от стенки гнезда; поперечный срез; 2 – деполяризация сильновакуолизированной микроспоры; временный давленный препарат. Условные обозначения: СрСл – средний слой, Тап – тапетум, Экз – экзотеций, Энд – эндотеций

1.3. Цитологический мониторинг начальных этапов культивирования пыльников *in vitro*

Пыльники критического периода развития после стрессового воздействия низкими положительными температурами инокулируют на индукционную питательную среду Potato II с определенной концентрацией синтетического гормона ауксинового действия 2,4-Д, индуцирующего тот или иной путь морфогенеза *in vitro* по спорофитной программе – эмбриоидогенез или гемморизогенез.

Возникают вопросы: как меняется статус клеток пыльника в различных условиях культивирования *in vitro*? Каковы пути их развития внутри пыльников, культивируемых на индукционных питательных средах с различной концентрацией 2,4-Д? Все ли клетки вступают на путь морфогенеза по спорофитной программе?

Для того чтобы получить ответы на эти вопросы, был проведен цитологический мониторинг статуса клеток пыльников критического периода развития, инокулированных после стрессового воздействия на индукционные питательные среды с различной концентрацией 2,4-Д. В качестве модельного объекта была выбрана линия яровой мягкой пшеницы Фотос. Предварительно путем определения эндогенного содержания ИУК в вегетативных органах и пыльниках критического периода развития было установлено, что эта линия относится к условной группе «низкоауксиновых» [Seldimirova *et al.*, 2005; Сельдимирова, 2006; Круглова с соавт., 2006], что позволило сузить поиск концентрации синтетического гормона 2,4-Д в составе индукционной питательной среды Potato II, необходимой для регуляции спорофитных путей развития микроспор *in vitro* в пыльниках этой гибридной линии.

Экспериментально установлено, что к индукции эмбриоидогенеза *in vitro* вела инокуляция пыльников критического периода развития на среду с концентрацией 2,4-Д, равной 0.5 мг/л, к индукции

гемморизогенеза *in vitro* – инокуляция пыльников критического периода развития на среду с концентрацией 2,4-Д, равной 1.5 мг/л.

Как у всех изученных объектов, пыльники пшеницы линии Фотос характеризуются асинхронностью развития спорогенных клеток. В изученных пыльниках критического периода *in vivo* (до холодого воздействия) одновременно наблюдались спорогенные клетки нормальной морфологии в таких последовательных стадиях развития, как микроспора (фазы слабовакуолизированной микроспоры и сильновакуолизированной микроспоры) и пыльцевое зерно (фаза двухклеточное пыльцевое зерно) (рис. 31). Их количество составляло в среднем соответственно 3 %, 92 %, 5 % от количества просмотренных спорогенных клеток в 100 пыльниках критического периода развития (при 10-кратной повторности).

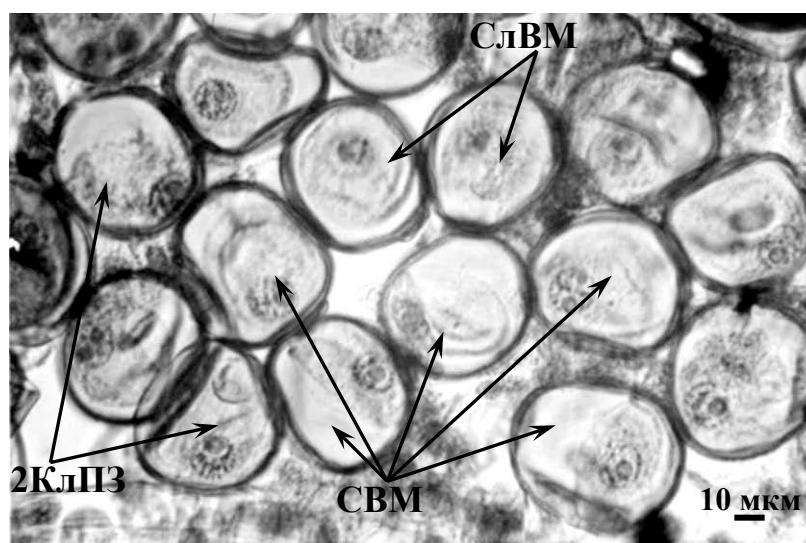


Рис. 31. Полиморфизм спорогенных клеток в пыльниках пшеницы линии Фотос *in vivo*, обусловленный асинхронностью их развития. Временный давленный препарат. Условные обозначения: 2КлПЗ – двухклеточное пыльцевое зерно, СВМ – сильновакуолизированная микроспора, СлВМ – слабовакуолизированная микроспора

Продолжительность цитологического мониторинга определяли по времени появления на поверхности культивируемых *in vitro* пыльников: эмбриоидов – на 21-24 сут от инокуляции пыльников, морфогенных каллусов – на 28-32 сут от инокуляции пыльников.

При концентрации 2,4-Д, равной 0.5 мг/л, на 3 сут культивирования пыльников *in vitro* отмечены начальные этапы спорофитного развития части сильновакуолизированных микроспор по пути эмбриоидогенеза, продолжение гаметофитного пути развития части сильновакуолизированных микроспор; остановка в развитии части слабовакуолизированных микроспор и двуклеточных пыльцевых зерен в том статусе, который отмечен для них при инокуляции пыльников на индукционную питательную среду; дегенерация части слабовакуолизированных микроспор и двуклеточных пыльцевых зерен. На 21 сут культивирования пыльников отмечены эмбриоиды и трехклеточные пыльцевые зерна; остальные спорогенные клетки дегенерировали (рис. 32).

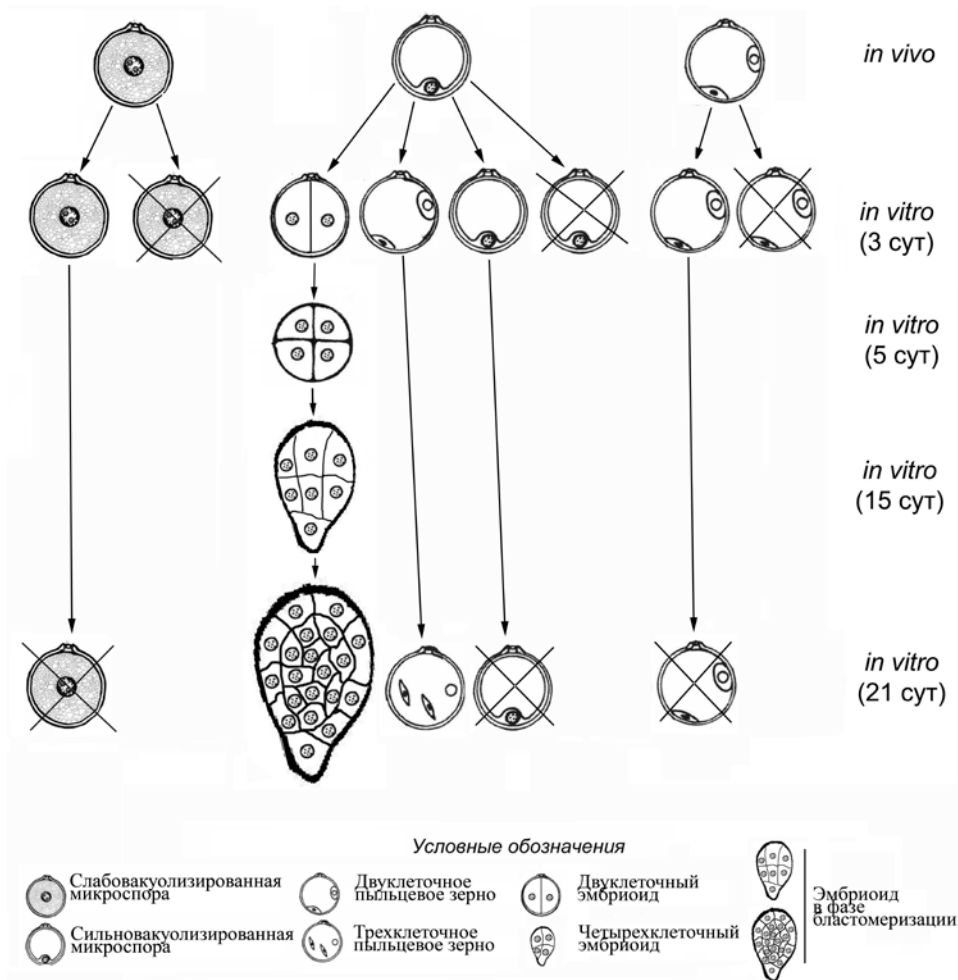


Рис. 32. Цитологический мониторинг развития спорогенных клеток пыльника пшеницы линии Фотос при культивировании *in vitro* на индукционной среде с концентрацией 2,4-Д, равной 0.5 мг/л (схема)

При концентрации 2,4-Д, равной 1.5 мг/л, на 5 сут культивирования пыльников *in vitro* отмечены начальные этапы спорофитного развития части сильновакуолизированных микроспор по пути гемморизогенеза; остановка в развитии части слабовакуолизированных микроспор и двуклеточных пыльцевых зерен в том статусе, который отмечен для них при инокуляции пыльников на индукционную питательную среду; дегенерация части слабовакуолизированных микроспор и двуклеточных пыльцевых зерен. На 28 сут культивирования пыльников отмечены морфогенные каллусы. Все спорогенные клетки дегенерировали (рис. 33).

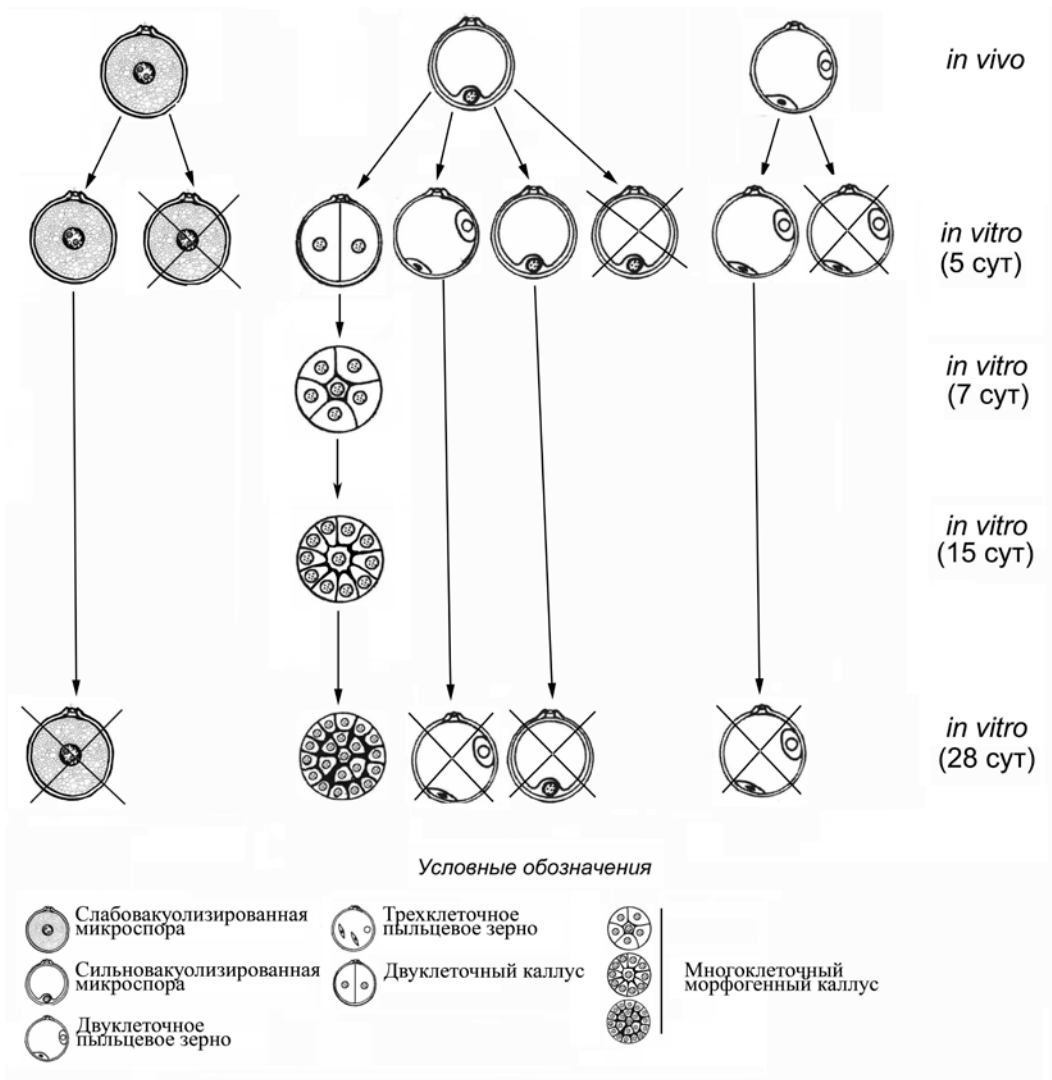


Рис. 33. Цитологический мониторинг развития спорогенных клеток пыльника пшеницы линии Фотос при культивировании *in vitro* на индукционной среде с концентрацией 2,4-Д, равной 1.5 мг/л (схема)

1.4. Эмбриогенез как биотехнологически оптимальный путь морфогенеза микроспоры по спорофитной программе *in vitro*

В ходе дальнейшего культивирования *in vitro* компетентные клетки пыльника яровой мягкой пшеницы (сильновакуолизированные микроспоры) реализуют свой морфогенетический потенциал посредством различных путей морфогенеза: гистогенез (формирование тканей), органогенез в виде ризогенеза (формирование корня), геммогенеза (формирование почки), гемморизогенеза (формирование корня и почки), а также эмбриогенез (формирование эмбриоида – зародышеподобной структуры) (рис. 34). При этом основной фактор, влияющий на реализацию того или иного пути морфогенеза микроспоры *in vitro*, – баланс между эндогенным содержанием фитогормонов в инокулируемом пыльнике и экзогенной концентрацией гормонов в составе индукционной питательной среды. Этот вывод хорошо согласуется с литературными данными (обзор [Круглова с соавт., 1999]).

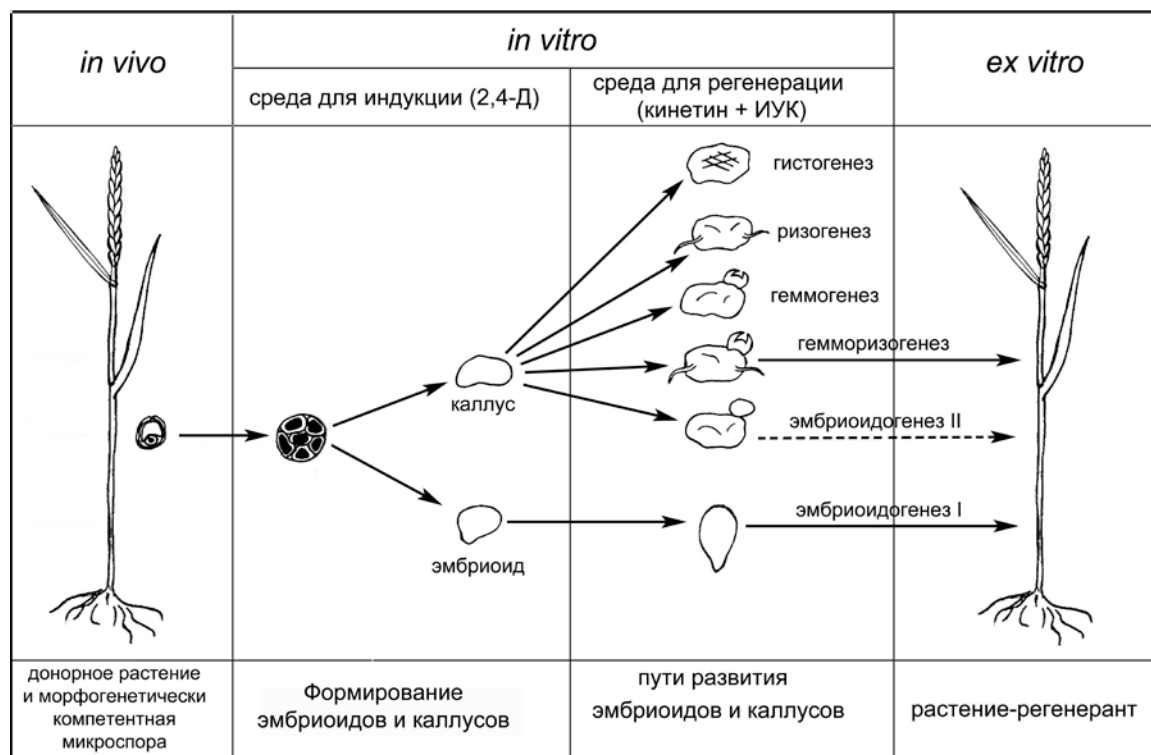


Рис. 34. Схема путей морфогенеза *in vitro* сильновакуолизированной микроспоры и формирования растений-регенерантов *ex vitro*

Экспериментально установлены два пути морфогенеза сильновакуолизированной микроспоры по спорофитной программе в условиях *in vitro*, ведущие к формированию *ex vitro* андроклиных растений-регенерантов нормального строения: эмбриоидогенез (через этап формирования зародышеподобной структуры – эмбриоида) и гемморизогенез (через этап формирования морфогенного каллуса, в котором формируются почка и корень) (рис. 34, 35).

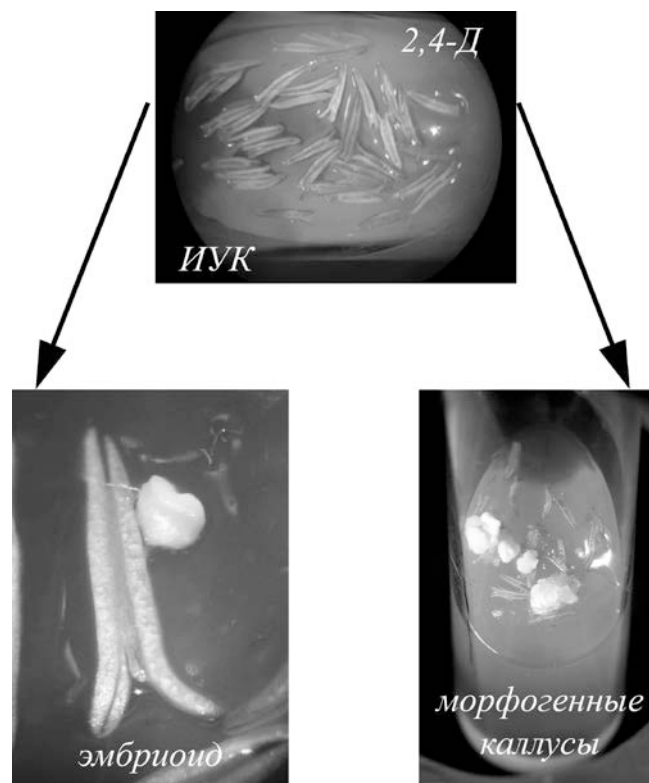


Рис. 35. Пути морфогенеза в культуре *in vitro* изолированных пыльников пшеницы по спорофитной программе (схема)

Каждый из выявленных путей морфогенеза характеризуется своими закономерностями физиологической индукции и особенностями протекания, что хорошо согласуется с литературными данными [Горбунова, 1993; обзор [Круглова с соавт., 1999]; Горбунова с соавт., 2001; Эмбриологические основы..., 2005; От микроспоры к сорту, 2008].

Особый интерес вызывает эмбриоидогенез *in vitro*, состоящий в формировании и развитии эмбриоида (греч. εμβρυον – зародыш, εἶδος –

образ) – зародышеподобной биполярной структуры, зачатка индивидуума, образующегося асексуально [Батыгина, 1987, 1997в; Батыгина с соавт., 1978; Batygina, 1989a,b].

Термин «эмбриоид» предложен I. Vasil, A. Hildebrandt [1966]. Разработана концепция эмбриоидогении как новой категории бесполого (вегетативного) размножения при гомофазной репродукции и рассмотрена роль этого явления в системе репродукции цветковых растений [Batygina, 1989a,b; Батыгина, 1993б, 1997в, 2000б].

Экспериментально выявлено, что у пшеницы именно эмбриоидогенез – биотехнологически оптимальный путь получения андроклиных растений-регенерантов. И причина здесь не только в том, что эмбриоидогенез не связан со сложным многоступенчатым процессом морфогенеза через каллус, не требует трудоемкой процедуры пересадок и предполагает работу с генетически однородным материалом, как сообщают многие авторы (например [Суханов, 1983; Горбунова, 1993]). Важно, что в данном случае единицей репродукции является эмбриоид – зачаток целого органа [Батыгина, 1987].

Эмбриоидогенез *in vitro* в культуре пыльников большинства изучаемых генотипов пшеницы в сравнении с зиготическим эмбриогенезом подробно рассмотрен в работах [Круглова, 2001, 2002; Сельдимирова с соавт., 2001, 2004; Сельдимирова, 2002, 2004; Эмбриологические основы..., 2005; Сельдимирова, Титова, 2007; От микроспоры к сорту, 2008].

На рис. 36 приведены основные данные по цито-гистологическим аспектам эмбриоидогенеза пшеницы *in vitro*. В первые 21 сут культивирования эмбриоид развивается внутри пыльника на среде Potato II [Chuang, Quyang, 1978], затем на среде Blaydes [1966] до статуса сформированного эмбриоида.



Рис. 36. Основные этапы эмбриодогенеза в культуре *in vitro* пыльников пшеницы.

1 – инициальная клетка андроклии – сильновакуолизированная микроспора;
 2 – двуядерная структура на 3 сут культивирования; 3 – двухклеточная структура на 3 сут культивирования; 4 – четырехклеточный эмбриод на 5 сут культивирования; 5 – многоклеточный эмбриод на 7 сут культивирования; 6 – эмбриод на 21 сут культивирования; 7 – эмбриод на 30 сут культивирования; 8 – эмбриод на 35 сут культивирования; 9 – сформированный эмбриод на 45 сут культивирования.

1-4 – временные давленные препараты, 5-9 – продольные срезы.

Частично по [Эмбриологические основы андроклии пшеницы, 2005]

1.5. Регенерация андроклинных растений в условиях *in vitro* и *ex vitro*

Сформированный эмбрионд (рис. 36, 9) характеризуется наличием органов, типичных для зародыша пшеницы, образовавшегося из зиготы. Такие эмбрионды без прохождения периода покоя в условиях *in vitro* на той же среде для регенерации постепенно прорастают в андроклинные растения-регенеранты (рис. 37, 38).

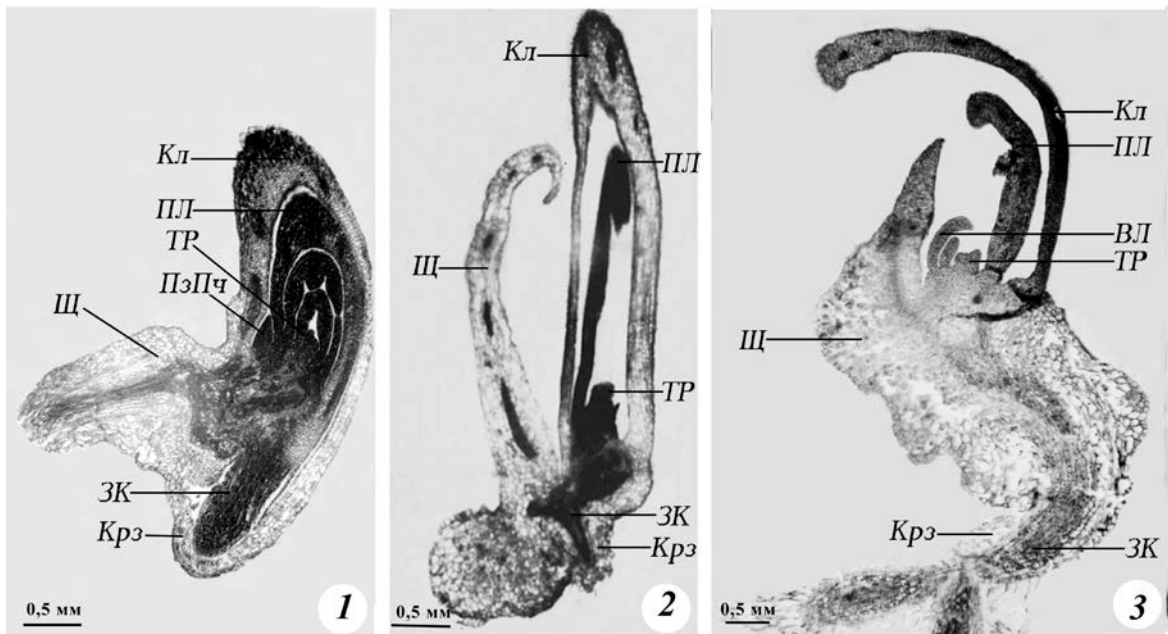


Рис. 37. Прорастание сформированного эмбрионда в условиях *in vitro*.

Продольные срезы. 1 – на 48 сут культивирования; 2 – на 51 сут культивирования; 3 – на 53 сут культивирования. Условные обозначения: ВЛ – второй лист, ЗК – зародышевый корень, Кл – coleoptиле, Крз – coleориза, ПЛ – первый лист, ПзПч – пазушная почка, ТР – точка роста, Щ – щиток.

По [Эмбриологические основы андроклинии пшеницы, 2005]

Следует подчеркнуть, что андроклинные растения-регенеранты пшеницы проходят типичные фенологические фазы, характерные для пшеницы в естественных условиях (например, [Батыгина, 1974; 1987; Куперман, 1977; Челак, 1991]): фаза всходов (рис. 38, 1), фаза третьего листа (рис. 38, 2), фаза кущения (рис. 38, 3-5), фаза выхода в трубку, фазу стеблевания, фазу колошения, фазу цветения, фазу молочной, восковой (рис. 38, 6) и полной спелости зерна.

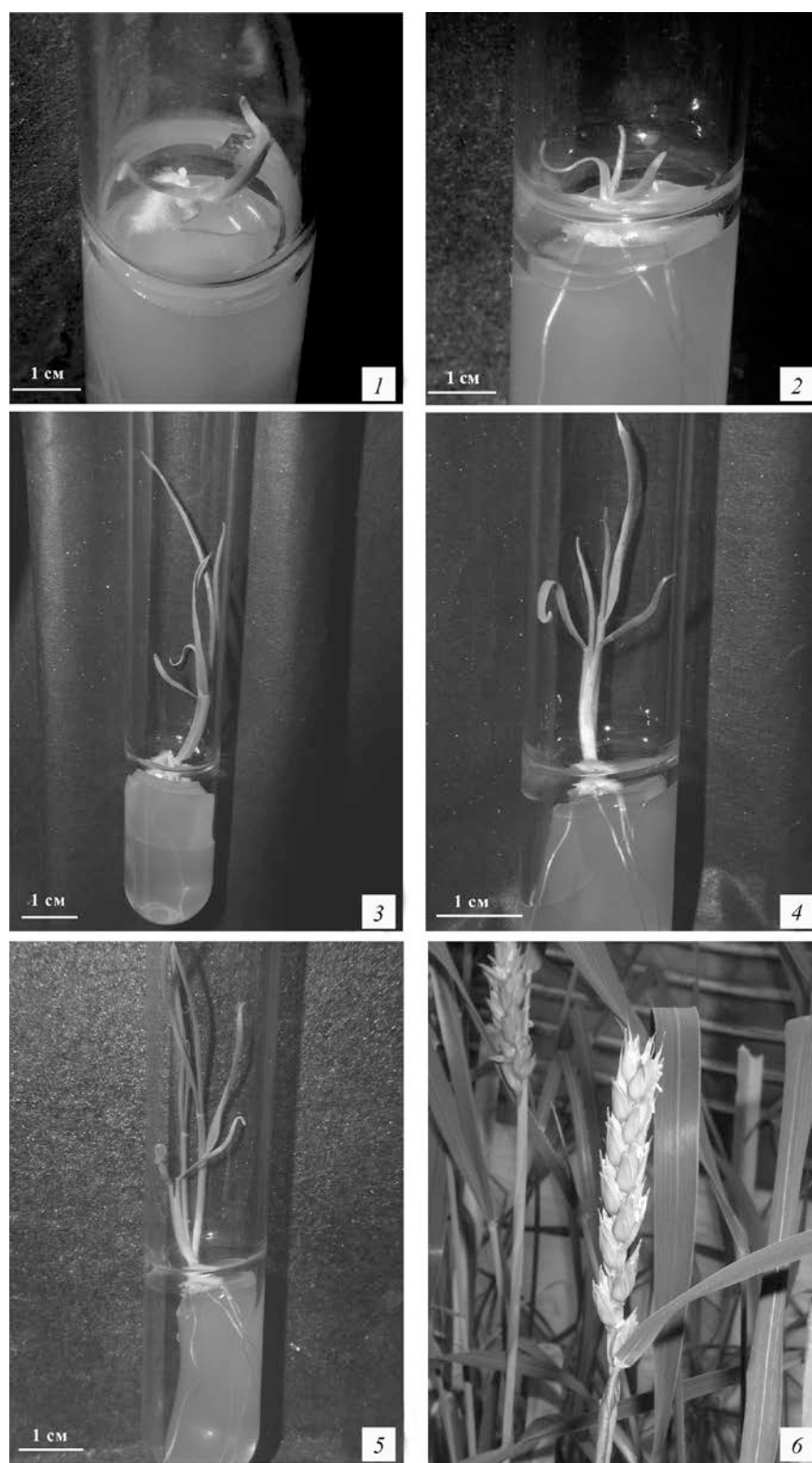


Рис. 38. Развитие растения-регенеранта пшеницы *in vitro* и *ex vitro*. Макросъемка. 1-5 – в условиях *in vitro* (1 – на 57 сут; 2 – на 58 сут; 3 – на 60 сут; 4 – на 62 сут; 5 – на 66 сут); 6 – в условиях *ex vitro*. Частично по [Эмбриологические основы андроклинии пшеницы, 2005]

Важное направление использования световой микроскопии при разработке биотехнологии андроклинной гаплоидии – цитогенетический контроль образовавшихся андроклинных растений-регенерантов, состоящий в подсчете количества хромосом (n) в метафазных пластинках клеток кончика корня. Такой контроль принципиально необходим, поскольку в условиях культуры *in vitro* неизбежно возникает определенный процент растений-регенерантов с аномальным количеством хромосом.

Андроклинные растения-регенеранты пшеницы извлекали из пробирок и с помощью цитогенетического контроля отбирали только гаплоидные ($n=21$) особи (рис. 39, 1). Их обрабатывали смесью колхицина и папаина (состав know how) для дигаплоидизации и вновь подвергали цитогенетическому контролю.

Отобранные дигаплоидизированные ($n+n=42$) растения (рис. 39, 2) переносили в вегетационные сосуды на подобранные почвенные смеси и размещали на лабораторной светоплощадке при $+20^{\circ}\text{C}$, 16-часовом фотопериоде и освещенности 20 тыс. лк. В таких условиях растения-регенеранты развиваются до фенофазы полной спелости зерна.

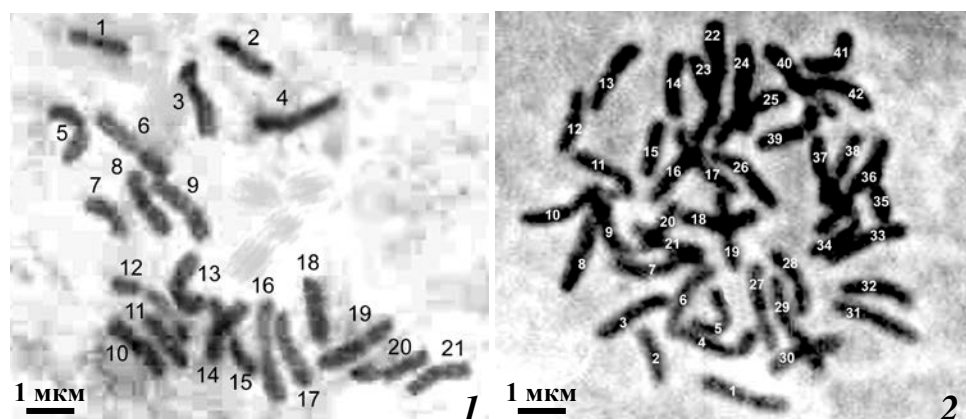


Рис. 39. Метафазная пластинка гаплоидного (1) и дигаплоидного (2) андроклинных растений-регенерантов пшеницы.

Частично по [Эмбриологические основы андроклинии пшеницы, 2005]

Качество полученных зерновок андроклинных растений-регенерантов пшеницы оценивали по их лабораторной всхожести путем их проращивания в чашках Петри при +27⁰С в темноте.

Полученные результаты (рис. 40) демонстрируют высокую лабораторную всхожесть зерновок (93-95 %), подтвержденную их высокой полевой всхожестью (рис. 41), равной 85-87 %.

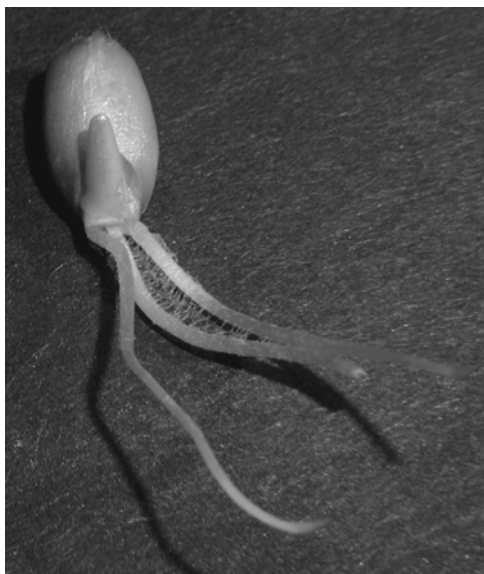


Рис. 40. Зерновка андроклинного растения-регенеранта пшеницы через 2 сут проращивания в лабораторных условиях. Макросъемка, x10



Рис. 41. Растения пшеницы, выращенные из зерновок андроклинных растений-регенерантов, в фенофазе кущения. Полевые условия научного стационара Института биологии Уфимского НЦ РАН (Уфимский район). Вегетационный сезон 2010 г.

Этот результат подтверждается цито-гистологическим анализом зерновок, свидетельствующим о нормальном строении сформированных зародышей андроклинных растений-регенерантов пшеницы (рис. 42).

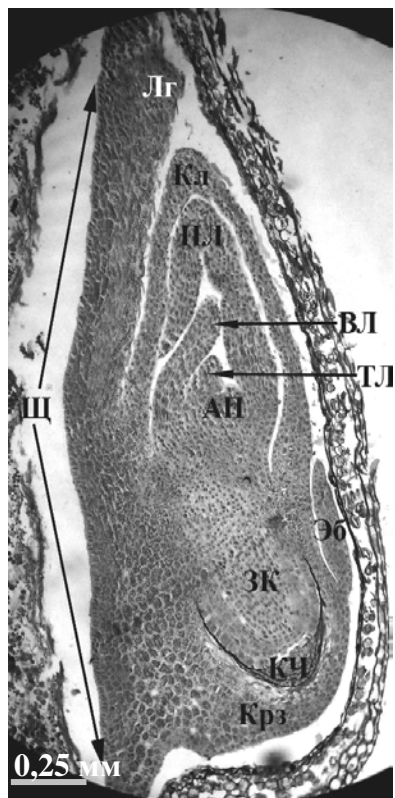


Рис. 42. Сформированный зародыш андроклинного растения-регенеранта пшеницы. x70, продольный срез. Условные обозначения: АП – апекс побега, ВЛ – второй лист, ЗК – зародышевый корень, Кл – coleoptиль, Крз – coleориза, КЧ – корневой чехлик, Лг – лигула, ПЛ – первый лист, ТЛ – третий лист, Щ – щиток, Эб – эпибласт

Таким образом, андроклинные растения-регенеранты яровой мягкой пшеницы, полученные в культуре пыльников *in vitro* путем эмбриоидогенеза, проходят те же фазы и в той же продолжительности, что и донорные растения яровой мягкой пшеницы.

Растения-регенеранты формируют зерновки высокого качества, что подтверждается лабораторными наблюдениями и цито-гистологическими исследованиями.

Тем самым получили экспериментальное подтверждение теоретические положения концепции эмбриоидогении [Батыгина, 1993б, 2000б] как высокоспециализированной формы вегетативного размножения, типа гомофазной репродукции цветковых растений, конечным этапом которого является формирование полноценного фертильного растения.

* * *

Регенерация растений пшеницы на основе феномена андроклинной гаплоидии предполагает реализацию двух гомофазных (без смены поколений) путей морфогенеза *in vitro* инициальной клетки – сильновакуолизированной микроспоры: эмбриоидогенез и гемморизогенез (рис. 43).

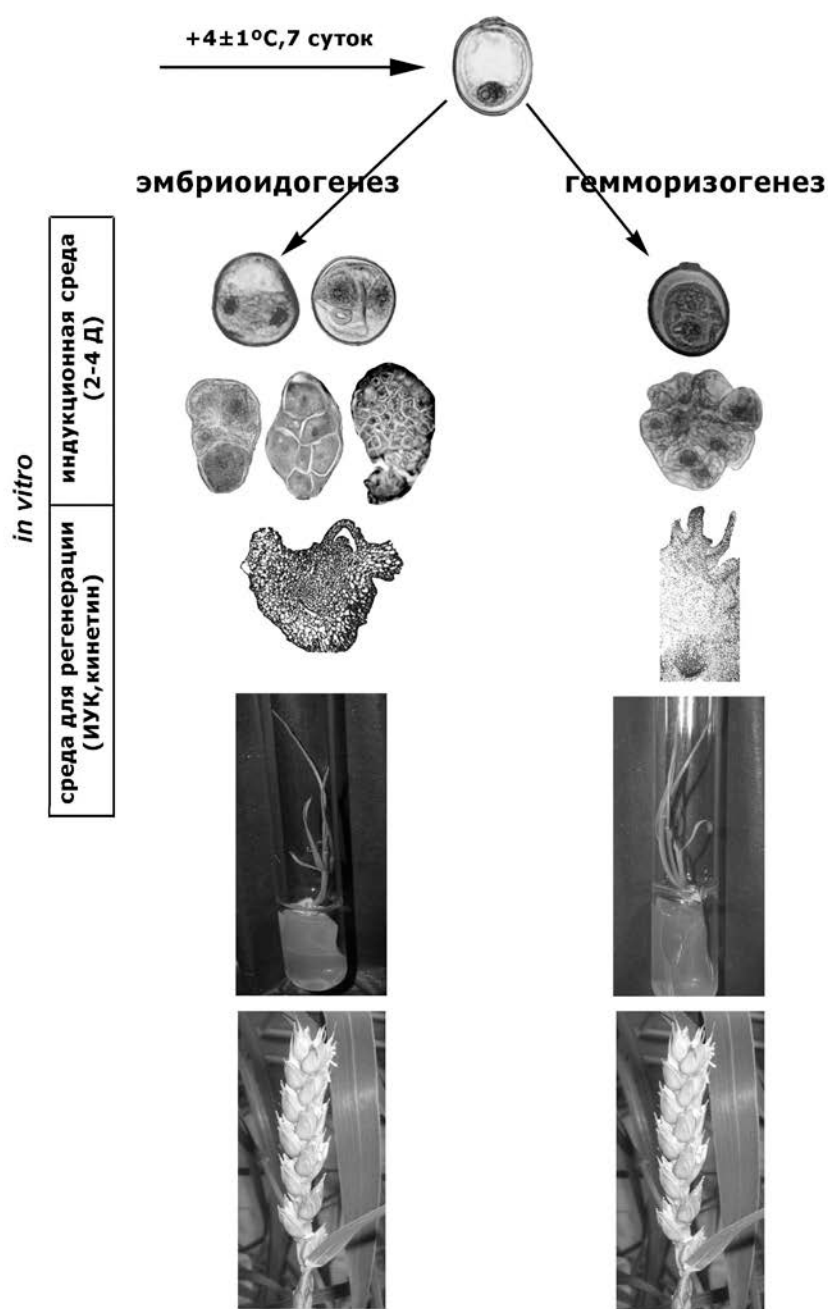


Рис. 43. Регенерация растений пшеницы на основе феномена андроклинной гаплоидии

Формирование гаплоидных растений-регенерантов в культуре *in vitro* изолированных пыльников – феномен сам по себе не столь уникальный. Гаплоидия как явление возникновения особей высших растений с гаметическим числом хромосом встречается в природе, хотя и крайне редко; история ее изучения насчитывает более 80 лет (по [Тырнов, 1998]).

Уникальность спорофитных путей морфогенеза микроспоры *in vitro*, на наш взгляд, состоит в другом: клетка, по природе своей предназначенная для образования гаметофита, меняет программу развития и формирует спорофит. Происходит гомофазный переход в жизненном цикле растений – от спорофита к спорофиту.

Это явление по отношению к данному случаю В.М. Суханов [1983] трактует как рекапитуляцию. Мы присоединяемся к этому мнению. Как известно, рекапитуляция (лат. *recapitulazio* – повторение сказанного или сделанного) – повторение в ходе индивидуального развития организма характерных признаков взрослых стадий более или менее отдаленных предков; рекапитуляция в онтогенезе филогенетических черт может быть неполной, с определенными искажениями, связанными с дальнейшими эволюционными преобразованиями, в частности могут повторяться особенности соответствующих форм развития предковых форм [Биологический энциклопедический словарь, 1986]. На наш взгляд, этот термин точно определяет, что в случае гомофазного перехода спорофит-спорофит рекапитулирует возможность включения морфогенетической программы бесполого размножения; микроспоры высших растений обладают свойствами споры филогенетически более древних форм [Кордюм, 1978].

Полученные нами экспериментальные данные свидетельствуют о том, что условия культивирования *in vitro* не индуцируют новые качества в инициальной клетке – сильновакуолизированной микроспоре,

находящейся в критической фазе своего развития, но дают возможность проявиться тотипотентности этой клетки, т.е. тем морфогенетическим потенциям, которые уже были заложены в этой клетке в естественных условиях *in vivo*. В целом, андроклиния – процесс, который в условиях культуры *in vitro* только заканчивается.

В изучении андроклинии нерешенных проблем еще немало. Так, многое остается неясным в процессах детерминации развития морфогенетически компетентных сильновакуолизованных микроспор по спорофитному пути в условиях *in vitro*. Такие понятия, как сигналы и индукторы, их природа и специфичность, приобретение и потеря компетентности микроспорами, не имеют пока точных характеристик (подробнее [Круглова, 2001; обзоры [Круглова, Батыгина, 2001; Круглова, Куксо, 2006]).

Можно предложить способы решения этой проблемы.

Во-первых, всесторонний анализ клеточного цикла микроспоры, входящей в сложную интегрированную систему пыльника. Важность такого подхода определяется асинхронностью не только прохождения фаз микроспорогенеза клетками одного пыльника, но и асинхронностью прохождения фаз клеточного цикла микроспорами одного пыльника. Вполне допустима, на наш взгляд, при этом разработка имитационной модели циклирования метки в популяции пролиферирующих клеток, как это показано при исследовании структуры клеточного цикла и ритма деления клеток в корневой меристеме пшеницы [Мачс, Гриф, 1996].

Во-вторых, успешное получение жизнеспособных зрелых пыльцевых зерен (гаметофитов) путем введения в культуру *in vitro* микроспор на ранних фазах развития и даже микроспороцитов (спорофитов) дает прекрасную возможность изучить факторы, регулирующие развитие микроспор по спорофитному пути.

Кроме того, несомненный интерес представляет практически не разработанная проблема зависимости пыльника, содержащего инициальные клетки-микроспоры (развивающиеся в конечном счете в растения-регенеранты), от состояния и особенностей донорного растения. Пыльник и донорное растение находятся во взаимодействии, и это взаимодействие должно играть определенную роль в реализации спорофитного пути развития микроспор. Логично предположить, что морфогенетически компетентные микроспоры возникают в результате ступенчатых процессов, которые могут быть индуцированы в донорном растении *in vivo* и завершиться в культуре *in vitro*. Данная проблема, на наш взгляд, должна решаться как составная часть более глобальной проблемы систем регуляции и интеграции у растений.

Еще одно перспективное направление дальнейших исследований – изучение иммунолокализации фитогормонов в микроспорах как в момент инокуляции пыльников на питательную среду, так и в ходе различных путей спорофитного морфогенеза микроспор *in vitro* и регенерации из них растений. Использование специфических антител к гормонам, возможно, позволит по динамике их изменения прогнозировать спорофитные пути морфогенеза в культуре изолированных пыльников.

Несомненно, что в процессе репрограммирования микроспор и детерминации их к спорофитному морфогенезу *in vitro* важную роль должны играть процессы перестройки цитоскелета, которому в настоящее время придают большое значение, не исключая даже функцию рецепции и передачи информации между клетками. Определенную роль в репрограммировании играют и белки холодового шока, достаточно хорошо изученные при холодовой акклимации растений, но совершенно не изученные в плане индукции андроклинии (обзоры [Круглова, Батыгина, 2001; Круглова, Куксо, 2006]).

Известно, что при эмбриогенезе *in vivo* во времени и пространстве специфически экспрессируются гены, кодирующие белки, связанные с определенными этапами развития зародыша; ведется поиск эмбриоспецифичных генов (обзор: [Морозова, 1997]). Начат анализ и секвенирование генов, экспрессирующихся в процессе эмбриогенеза (соматического эмбриогенеза) ряда видов растений из различных семейств [Foisset *et al.*, 1993; и мн. др.]. Было бы чрезвычайно интересно изучить эти вопросы при эмбриогенезе в культуре изолированных пыльников, например *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. как одного из наиболее генетически изученных генетически растений (обзоры [Ежова, 1999; Лутова, 2000]).

Кроме того, многообещающим подходом может явиться трансформация растений *Arabidopsis* (или иных растений) с помощью *Agrobacterium tumefaciens* с последующим выявлением генов, затронутых мутацией, вызванных вставкой T-ДНК, как это показано, например, в работах В. Huang [1992], R. Sangwan *et al.* [1993]. Возможности трансформации в сочетании с исследованиями соматического эмбриогенеза дают ключ к пониманию генной регуляции эмбриогенеза *in vitro*.

Решение всех перечисленных выше проблем должно базироваться на использовании результатов детальнейших цито-гистологических исследований. Однако такой подход важен не только как методологическая основа культивирования *in vitro* изолированных пыльников, но и как способ критической оценки уже, казалось бы, общих мест биотехнологических приемов.

Глава 2

ЦИТО-ГИСТОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ЭМБРИОКУЛЬТУРЫ *IN VITRO* ПШЕНИЦЫ*

Эмбриокультура *in vitro* как использование разновозрастных зародышей [Батыгина, 1987] позволяет создать условия для наиболее полной реализации онтогенетических программ зародыша.

К настоящему времени накоплен достаточно большой объем экспериментальных данных по различным аспектам культивирования *in vitro* зрелых и незрелых зародышей зерновых злаков, в том числе пшеницы [Лукьянюк, Игнатова, 1980; Суханов, Папазян, 1983; Гапоненко с соавт., 1987; Дунаева с соавт., 2000; Oldach *et al.*, 2001; Vikrant, Rashid, 2001; Huang, Wei, 2004; Pellegrineschi *et al.*, 2004; Бишимбаева, 2007; и др.].

В то же время привлечение цито-гистологических данных к анализу получения растений-регенерантов путем эмбриокультуры *in vitro* достаточно ограничено. Так, далеко не полностью выявлена зависимость между цито-гистологическим статусом инокулируемого зародыша и его отзывчивостью на условия культивирования *in vitro*. Требуют детального анализа клеточные и тканевые особенности индукции формирования морфогенных каллусов, тотипотентные клетки которых в условиях *in vitro* способны развиваться по различным путям морфогенеза. Остается открытым вопрос об инициальных клетках (группах клеток) каллуса, вступающих на путь морфогенеза *in vitro*, и их принципиальных отличиях от других клеток каллуса как гетерогенной системы. Не до конца выявлены цито-гистологические особенности каждого из путей морфогенеза *in vitro* в каллусах зародышевого происхождения. Необходим цито-гистологический анализ начальных этапов регенерации растений *in vitro* в сравнении с аналогичными процессами *in vivo*.

Рассмотрим цито-гистологические аспекты каждого из этапов эмбриокультуры *in vitro* у пшеницы.

* Глава написана совместно с к.б.н. А.А.Катасоновой, научным сотрудником лаборатории генетики и цитологии растений Института биологии Уфимского НЦ РАН, и д.б.н. проф. И.Ф.Шаяхметовым, зав.кафедрой биохимии и биотехнологии БашГУ.

2.1. Отбор донорного растения

Объектами исследования, как и при исследовании андроклиной гаплоидии, явились генотипы яровой мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L., перспективные для климатической зоны Южного Урала и интенсивно используемые в селекционных программах Башкирского НИИ СХ РАСХН: сорта Саратовская 55, Башкирская 24, Скала, Жница, Московская 35, Симбирка, Казахстанская 10, гибридная линия Фотос (Жница x Московская 35) (рис. 1). Семена были любезно предоставлены лабораторией селекции яровой пшеницы Башкирского НИИ СХ РАСХН согласно Договору о творческом сотрудничестве. Растения выращивали в полевых условиях на экспериментальных участках научного стационара Института биологии УНЦ РАН.

Использовали метод культуры *in vitro* незрелых зародышей пшеницы [Суханов, Папазян, 1983] в модификации И.Ф.Шаяхметова [1999].

Одна из серьезных методических трудностей культивирования *in vitro* разновозрастных зародышей пшеницы состоит в выявлении фаз развития инокулируемого зародыша и соотнесении их с длиной зародыша и сутками после опыления. Как правило, исследователи [Суханов, Папазян, 1983; Шаяхметов, 1999; Przetakiewicz *et al.*, 2003; Pellegrineschi *et al.*, 2004; Zale *et al.*, 2004] сообщают о введении в эмбриокультуру *in vitro* зародышей пшеницы через определенное время после опыления. Однако остается неясным, в какой стадии развития находится при этом зародыш, все ли клетки незрелых зародышей являются тотипотентными.

Решению этих вопросов способствует цито-гистологический анализ зародыша, инокулируемого на питательную среду *in vitro*.

Однако предварительно на модельном объекте – гибридной линии Фотос – было проведено цито-гистологическое исследование развивающихся зародышей через каждые 0.5 сут после искусственного опыления. При этом учитывали длину зародыша (в миллиметрах).

Цито-гистологический анализ развития зародыша пшеницы

Через 0.5 сут после искусственного опыления в зародышевом мешке пшеницы отмечена зигота.

Зигота имеет типичную для пшеницы грушевидную форму и представляет собой клетку, в которой крупное ядро и большая часть цитоплазмы располагаются в ее апикальной части, а большая вакуоль – в базальной (рис. 44). Длина зиготы составляет 0,001 мм.

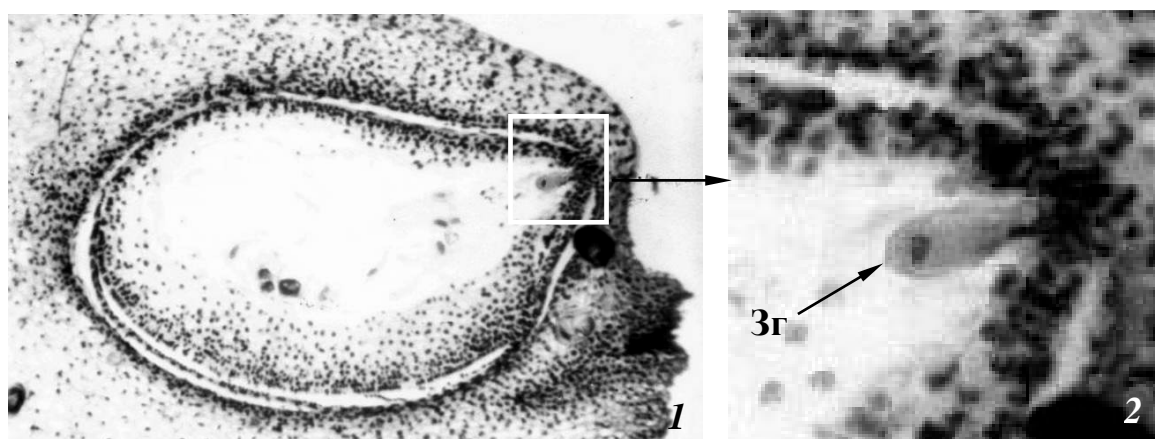


Рис. 44. Зигота в семязачатке через 0.5 сут после опыления. 1. Продольный срез, x130; 2. Продольный срез, x400. Условное обозначение: Зг – зигота

Таким образом, зиготе с момента возникновения свойственна полярность (наличие апикально-базального градиента в клетке). Полярность зиготы отражает ее дифференцированное состояние и служит основой полярности зародыша. В свою очередь, полярность зародыша чрезвычайно важна для сложных структурно-функциональных специализаций групп клеток на последующих стадиях эмбриогенеза [Батыгина, Васильева, 19976].

Через 1.5 сут после опыления зигота делится с образованием двухклеточного зародыша (рис. 45, 1). В результате неравномерной вакуолизации зиготы фигура первого деления оказывается сдвинутой к ее апикальному концу. При этом в результате асимметричного деления зиготы формируются две неравные клетки: более мелкая апикальная и более крупная базальная. Такие структурные различия клеток сопряжены с их функциональными различиями в процессе преобразований каждой из

клеток в ходе дальнейшего развития зародыша. Длина такого зародыша составляет 0,05-0,1 мм.

Таким образом, именно на стадии двухклеточного зародыша впервые реализуется специализация клеток. В дальнейшем такая специализация уточняется в процессе циклов митотических делений клеток двухклеточного зародыша.

Два последующих, также асимметричных, деления сначала базальной, а затем апикальной клеток приводят к формированию через 2,5 суток после опыления четырехклеточного зародыша, характеризующегося наличием двух клеток апикального (побегового) полюса и двух клеток базального (корневого) полюса (рис. 45, 2).

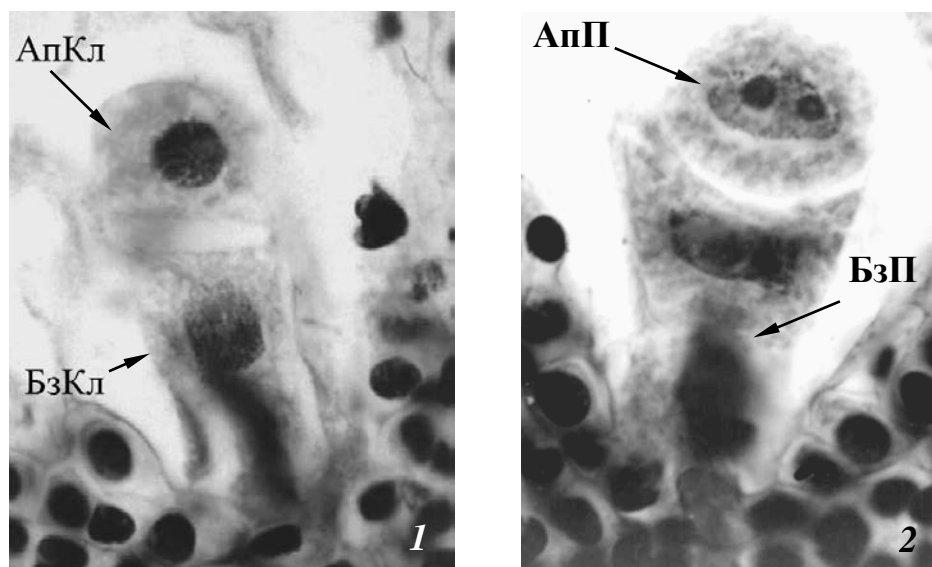


Рис. 45. Двухклеточный (1) и четырехклеточный (2) зародыши. 1, 2. Продольные срезы, $\times 900$. Условные обозначения: АпКл – апикальная клетка, АпП – апикальный полюс, БзКл – базальная клетка, БзП – базальный полюс

Следует отметить, что фигура деления располагается наклонно к продольной оси двухклеточного зародыша. Такое наклонное положение клеточной перегородки обуславливает дорсовентральность строения зародыша пшеницы изучаемого сорта уже с четырехклеточного зародыша. Дорсовентральность – характерный признак зародышей злаков [Батыгина, 1974, 1987, 19976].

Длина такого зародыша составляет 0,12-0,14 мм.

Через 3.0-4.0 сут после опыления в результате интенсивных делений клеток апикального и базального полюсов в процессе дальнейшего роста и развития происходит формирование многоклеточного зародыша (рис. 46, 47). Длина такого зародыша через 3.0 сут после опыления составляет 0,15-0,18 мм, через 4.0 сут после опыления – 0,19-0,2 мм.

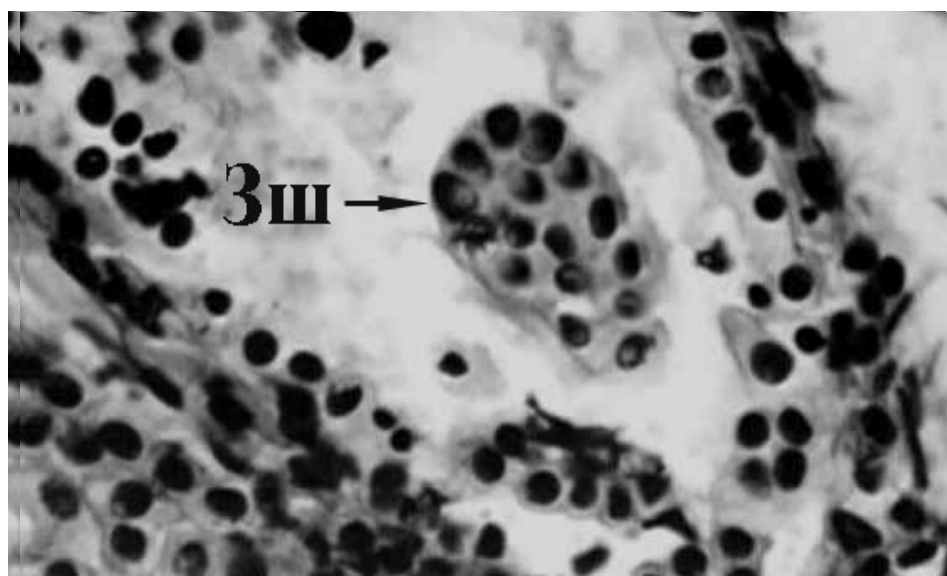


Рис. 46. Многоклеточный зародыш через 3.0 сут после опыления. Продольный срез, $\times 750$. Условное обозначение: Зш – зародыш

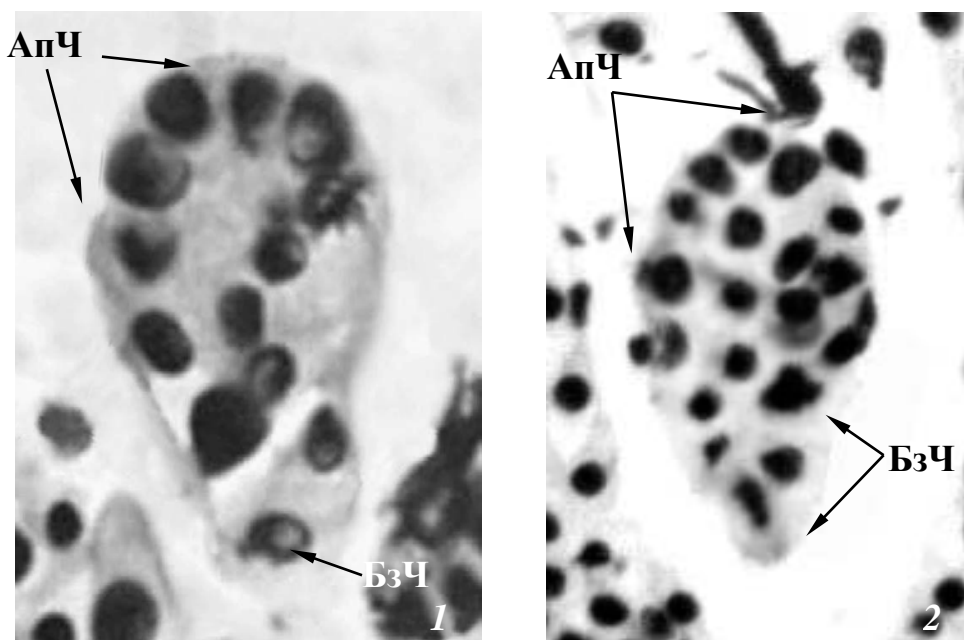


Рис. 47. Многоклеточный зародыш в тканях зерновки. 1. Через 3.5 сут после опыления, продольный срез, $\times 5500$; 2. Через 4.0 сут после опыления, продольный срез, $\times 400$. Условные обозначения: АпЧ – апикальная часть, БзЧ – базальная часть. По [Эмбриологические основы..., 2005]

Клетки многоклеточного зародыша вначале проявляют умеренную митотическую активность. Позднее, когда количество клеток достигает 50-60, начинается усиленный рост зародыша. Наиболее энергично процессы деления клеток происходят в апикальной части зародыша. Ядра клеток занимают почти весь клеточный объем. Зародыш растет в основном в продольном направлении, и форма его постепенно становится грушевидной.

Дальнейшее развитие зародыша связано с морфологической дифференциацией клеточной массы многоклеточного зародыша пшеницы изучаемого сорта, ведущей к закладыванию и формированию органов (органогенез). Анализ цито-гистологических данных по развитию зародыша пшеницы подтверждает мнение Т.Б. Батыгиной [1997б] о том, что во всех сложных преобразованиях, происходящих в ходе органогенеза, определяющую роль играют последовательные изменения ритма митотической активности и ориентации клеточных делений в определенных областях зародыша.

Первой через 4.5-8.0 сут после опыления закладывается и формируется единственная семядоля – щиток.

При этом сначала (через 4.5-5.0 сут после опыления) наблюдается заложение щитка путем интенсивных клеточных делений в апикальной части зародыша, хотя размеры клеток и ядер остаются такими же, как и у многоклеточного зародыша.

В клетках базальной части зародыша, напротив, наблюдаются большие изменения: клетки значительно увеличиваются в размерах, сильно вакуолизируются, в них уменьшается количество цитоплазмы. Клетки базальной части такого зародыша можно охарактеризовать как суспензор (рис. 48, 1). Зародыш достигает в длину 0,4-0,45 мм.

В ходе дальнейшего роста и развития форма и размеры зародыша значительно изменяются. В зародыше начинают формироваться органы, т.е. протекает морфологическая дифференциация зародыша и органогенез.

Через 5.5-7.0 сут после опыления в зародыше происходят сложные клеточные преобразования, в результате которых щиток из латерального положения постепенно смещается в терминальное (рис. 48, 2). Зародыш через 7.0 сут после опыления достигает в длину 0,5 мм.

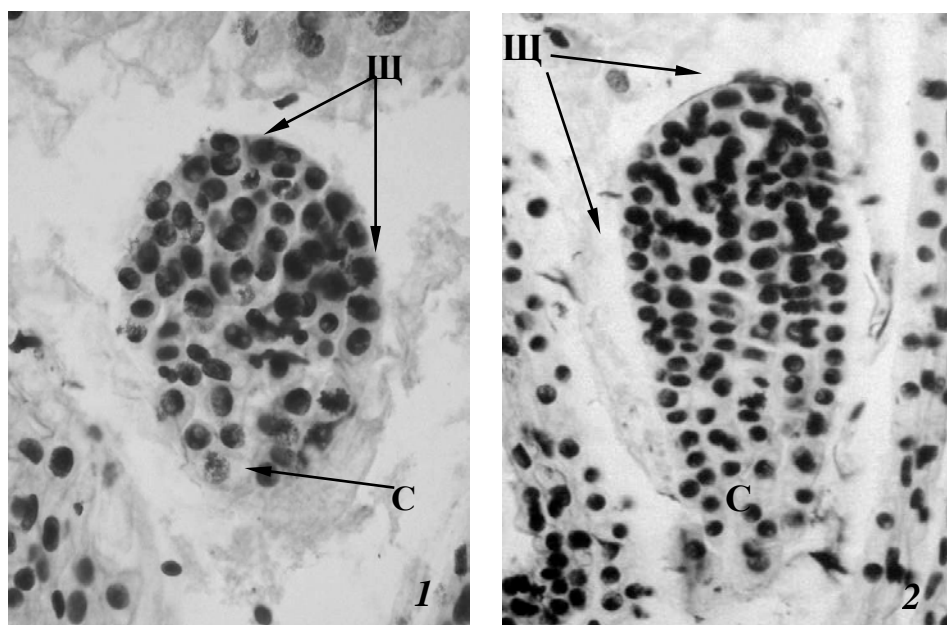


Рис. 48. Формирование в зародыше щитка. 1. Заложение щитка и суспензора через 5.0 сут после опыления, продольный срез, $\times 400$. 2. Смещение щитка в терминальное положение через 7.0 сут после опыления, продольный срез, $\times 400$. Условные обозначения: С – суспензор, Щ – щиток. По [Эмбриологические основы..., 2005]

Через 8.0 сут после опыления в апикальной части зародыша экзогенно формируется точка роста (будущий апекс побега) в виде очага меристематических клеток (рис. 49, 1). Длина такого зародыша составляет 0,6 мм.

После обособления точки роста, через 8.5-12.0 сут после опыления, клеточные деления замедляются, и темпы роста зародыша также замедляются.

Начинается формирование валика колеоптиля в виде полого конуса с расположенным в верхней его части отверстием, которое имеет форму щели (рис. 49, 2). Длина такого зародыша – 0,8-1,3 мм.

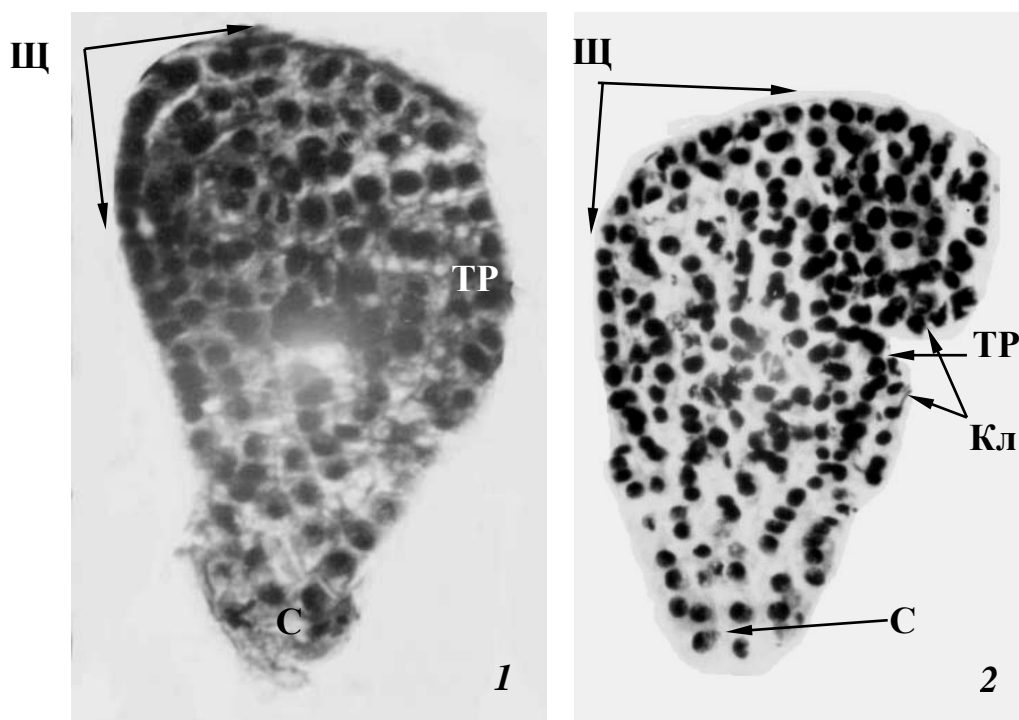


Рис. 49. Формирование в зародыше точки роста через 8.0 сут после опыления (1) и coleoptilia через 10.0 сут после опыления (2). 1, 2. Продольный срез, x550. Условные обозначения: С – суспензор, ТР – точка роста, Щ– щиток

Через 12.5-13.0 сут после опыления точка роста преобразуется в апекс побега. В базальной части зародыша происходит эндогенное обособление меристемы главного зародышевого корня. Щиток приобретает вытянутую форму (рис. 50, 1). Длина такого зародыша – 1,5-1,6 мм.

В ходе дальнейшего развития зародыша, через 14 сут после опыления, отверстие coleoptilia постепенно суживается, его профиль асимметричен и образует отчетливую выпуклость под щитком (рис. 50, 2). Длина зародыша через 14 сут после опыления составляет 1,6 мм.

В области под coleoptilem формируется эпибласт. Главный зародышевый корень удлиняется в базальном направлении, под ним формируется coleoriza (корневое влагалище). Щиток сильно удлиняется, на его брюшной стороне образуется выступ – лигула.

Длина зародыша через 15 сут после опыления составляет 1,7 мм.

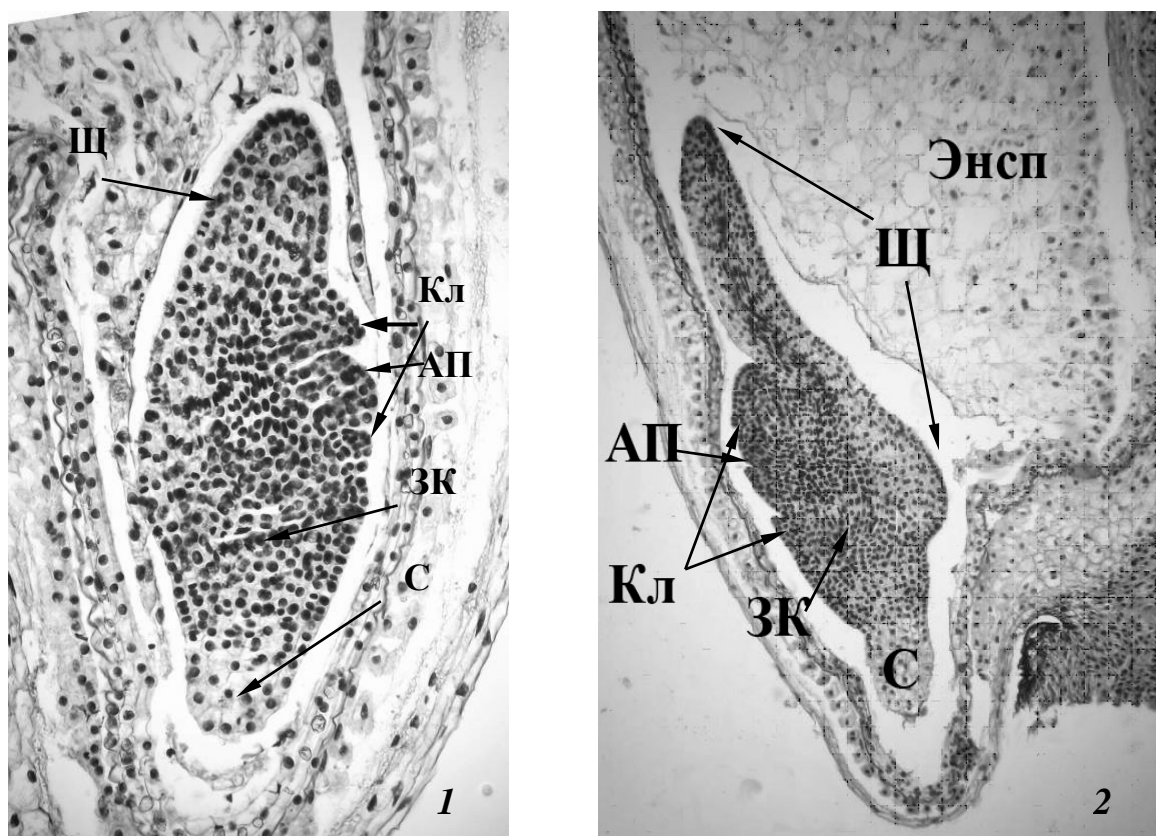


Рис. 50. Зародыш в тканях зерновки через 13.0 сут после опыления (1) и через 14.0 сут после опыления (2). 1. Продольный срез, x300; 2. Продольный срез, x250. Условные обозначения: Ап – апекс побега, ЗК – зародышевый корень, Кл – колеоптиль, С – суспензор, Щ – щиток, Энсп – эндосперм

Таким образом, начало дифференциации зародыша характеризуется неравномерным распределением митотической активности в определенных зонах зародыша и последовательным формированием двух меристематических очагов: экзогенного – в области точки роста и эндогенного – в зоне образования главного зародышевого корня.

Через 16.0 и 17.0 (рис. 51) сут после опыления со стороны эпибласта закладывается первый лист – начинается формирование почки. Длина зародыша через 16 сут после опыления составляет 1,9 мм, через 17.0 сут – 2,0 мм.

Стабилизация роста зародыша достаточно условна, поскольку продолжают некоторые из процессов, начатые на этапе дифференциации зародыша (морфологическая дифференциация и инициальный органогенез).

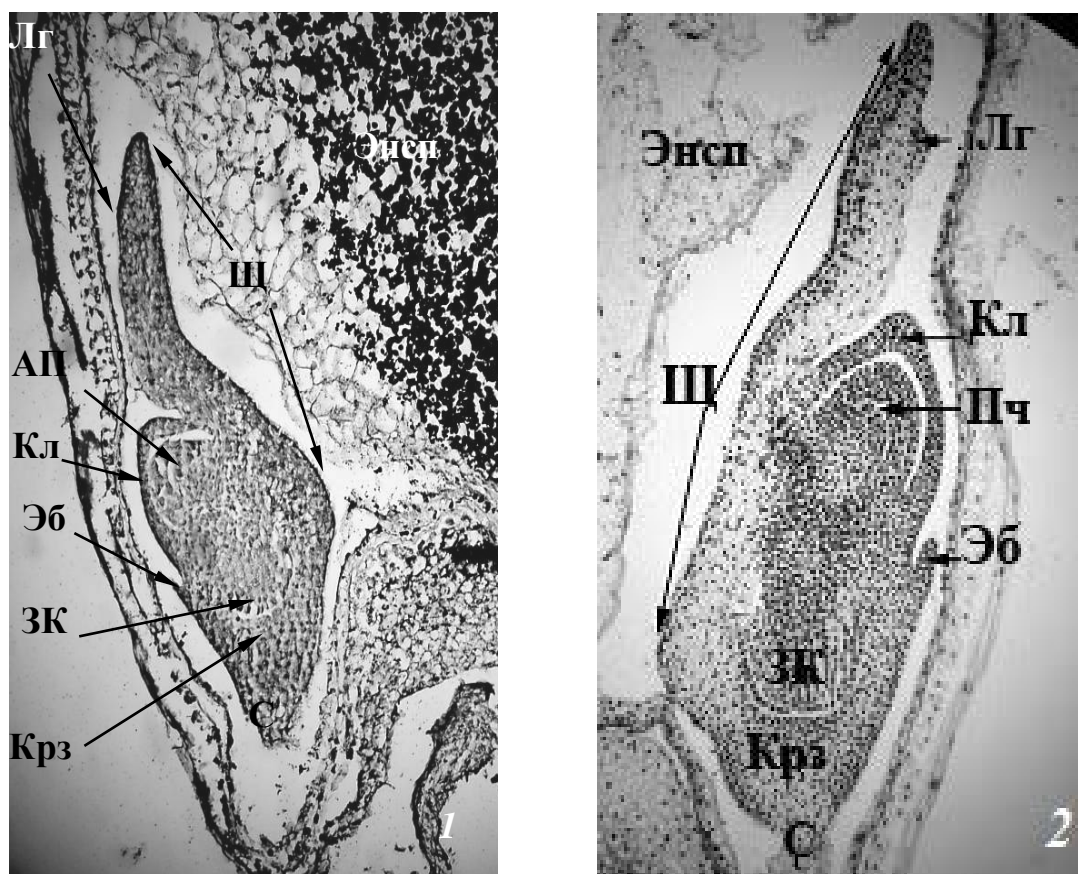


Рис. 51. Зародыш в тканях зерновки через 16.0 (1) и 17.0 (2) сут после опыления.
 1, 2. Продольные срезы, $\times 250$. Условные обозначения: Ап – апекс побега, ЗК – зародышевый корень, Кл – колеоптиль, Крз – колеориза, Лг – лигула, Пч – почечка, С – суспензор, Щ – щиток, Эб – эпибласт, Энсп – эндосперм

К 17.5 сут после опыления происходит дальнейший незначительный рост органов зародыша (за счет растяжения клеток), хотя размеры зародыша существенно не изменяются (длина зародыша 2,1 мм).

Начинается интенсивное накопление запасных питательных веществ (главным образом, крахмал), которые будут реализованы позднее в ходе прорастания. Зародыш готовится к вступлению в период покоя.

Дифференциация зародыша полностью завершается через 20.0 сут после опыления. Такой сформированный зародыш характеризуется наличием всех типичных для злаков органов: щиток, лигула (вырост щитка), колеоптиль, эпибласт, колеориза, дифференцированная почечка, состоящая из апекса побега и первого листа (рис. 52, 1). Длина такого зародыша составляет 2,2 мм.

Далее (21.0-25.0 сут после опыления) происходит рост зародыша за счет незначительного растяжения составляющих его клеток. Зародышевый корень полностью отделяется от колеоризы; формируется корневой чехлик. Почечка и зародышевый корень удлиняются. В почечке закладываются второй и третий листья.

Зародыш несколько утолщается и растет: его длина на 21.0-е сут после опыления составляет 2,3 мм, на 22.0-е сут – 2,4 мм, на 23.0-е сут – 2,5 мм, на 24-е и 25-е сут – 2,6 мм.

Зародыш через 21.0-25.0 сут после опыления можно считать зрелым (рис. 52, 2). Такой зародыш вступает в период покоя.

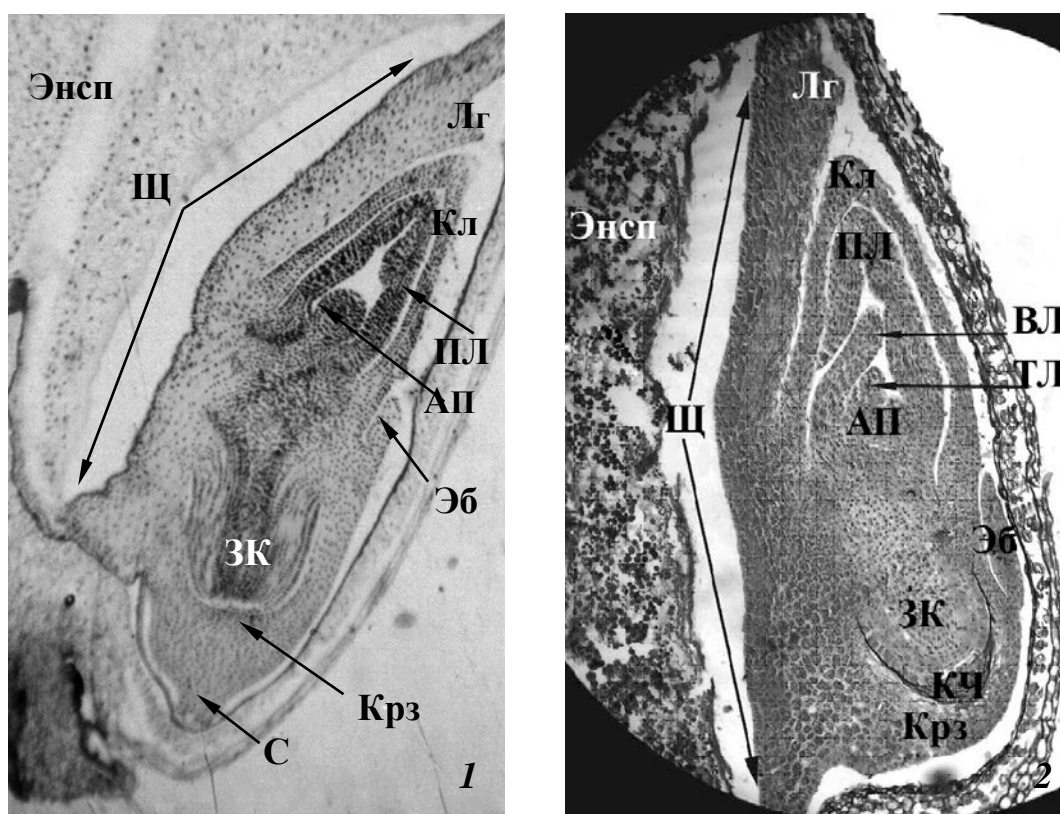


Рис. 52. Сформированный зародыш через 20 сут после опыления (1) и зрелый зародыш через 25 сут после опыления (2). 1, 2. Продольные срезы, х250. Условные обозначения: АП – апекс побега, ВЛ – второй лист, ЗК – зародышевый корень, Кл – колеоптиль, Крз – колеориза, КЧ – корневой чехлик, Лг – лигула, ПЛ – первый лист, С – суспензор, ТЛ – третий лист, Щ – щиток, Эб – эпибласт, Энсп – эндосперм

2.2. Отзывчивость на условия культуры *in vitro* разновозрастных зародышей

Разновозрастные зародыши вычленили из зерновок в стерильных условиях ламинарного бокса и помещали в пробирки с индукционной питательной средой (среда I), составленной по прописи Murashige, Skoog [1962] в модификации [Шаяхметов, Ибрагимов, 1997]. Гормональный состав среды представлен синтетическим аналогом ауксина **2,4-дихлорфеноксиуксусной кислотой** 2,4-Д в концентрациях 1.0–8.0 мг/л и фитогормоном кинетин в концентрации 0.2 мг/л. Контрольный вариант среды взят без 2.4-Д.

Зародыши размещали на питательной среде щитком вниз, т.е. щиток зародыша находился в контакте с питательной средой.

Инкубацию зародышей проводили в термостате при +26⁰С, в темноте. Начало каллусообразования наблюдали через 5-7 сут культивирования. Морфогенные каллусы через каждые 5 сут в стерильных условиях ламинарного бокса переносили в пробирки с питательной средой для регенерации (среда II), также составленной по прописи Murashige, Skoog [1962], но без добавления 2,4-Д.

Культивирование каллусов вели на светоплощадке при 16-часовом фотопериоде с интенсивностью освещения 10 000 лк.

Для культивирования *in vitro* использовали зародыши яровой мягкой пшеницы, изолированные с 8.5 по 25 сут после искусственного опыления.*

Согласно полученным экспериментальным данным, отзывчивость на условия культивирования зависит как от возраста зародыша, так и от концентрации 2,4-Д в питательной среде. Эти наблюдения соответствуют литературным данным [Skoog, Miller, 1957; Felfoldi, Purnhauser, 1992;

*Культивирование зародышей, инокулированных на более ранних стадиях эмбриогенеза (2.5–8.0 сут после опыления), приводило к дегенерации зародышей на всех вариантах использованных питательных сред. Возможно, для культивирования таких зародышей требуется разработка специальных методических приемов, например, использование тканей-«нянек».

Bohorova *et al.*, 1995; Varshney *et al.*, 1996; Carvalho *et al.*, 1997; Ozgen *et al.*, 1998; Bahieldin *et al.*, 2000; и др.].

При культивировании *in vitro* зародышей, инокулированных через 8.5, 10, 12.5 и 14.0 сут после опыления (длина зародыша 0,8 мм, 1,0 мм, 1,5 мм и 1,6 мм, соответственно), на 7-е сут культивирования наблюдали формирование обводненных каллусов желтоватого цвета, неопределенной формы, рыхлой мягкой консистенции (53, 1). Такие каллусы в отдельных случаях интенсивно пролиферировали. В ходе дальнейшего культивирования все каллусы постепенно дегенерировали.

Такие каллусы были оценены нами как неморфогенные. Действительно, как свидетельствовали результаты дальнейших исследований, при культивировании такого каллуса в нем не удалось индуцировать процесс морфогенеза и регенерацию растений ни на одном варианте питательной среды.

По данным цито-гистологического анализа (рис. 53, 2), такой каллус представлен рыхло расположенными крупными клетками, вакуолизированными, разнообразными по форме. Характерны большие межклетники, заполненные веществом полисахаридной природы, хорошо выявляемым с помощью красителя алцианового синего.

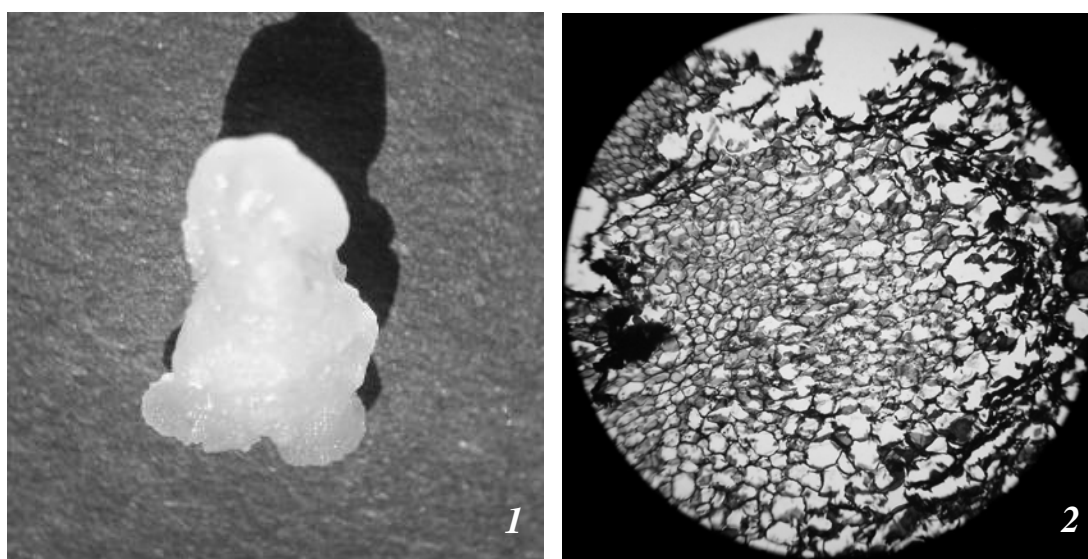


Рис. 53. Неморфогенный каллус, полученный из зародыша, инокулированного через 14 сут после опыления. Среда I с 2,4-Д в 4,0 мг/л, 7 сут культивирования *in vitro*. 1. Макросъемка, x50; 2. Продольный срез, x150

При культивировании *in vitro* зародышей пшеницы, инокулированных через 15, 16 и 17 сут после опыления (длина зародыша 1,7 мм, 1,9 мм и 2,0 мм, соответственно) через 7 сут культивирования наблюдали формирование каллусов плотной компактной консистенции, матового желтовато-белого цвета, как правило, узловатой формы. В ходе дальнейших экспериментов было установлено, что в таких каллусах отмечаются процессы морфогенеза, а в дальнейшем в каллусе регенерируют растения. Такие каллусы были обозначены нами как морфогенные.

Цито-гистологический анализ показал, что клетки морфогенного каллуса достаточно однородны, плотно прилегают друг к другу, вакуолизированы незначительно, имеют крупные ядра, занимающие центральное положение, и плотную клеточную стенку, в основном правильную изодиаметрическую форму, а в целом – меристематичны (рис. 54, 55).

Зародыши, инокулированные через 20 сут после опыления (длина зародыша 2,2 мм), после 10–12 сут культивирования *in vitro* давали начало проросткам. Ткани самого зародыша постепенно разрыхлялись и дегенерировали (рис. 56).

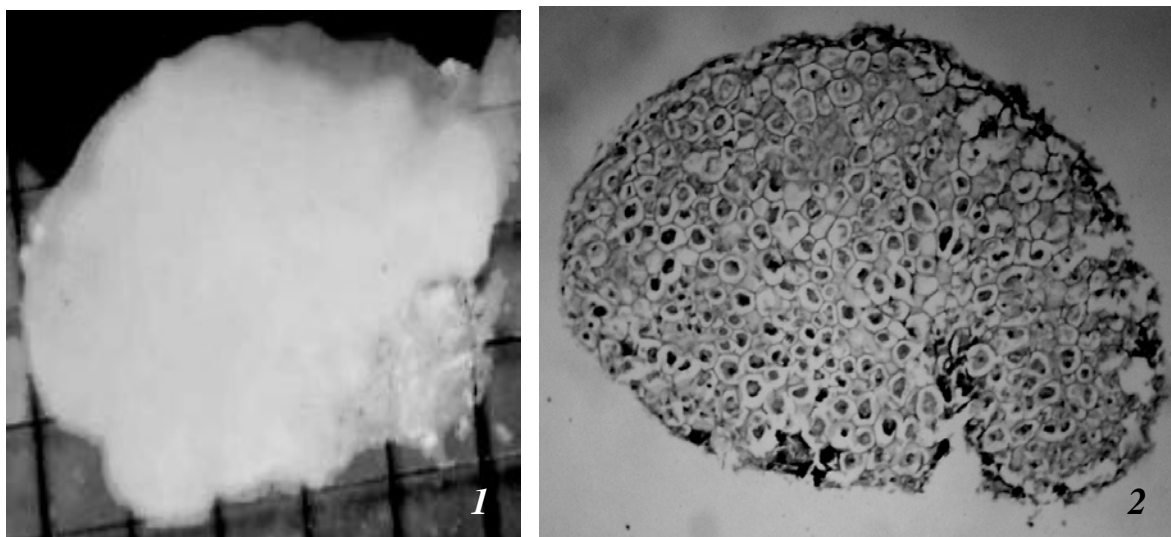


Рис. 54. Морфогенный каллус, полученный из зародыша, инокулированного через 15 сут после опыления. Среда I с 2,4-Д в 2.0 мг/л, 7 сут культивирования *in vitro*. 1. Макросъемка, x15; 2. Продольный срез, x200

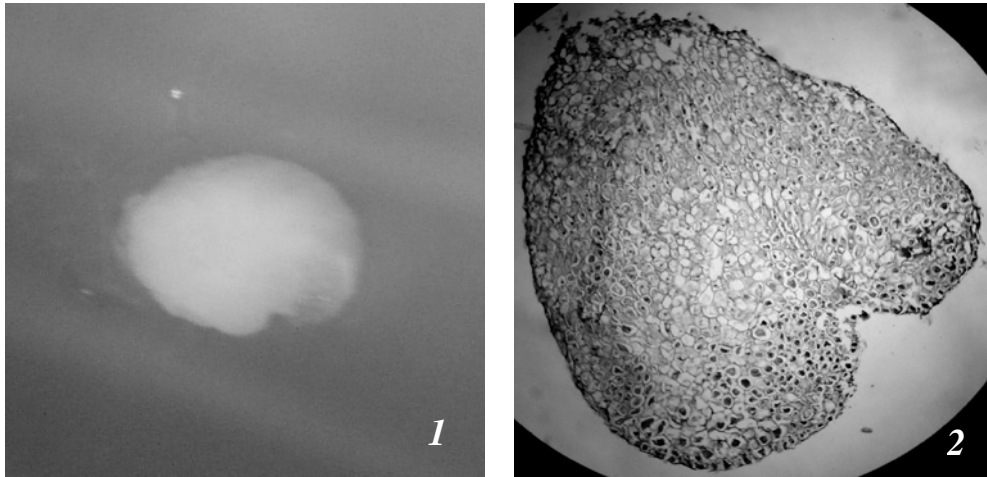


Рис. 55. Морфогенный каллус, образовавшийся из зародыша, инокулированного через 16 сут после опыления. Среда I с 2,4-Д в 3.0 мг/л, 7 сут культивирования *in vitro*. 1. Макросъемка, x50; 2. Продольный срез, x150

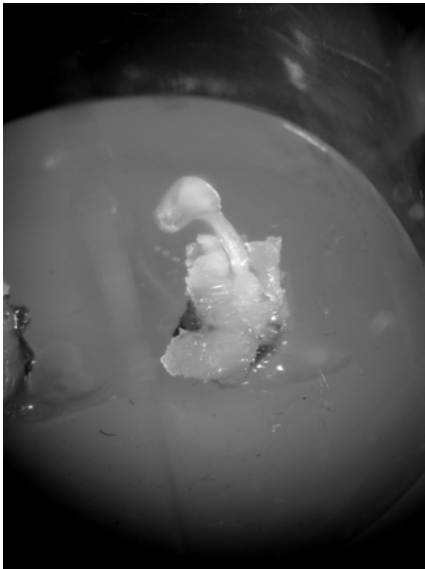


Рис. 56. Проросток, образовавшийся из зародыша, инокулированного на стадии сформированного зародыша через 20 сут после опыления. Среда I, контроль, 12 сут культивирования *in vitro*. Макросъемка, x15

По-видимому, к 20 сут после опыления зародыш вступает в так называемую стадию автономности, согласно концепции, предложенной и разработанной применительно к зародышу растений Т.Б.Батыгиной [1987, 19976]. Автономность – наиболее важный из критических периодов онтогенеза, так как именно с него начинается переход зародыша на относительно самостоятельный путь развития, т.е. происходит автономизация онтогенеза [Васильева, Батыгина, 1997].

Зародыши, инокулированные через 21–25 сут после опыления (длина зародыша 2,3–2,6 мм), через 7–9 сут культивирования *in vitro* также давали начало проросткам при всех вариантах среды I (рис. 57).

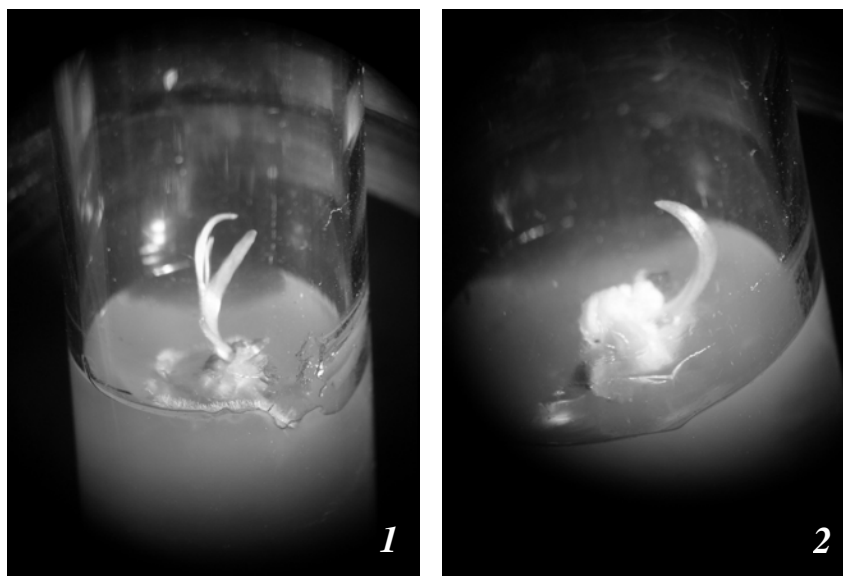


Рис. 57. Проростки, образовавшиеся из зародышей, инокулированных через 25 сут после опыления. Среда I, 9 сут культивирования *in vitro*. 1. 2,4-Д в 2,0 мг/л, макросъемка, x10; 2. 2,4-Д в 4,0 мг/л, макросъемка, x15

Анализ полученных экспериментальных данных свидетельствует о зависимости формирования/неформирования каллуса, формирования определенного типа каллуса (морфогенный/неморфогенный) от времени, прошедшего после опыления (что коррелирует со стадией эмбриогенеза инокулируемого зародыша) (табл. 2).

Таким образом, в тех случаях, когда цель конкретной биотехнологии – получить растения-регенеранты пшеницы, минимизировав соматическую изменчивость, в процессе культивирования следует избегать этапа формирования *in vitro* морфогенного каллуса. Согласно полученным данным, для этого незрелый зародыш следует инокулировать на 20–25 сут после опыления.

Для массового получения растений-регенерантов пшеницы, а также для повышения соматической изменчивости, например, в целях клеточной селекции, целесообразна регенерация через этап формирования *in vitro* морфогенного каллуса. В этом случае следует культивировать незрелые зародыши, изолированные на 15–17 сут после опыления.

Таблица 2

Отзывчивость разновозрастных зародышей пшеницы в культуре *in vitro*

Сутки после опыления	Длина зародыша, мм	Отзывчивость эксплантов в среде культивирования <i>in vitro</i>								
		2,4-Д 0.0 мг/л (контроль)	2,4-Д 1.0 мг/л	2,4-Д 2.0 мг/л	2,4-Д 3.0 мг/л	2,4-Д 4.0 мг/л	2,4-Д 5.0 мг/л	2,4-Д 6.0 мг/л	2,4-Д 7.0 мг/л	2,4-Д 8.0 мг/л
2.5	0,12–0,14	Д	Д	Д	Д	Д	Д	Д	Д	Д
3.0	0,15	Д	Д	Д	Д	Д	Д	Д	Д	Д
4.0	0,2	Д	Д	Д	Д	Д	Д	Д	Д	Д
5.0	0,45	Д	Д	Д	Д	Д	Д	Д	Д	Д
6.5	0,5	Д	Д	Д	Д	Д	Д	Д	Д	Д
8.5	0,8	Д	НМК –	НМК –	НМК –	НМК –	НМК –	НМК –	НМК –	НМК –
10.0	1,1	Д	НМК –	НМК –	НМК –	НМК –	НМК –	НМК –	НМК –	НМК –
12.5	1,5	Д	НМК –	НМК+	НМК+	НМК+	НМК+	НМК+	НМК+	НМК+
14.0	1,6	Д	НМК	НМК+	НМК+	НМК+	НМК+	НМК+	НМК+	НМК+
15.0	1,7	Д	МК+	МК++	МК+	МК+	НМК+	НМК+	НМК+	НМК+
16.0	1,9	Д	МК+	МК+	МК+	МК+	НМК+	НМК+	НМК+	НМК+
17.0	2,0	Д	МК+	МК+	МК+	МК+	НМК+	НМК+	НМК+	НМК+
20.0	2,2	П	НМК+	НМК+	НМК+	НМК+	НМК+	НМК+	НМК+	НМК+
22.0	2,4	П	П	П	П	П	П	П	П	П
25.0	2,6	П	П	П	П	П	П	П	П	П

Условные обозначения:

Д – дегенерация экспланта; П – формирование проростка; НМК – формирование неморфогенного каллуса; МК – формирование морфогенного каллуса; ++ интенсивная пролиферация каллуса (сырая масса* 110.0-136.0 мг; + умеренная пролиферация каллуса (сырая масса* 45.0-109.9 мг); – скудная пролиферация каллуса (сырая масса* 15.0- 44.9 мг)

*Сырую массу каллуса измеряли в мг на 15 сут культивирования *in vitro*

2.3. Цито-гистологический анализ путей морфогенеза в каллусной культуре *in vitro*

Обнаруженная у морфогенного каллуса пшеницы еще на ранней стадии развития морфологическая вариабельность клеток связана с возможностью различной реализации морфогенетического потенциала в условиях *in vitro*. Нельзя не согласиться с мнением Т.Б. Батыгиной [1987], что каллус состоит из групп неоднородных клеток, имеющих морфогенетические потенции, которые реализуются различными путями: органогенез (ризогенез, геммогенез, гемморизогенез) и эмбриоидогенез (соматический эмбриогенез).

Такие пути морфогенеза *in vitro* действительно наблюдались в морфогенном каллусе пшеницы зародышевого происхождения: органогенез по типу геммогенеза – формирование почки, органогенез по типу ризогенеза – формирование корня; органогенез по типу гемморизогенеза – формирование почки и корня; эмбриоидогенез (соматический эмбриогенез) – формирование эмбриоидов (соматических зародышей).

Формирование морфогенетических очагов как начальный этап путей морфогенеза в каллусной культуре *in vitro*

Детальными цито-гистологическими исследованиями выявлено, что обязательным начальным этапом всех выявленных путей морфогенеза является формирование в морфогенном каллусе групп клеток, постепенно отделяющихся от дегенерирующих клеток самого каллуса. Такие группы клеток названы морфогенетическими очагами (рис. 58).

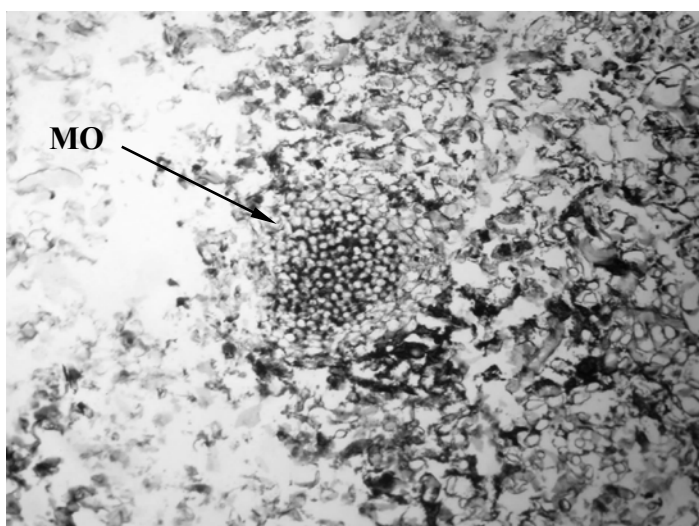


Рис. 58. Формирование морфогенетического очага в морфогенном каллусе на 5 сут культивирования *in vitro*. Поперечный срез, x150. Условное обозначение: МО – морфогенетический очаг

Морфогенетический очаг постепенно обособляется от клеток остального каллуса; окружающие клетки каллуса дегенерируют. Такой обособившийся от каллуса морфогенетический очаг нами предложено называть сформированным морфогенетическим очагом.

Сформированный морфогенетический очаг представлен тремя зонами клеток (рис. 59, 1). I зона клеток располагается по периферии комплекса и состоит из крупных эпидермальных клеток с крупными вакуолями; ядра достаточно крупные, занимают пристенное положение. II зона клеток занимает основной объем очага, состоит из более мелких меристематических клеток с крупными ядрами, хорошо связывающими краситель; вакуоли отсутствуют. III зона располагается в центре очага и также представлена меристематическими клетками, в которых отмечено появление вакуолей. В целом, сформированный морфогенетический очаг представлен главным образом недифференцированными меристематическими клетками, способными к дальнейшему развитию, и обособлен от остального каллуса.

С увеличением продолжительности культивирования количество морфогенетических очагов в каллусе сначала возрастает, достигая максимума на 15 сут культивирования (рис. 59, 2), затем резко снижается к 20 сут культивирования.

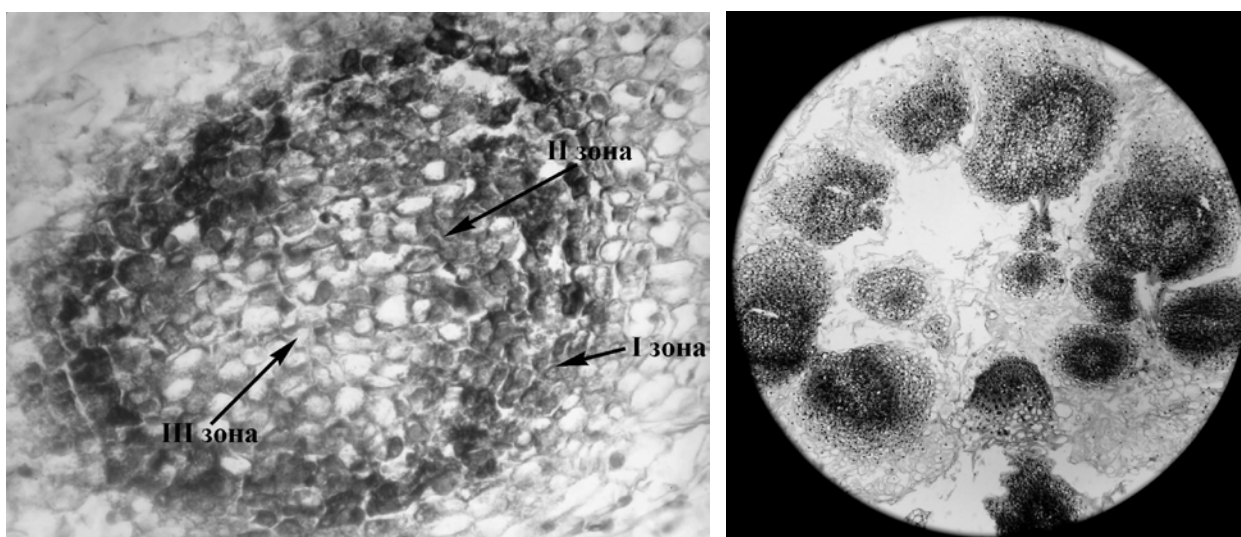


Рис. 59. Сформированный морфогенетический очаг в морфогенном каллусе на 10 сут культивирования *in vitro* (1) и морфогенетические очаги в морфогенном каллусе на 15 сут культивирования *in vitro* (2). 1. Поперечный срез, x700; 2. Поперечный срез, x150

Гемморизогенез как путь морфогенеза in vitro в морфогенном каллусе

Согласно цито-гистологическим данным, процесс гемморизогенеза состоит из двух этапов: сначала в морфогенном каллусе на поверхности морфогенетического очага формируется почка, затем, в толще каллуса, эндогенно формируется корень.

Первоочередное формирование почки по сравнению с корнем при гемморизогенезе отмечено многими авторами на примере каллусов различного происхождения, например, в морфогенном каллусе, полученном при культивировании пыльников пшеницы [Эмбриологические основы..., 2005].

Морфогенетический очаг постепенно разрастается. Клетки каллуса, окружающие очаг, становятся более крупными, рыхло расположенными, они в значительной степени вакуолизируются и утрачивают меристематическую активность. В процессе дальнейшего культивирования клетки каллуса постепенно дегенерируют (рис. 60, 1) и почти полностью исчезают. Морфогенетический очаг оказывается на поверхности каллуса (рис. 60, 2).

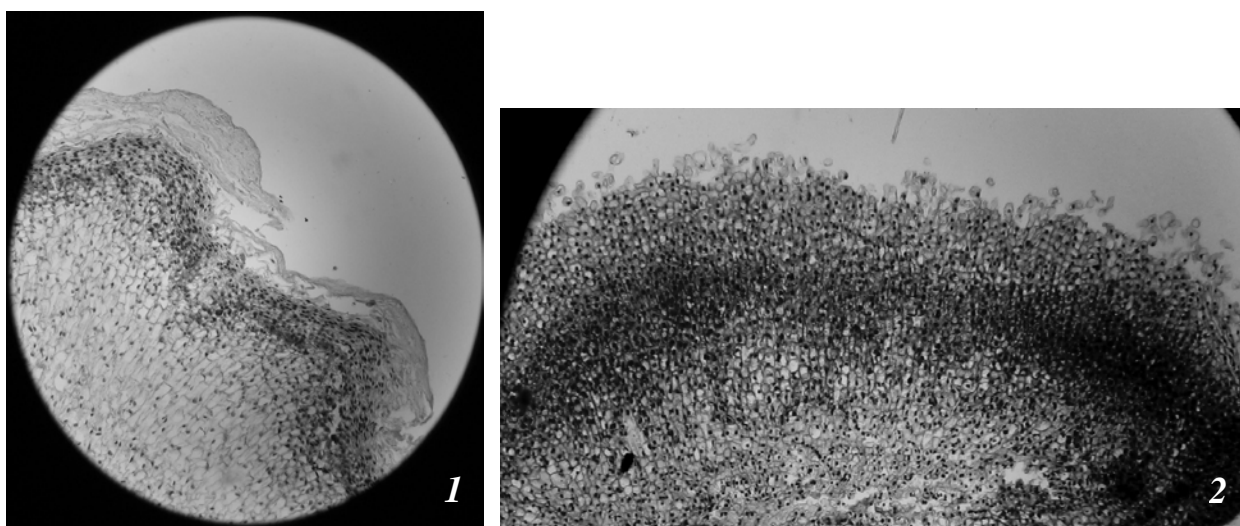


Рис. 60. Разрастание морфогенетического очага в морфогенном каллусе. Среда I, 5 сут культивирования *in vitro*. 1. Продольный срез, x150; 2. Продольный срез, x200

Под разрушающимися клетками наблюдается оформление эпидермального слоя морфогенетического очага, параллельно поверхности которого начинается дифференциация меристематической зоны (рис. 61).

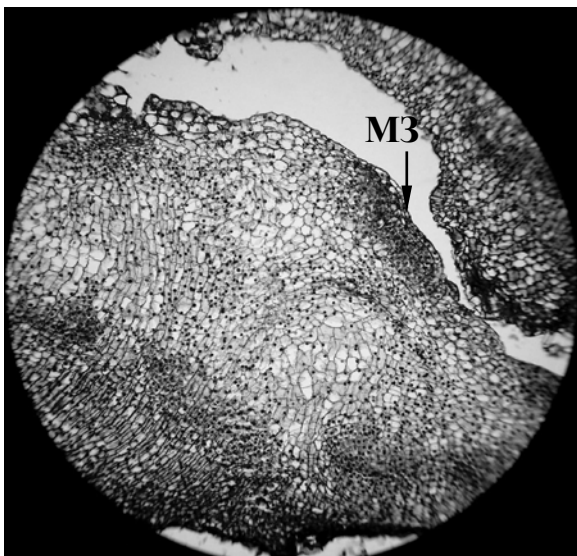


Рис. 61. Формирование меристематической зоны в морфогенетическом очаге. Среда I, 5 сут культивирования *in vitro*. Продольный срез, $\times 220$. Условное обозначение: МЗ – меристематическая зона

Интенсивные деления клеток меристематической зоны ведут как к нарастанию массы каллуса, так и к многочисленным инвагинациям его поверхности. Заложение примордиев первых листьев происходит экзогенно на поверхности морфогенетических очагов. При этом к образованию примордиев ведут активные периклиальные деления клеток субэпидермальных слоев меристематической зоны (рис. 62, 63).

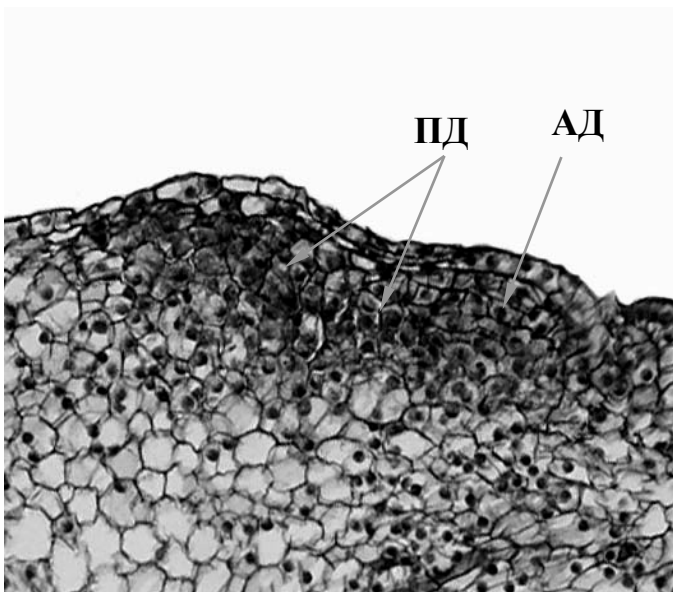


Рис. 62. Антиклинальные и периклиальные деления клеток субэпидермальных слоев меристематической зоны каллуса. Продольный срез, $\times 450$. Условные обозначения: АД – антиклинальные деления, ПД – периклиальные деления

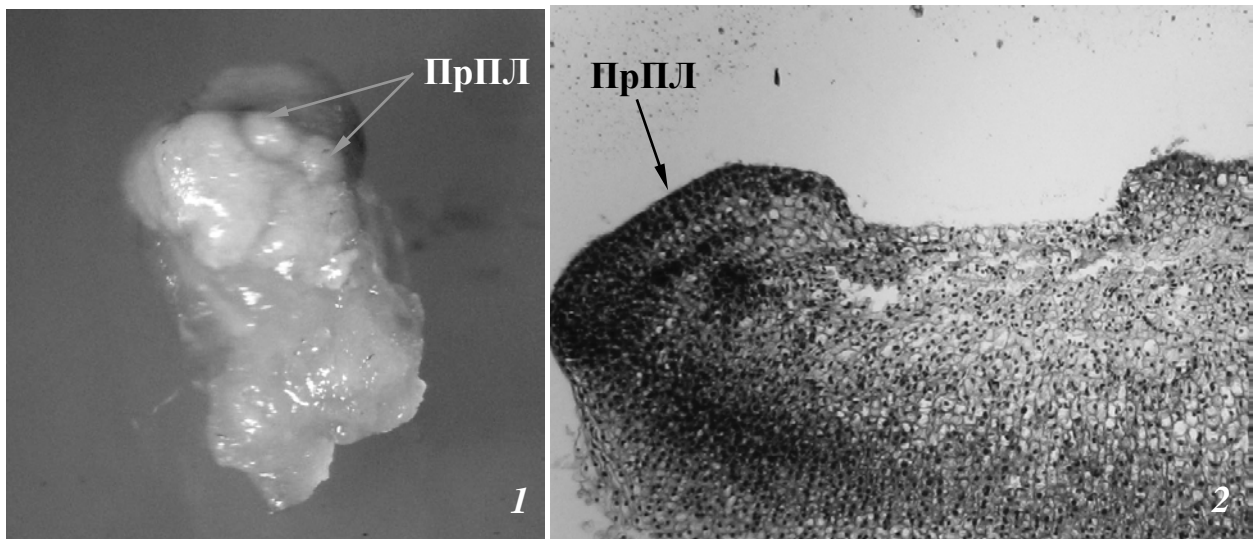


Рис. 63. Формирование примордиев первых листьев в морфогенетическом очаге. Среда I, 10 сут культивирования *in vitro*: 1. Макросъемка, х50; 2. Продольный срез, х300. Условное обозначение: ПрПЛ – примордий первого листа

Примордии первых листьев постепенно развиваются в первые листья, и формируется почка (рис. 64).

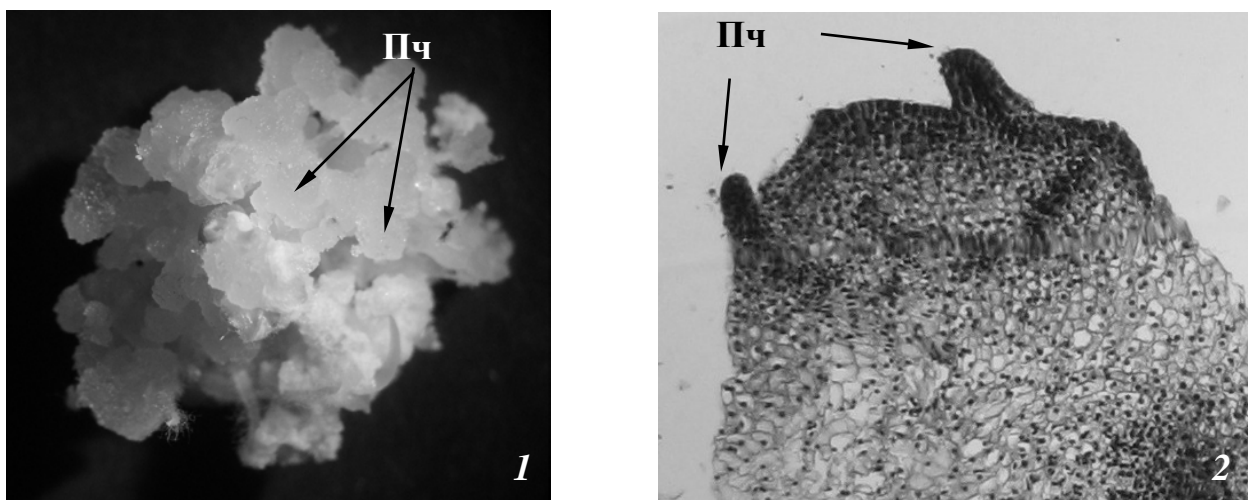


Рис. 64. Формирование и развитие почек в морфогенном каллусе. Среда I, 10 сут культивирования *in vitro*: 1. х30, макросъемка; 2. х300, продольный срез. Условное обозначение: Пч – почка

Далее при достаточной степени развитости почек (рис. 65, 1) в морфогенном каллусе наблюдается заложение корневых меристем – как в базальной, так и в средней части каллуса на различном расстоянии от поверхности морфогенетического очага и в различной локализации относительно почки (рис. 65, 2).

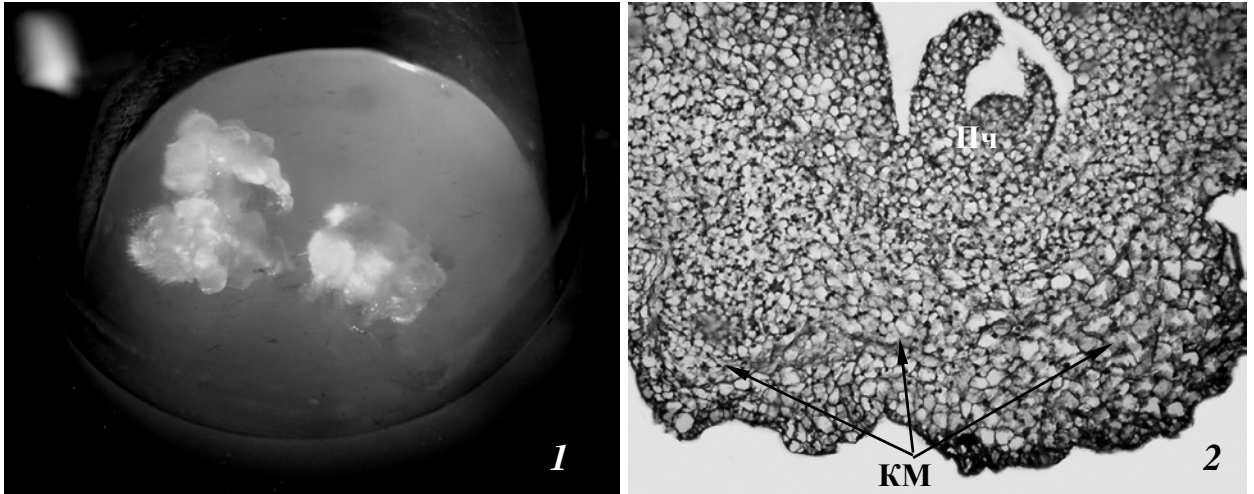


Рис. 65. Развитие почек в морфогенном каллусе и формирование корневых меристем в базальной части морфогенного каллуса. Среда I, 15 сут культивирования *in vitro*: 1 – макросъемка, х5; 2 – продольный срез, х250. Условные обозначения: КМ – корневая меристема, Пч – почка

После формирования корневой меристемы в почке постепенно формируются листья второго порядка (рис. 66).



Рис. 66. Формирование в почке листьев второго порядка. Среда I, 25 сут культивирования *in vitro*. Продольный срез, х400

По мере развития почек и корней между ними постепенно устанавливается связь путем формирования в каллусе элементов сосудистой системы (рис. 67).

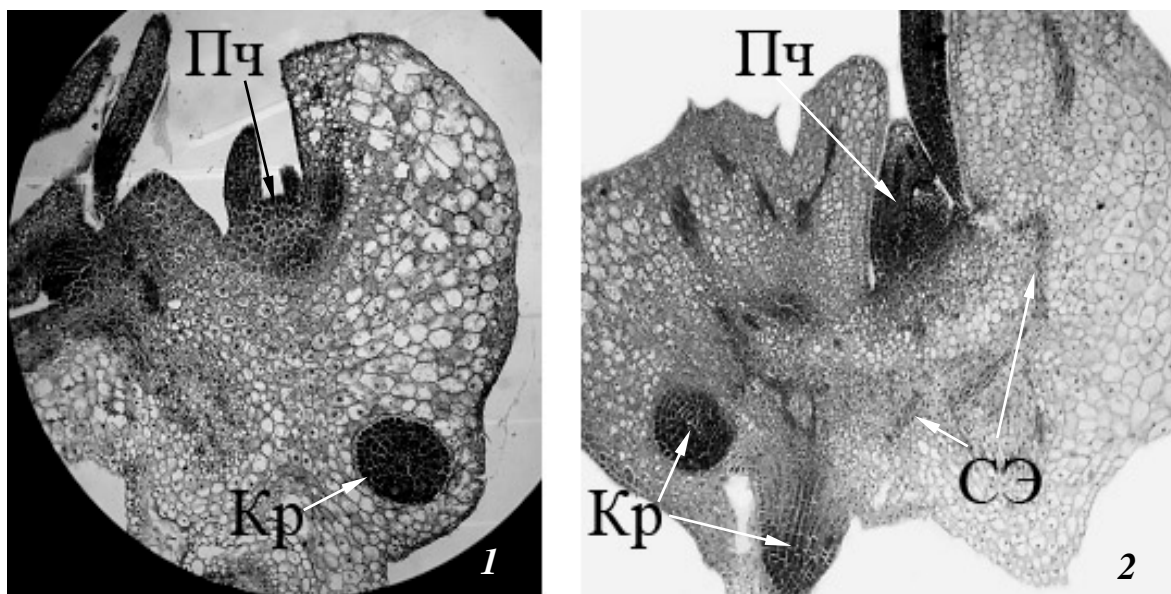


Рис. 67. Гемморизогенез в морфогенном каллусе *in vitro*. 1. Формирование почки и корня. Среда I, 20 сут культивирования *in vitro*, продольный срез, х300; 2. Установление связи между почками и корнями посредством формирования сосудистой системы в морфогенном каллусе. Среда I, 20 сут культивирования *in vitro*, продольный срез, х250. Условные обозначения: Кр – корень; Пч – почка; СЭ – элементы сосудистой системы

Такие хорошо развитые почки, объединенные с корнем в единую систему, далее переносили на питательную среду II с целью получения растений-регенерантов (рис. 68).

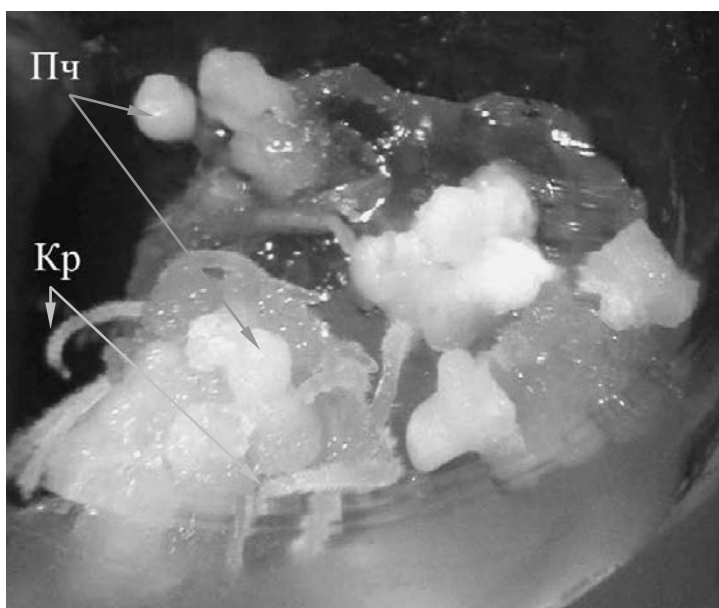


Рис. 68. Почки с корнями в морфогенном каллусе. Среда I, 25 сут культивирования *in vitro*. Макросъемка, х30. Условные обозначения: Кр – корень, Пч – почка

Соматический эмбриогенез как путь морфогенеза in vitro в морфогенном каллусе

Помимо гемморизогенеза к формированию растений-регенерантов приводил такой путь морфогенеза *in vitro* в морфогенном каллусе, как соматический эмбриогенез (эмбриоидогенез).

При этом пути на питательной среде I в морфогенных каллусах формируются зародышеподобные структуры – соматические зародыши (эмбриоиды).

Формирование соматических зародышей в культивируемых каллусах свидетельствует об исключительно высокой степени тотипотентности каллусных клеток: в условиях *in vitro* к морфогенезу оказываются способны структуры, сами полученные в условиях культивирования за счет свойства тотипотентности клеток изначальных структур, в данном случае – органов незрелых зародышей.

Цито-гистологический анализ морфогенных каллусов в динамике культивирования позволил выявить клеточные и тканевые особенности формирования соматических зародышей *in vitro*.

Выявлено, что на индукционной питательной среде I в каллусах из морфогенетических очагов начинают формироваться эмбриогенные клеточные комплексы (ЭКК). Этот термин предложен Т.Б. Батыгиной с соавт. [1978].

Формирование ЭКК отмечается уже на 10 сут культивирования морфогенных каллусов. Как и в случае **гемморизогенеза**, ЭКК берут начало от морфогенетических очагов в каллусе. Постепенно ЭКК обособляются от остального каллуса. Окружающие клетки каллуса дегенерируют (рис. 69).

ЭКК состоит главным образом из недифференцированных меристематических клеток, способных к дальнейшему развитию.

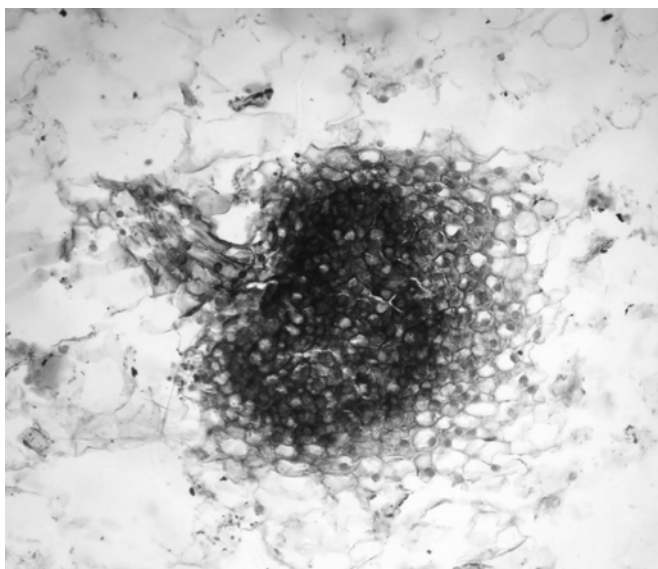


Рис. 69. Эмбрионный клеточный комплекс в морфогенном каллусе. Среда I, 10 сут культивирования *in vitro*. Продольный срез, x150

Согласно цито-гистологическим исследованиям, в формировании соматического зародыша принимает участие весь ЭКК как единое целое, окруженное плотной эпидермальной оболочкой. Иначе говоря, формирование соматических зародышей со всеми органами, присущими зиготическому зародышу, происходит путем реорганизации всего ЭКК в эмбрионид.

Поэтому, начиная с 10 сут культивирования на индукционной питательной среде I, можно говорить о генезисе соматического зародыша внутри морфогенного каллуса.

Постепенно формируется ось полярности, и к 15 сут культивирования на индукционной питательной среде I соматический зародыш из округлого становится вытянутым (рис. 70).

К 20 сут культивирования на индукционной питательной среде I практически одновременно формируются апикальный и базальный полюсы соматического зародыша, клетки которых отличаются друг от друга. Базальный полюс соматического зародыша на этой фазе развития становится удлинённым, его клетки плотно прилегают друг к другу.

В нижней части базального полюса формируется суспензор. В соматическом зародыше формируется хорошо развитый эпидермис, клетки которого, как правило, имеют утолщенные оболочки.

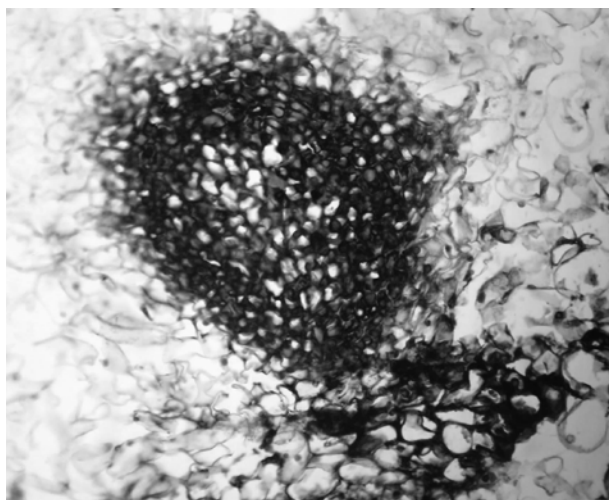


Рис. 70. Соматический зародыш в каллусе. Среда I, 15 сут культивирования *in vitro*. Продольный срез, x150

Клеточные деления наблюдаются преимущественно в апикальном полюсе, который постепенно приобретает шаровидную форму и увеличивается в размерах.

В ходе дальнейшего культивирования *in vitro* на индукционной питательной среде I, к 25 сут, в соматических зародышах закладываются апексы корня и апекса побега (рис. 71). Этот факт подтверждает, что в данном случае формируется соматический зародыш, а не почка.

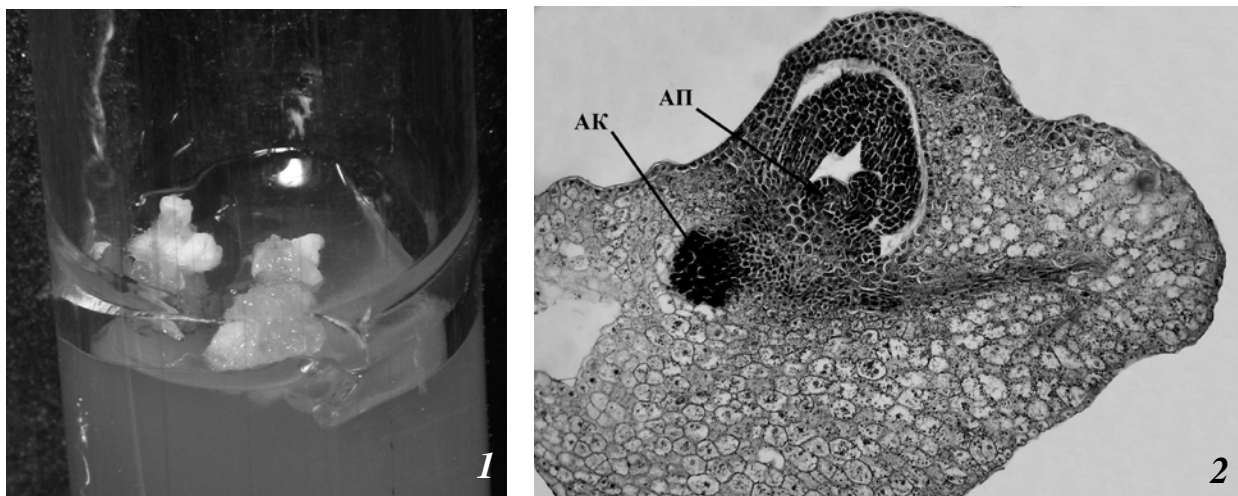


Рис. 71. Соматический зародыш в морфогенном каллусе. Среда I, 25 сут культивирования *in vitro*. 1. Макросъемка, x5; 2. Продольный срез, x150. Условные обозначения: АП – апекс побега, АК – апекс корня

Соматические зародыши к 30 сут культивирования появляются на поверхности каллуса (рис. 72 ,1). В таких соматических зародышах закладываются примордии первого листа (рис. 72, 2).

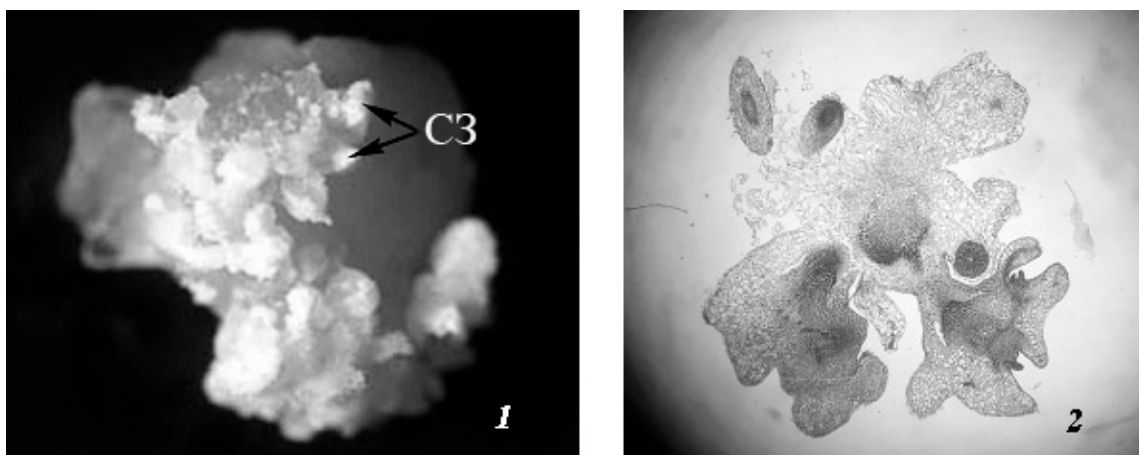


Рис. 72. Соматические зародыши на морфогенном каллусе. Среда I, 30 сут культивирования *in vitro*. 1. Макросъемка, х40; 2. Продольный срез, х55. Условные обозначения: СЗ – соматический зародыш

К 40 сут культивирования происходит развитие заложившихся зародышевого корня и первого листа, закладываются и развиваются щиток, coleoptиль и последующие зачатки листьев; обособляется coleориза. Соматический зародыш сформирован (рис. 73).

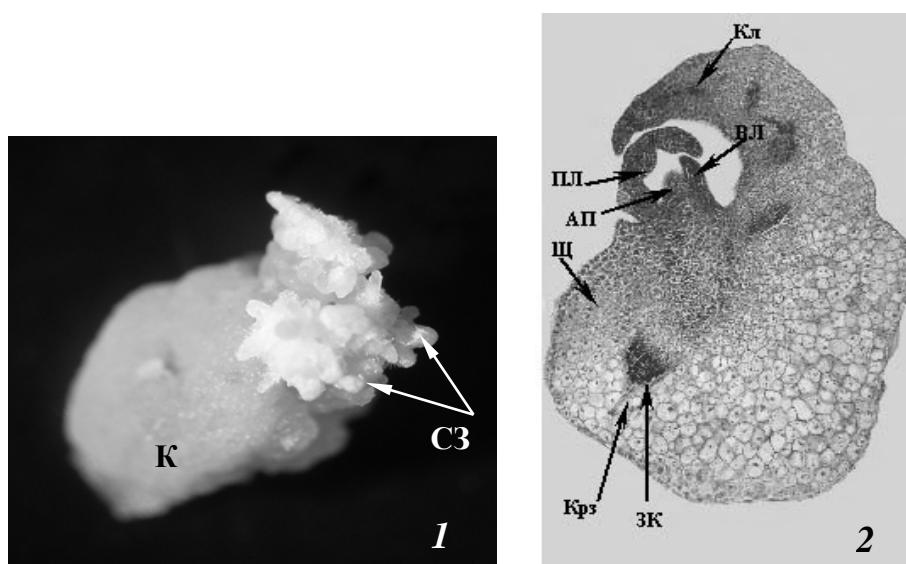


Рис. 73. Соматические зародыши на морфогенном каллусе. Среда I, 35 сут культивирования *in vitro*. 1. Макросъемка, х20; 2. Продольный срез, х55. Условные обозначения: К – каллус, АП – апекс побега, ВЛ – второй лист, ЗК – зародышевый корень, Кл – coleoptиль, Крз – coleориза, ПЛ – первый лист, СЗ – соматический зародыш, Щ – щиток

2.4. Регенерация растений, полученных в эмбриокультуре, в условиях *in vitro* и *ex vitro*

Через каждые 5 сут культивирования *in vitro* на среде I часть каллусов переносили на среду II для регенерации растений, составленную по [Murashige, Skoog, 1962], с добавлением 0.2 мг/л кинетина. На этой среде гемморизогенные структуры и соматические зародыши прорастали в растения-регенеранты.

Формирование *in vitro* растений-регенерантов из соматических зародышей и гемморизогенных структур на среде II протекало сходным образом, различаясь только продолжительностью в начале развития, включая фенотипическую фазу кущения (рис. 74, 75).

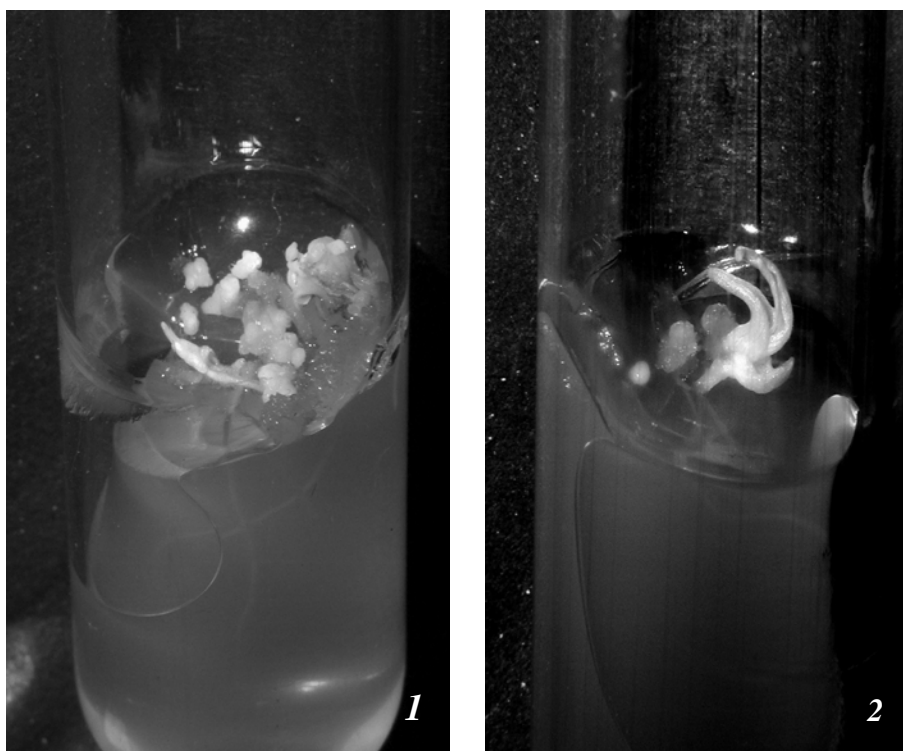


Рис. 74. Прораствание соматического зародыша (1) и формирование третьего листа (2) у растения-регенеранта пшеницы на среде II. Макросъемка. 1. Рост колеоптиля и адвентивных корней на 3 сут культивирования *in vitro*. x2.8; 2. Рост колеоптиля и формирование третьего листа на 5 сут культивирования *in vitro*. x1.8

В начале прорастания отмечено удлинение колеоризы и рост зародышевого корня. Рост колеоптиля начинается позднее, через 3 сут от начала прорастания. Одновременно с ростом колеоптиля в длину начинается рост адвентивных корней. После выхода из колеоптиля первого листа развиваются листья следующих порядков.

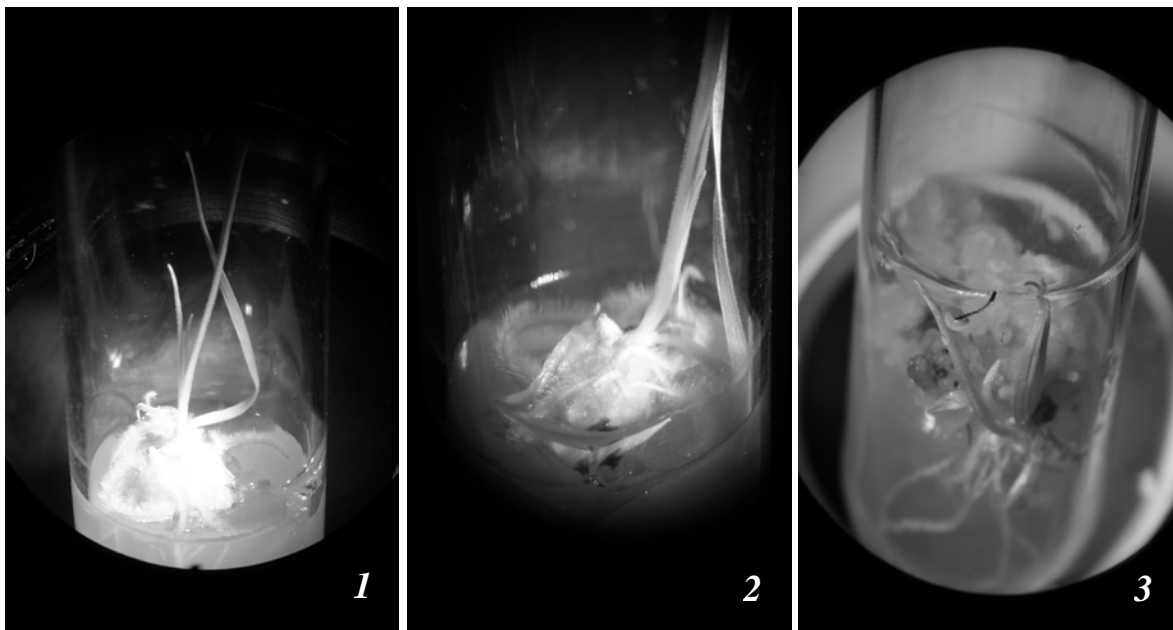


Рис. 75. Отдельные этапы кушения у растения-регенеранта пшеницы, полученного из гемморизогенной структуры, на среде II. Макросъемка. 1. Начало фенофазы кушения на 16 сут культивирования *in vitro*. x1.5; 2. Фенофаза кушения на 17 сут культивирования *in vitro*. x1.5; 3. Фенофаза кушения на 18 сут культивирования *in vitro*. x1.5

Выявлен способ увеличения количества соматических зародышей и гемморизогенных структур в морфогенных каллусах за счет оптимальной продолжительности их культивирования на среде I, что позволяет увеличить количество формирующихся растений-регенерантов.

Так, максимальное количество растений-регенерантов (80% от количества высаженных каллусов при соматическом эмбриогенезе и 70% - при гемморизогенезе) образуется при переносе каллусов на среду II для регенерации соответственно после 20 и 25 сут культивирования *in vitro* на среде I.

Отдельные этапы множественного формирования растений-регенерантов из соматических зародышей в морфогенном каллусе при культивировании *in vitro* на среде II представлены на рис. 76.

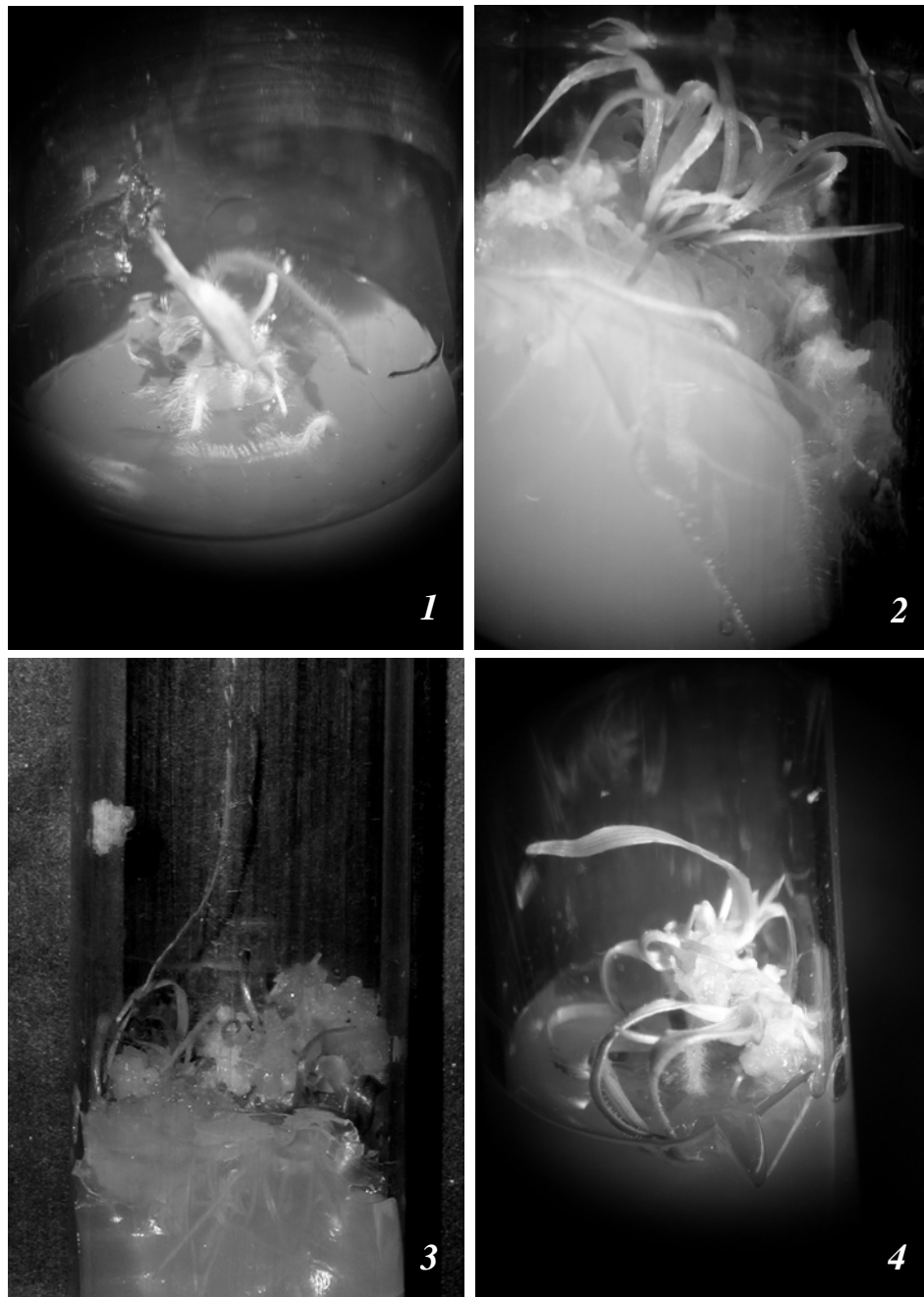


Рис. 76. Множественное формирование растений-регенерантов из соматических зародышей в морфогенных каллусах на среде II. Макросъемка. 1. Фенофаза третьего листа на 16 сут культивирования *in vitro*. x2.1; 2. Начало фенофазы кущения на 17 сут культивирования *in vitro*. x2.2; 3. Фенофаза кущения на 18 сут культивирования *in vitro*. x1.3; 4. Фенофаза кущения на 19 сут культивирования *in vitro*. x1.4

Окончание фенофазы кущения растений-регенерантов, образованных из соматических зародышей, как единичных, так и множественных, отмечалось на 21 сут (рис. 77), растений-регенерантов, образованных из гемморизогенных структур, – на 25 сут культивирования *in vitro* на среде II (рис. 78).

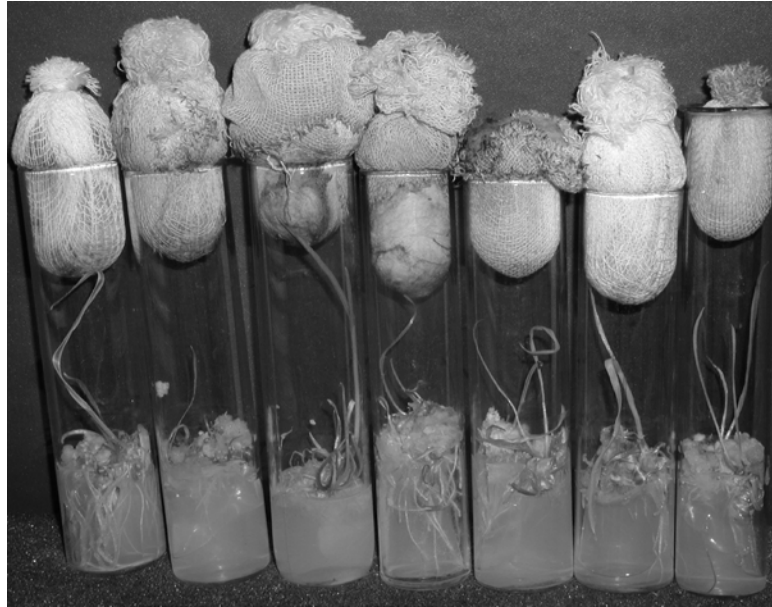


Рис. 77. Растения-регенеранты, полученные из соматических зародышей, в окончании фенофазы кущения. 21 сут культивирования *in vitro* на среде II. Макросъемка, $\times 0.8$

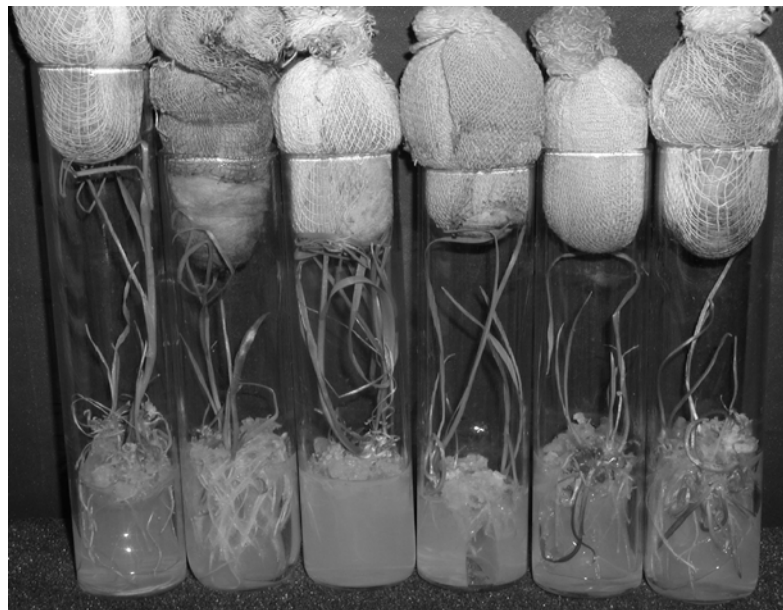


Рис. 78. Растения-регенеранты, полученные из гемморизогенных структур, в окончании фенофазы кущения. 25 сут культивирования *in vitro* на среде II. Макросъемка, $\times 0.8$

Хорошо известно, что в ходе культивирования *in vitro* в растениях-регенерантах могут происходить различного рода мутации [Кунах, 1999; и др.]. Поэтому в фенофазе кущения растения-регенеранты извлекали из пробирок и проводили их цитогенетическую оценку. Для этого подсчитывали число хромосом в метафазной пластинке клеток кончика одного из корней.

Установлено, что незначительная часть растений-регенерантов (3 % при регенерации из соматических зародышей и 5 % при регенерации из гемморизогенных структур) при морфологически нормальном строении характеризуется кариологическими аномалиями – формированием гаплоидов и анеуплоидов.

Для дальнейших экспериментов отбирали только те растения-регенеранты, которые прошли кариологический тест на диплоидность ($2n=42$) (рис. 79).

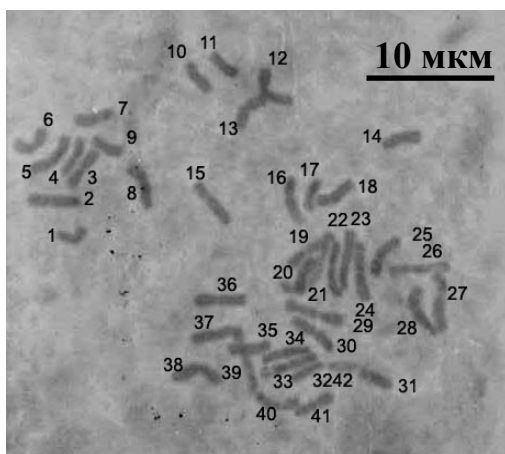


Рис. 79. Метафазная пластинка диплоидного ($2n=42$) растения-регенеранта пшеницы

Растения-регенеранты, прошедшие в фенофазе кущения тест на диплоидность, переносили в условия *ex vitro* в вегетационные сосуды со специально подобранной почвенной смесью.

Дальнейшая вегетация растений-регенерантов проходила на лабораторной светоплощадке при щадящем температурном режиме ($+20^{\circ}\text{C}$) и условиях освещенности, приближенных к условиям светового дня (16-часовой фотопериод, освещенность 20 тыс. лк).

Развитие растений-регенерантов яровой мягкой пшеницы, образовавшихся в культуре *in vitro* как из соматических зародышей, так и из гемморизогенных структур, в условиях *ex vitro* шло типично для развития растений яровой мягкой пшеницы в естественных условиях (например, [Батыгина, 1974, 1987; Куперман, 1977; Челак, 1991]) как по последовательности прохождения фенофаз выхода в трубку, стеблевания, колошения, цветения, молочной, восковой спелости (рис. 80), так и по их продолжительности.

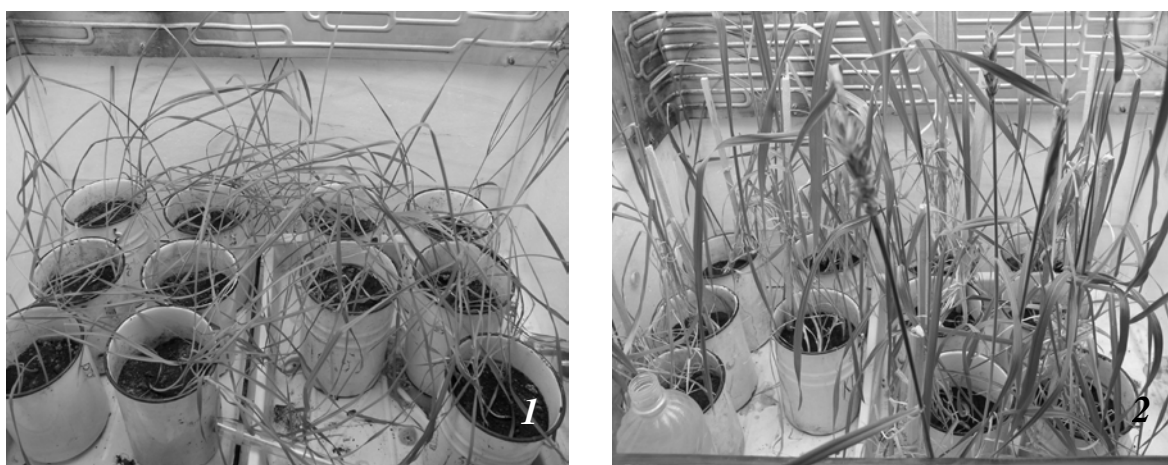


Рис. 80. 1. Растения-регенеранты, образовавшиеся из соматических зародышей, в фенофазу стеблевания в условиях *ex vitro*. Макросъемка, $\times 0.2$; **2.** Растения-регенеранты, образовавшиеся из гемморизогенных структур, в фенофазу молочной спелости в условиях *ex vitro*. Макросъемка, $\times 0.2$

В фенофазе полной спелости зерна провели лабораторную оценку всхожести зерна растений-регенерантов путем их проращивания в чашках Петри при $+27^{\circ}\text{C}$ в темноте (рис. 81).

Полученные результаты демонстрируют высокую лабораторную всхожесть полученных зерен (95-97 %), подтвержденную их высокой полевой всхожестью (рис. 82), равной 83-85 %.

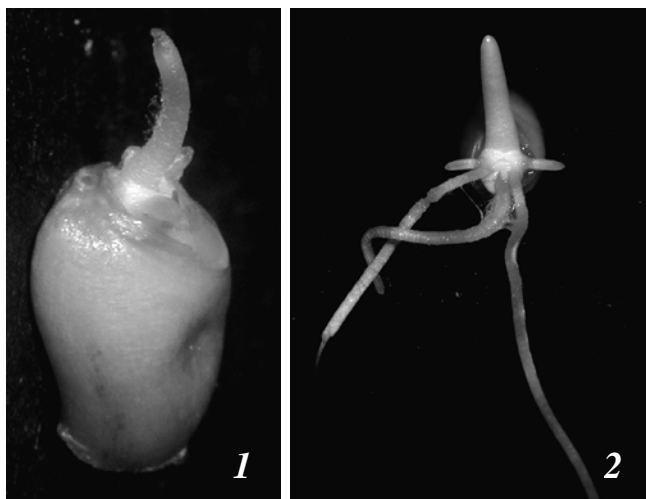


Рис. 81. Зерновки растений-регенерантов пшеницы, полученных в культуре *in vitro* из соматических зародышей. Макросъемка. 1. Зерновка через 1 сут проращивания. x30; 2. Зерновка через 3 сут проращивания. x10



Рис. 82. Растения пшеницы, выращенные из зерновок растений-регенерантов, в фенофазе кущения. Полевые условия научного стационара Института биологии Уфимского НЦ РАН (Уфимский район). Вегетационный сезон 2007 г.

Качество зерновок растений-регенерантов подтверждено данными цито-гистологического анализа зародышей.

Так, сравнительный анализ цито-гистологического статуса зародыша в зерновке растения-регенеранта, полученного в культуре *in vitro* из соматического зародыша яровой мягкой пшеницы гибридной линии Фотос (рис. 83, 1), и зародыша в зерновке донорного растения яровой мягкой пшеницы гибридной линии Фотос (рис. 83, 2) на одной и той же стадии сформированного зародыша свидетельствует об их принципиальном сходстве.

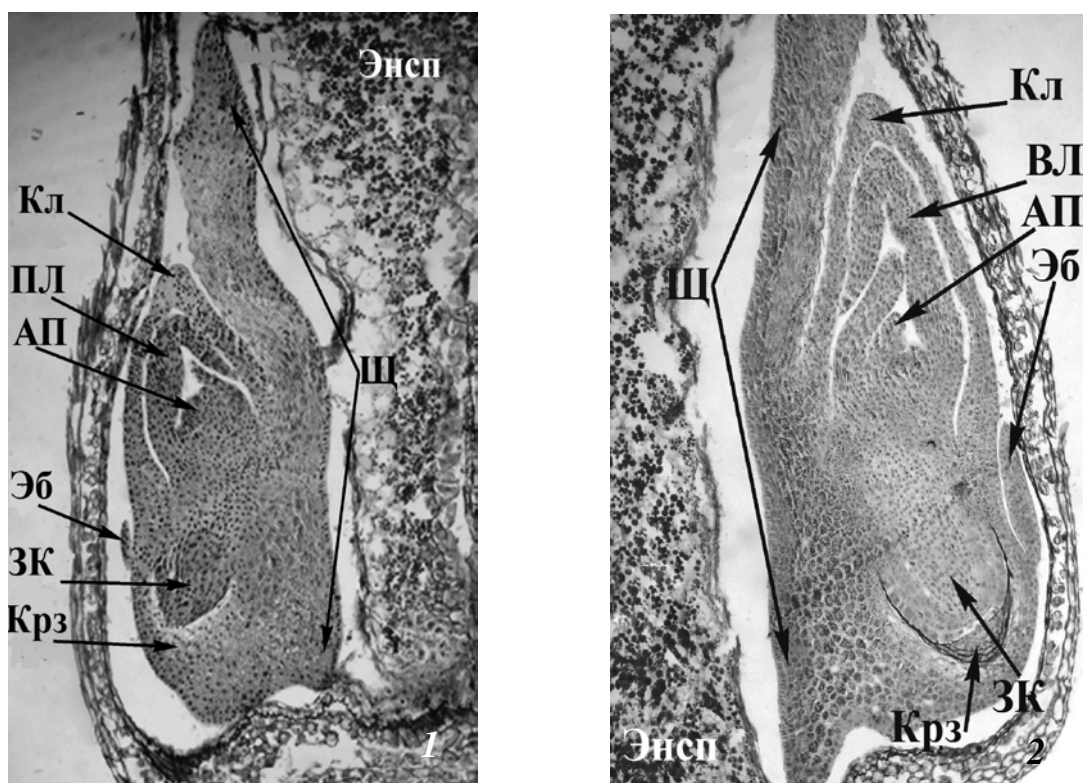


Рис. 83. Сформированные зародыши в зерновке растения-регенерата яровой мягкой пшеницы (1) и в зерновке яровой мягкой пшеницы донорного растения (2). 1. Продольный срез, $\times 75.0$; 2. Продольный срез, $\times 60.0$. Условные обозначения: Ап – апекс побега, Зк – зародышевый корень, Кл – колеоптиль, Крз – колеориза, Пл – первый лист, Щ – щиток, Эб – эпибласт, Энсп – эндосперм

Таким образом, растения-регенеранты, полученные в культуре морфогенного каллуса *in vitro* как из соматических зародышей, так и гемморизогенных структур, в своем развитии в условиях *in vitro* и *ex vitro* проходят те же фазы и практически той же продолжительности, что и донорные растения яровой мягкой пшеницы. Растения-регенеранты формируют зерновки высокого качества, что подтверждается лабораторными и полевыми наблюдениями.

В целом, разработанные экспериментальные биотехнологические подходы с учетом данных цито-гистологического анализа позволяют получать полноценные фертильные растения-регенеранты яровой мягкой пшеницы в эмбриокультуре *in vitro*.

Анализ экспериментальных данных свидетельствует о зависимости ответной реакции зародыша пшеницы (формирование проростка, формирование морфогенного/неморфогенного каллуса, дегенерация), инокулированного в условия *in vitro* на индукционную питательную среду, от времени, прошедшего после опыления (что коррелирует со стадией эмбриогенеза инокулируемого зародыша) и от концентрации гормонов в индукционной питательной среде, в частности, синтетического аналога ауксина 2,4-Д (табл. 2).

В условиях выполненных экспериментов к формированию морфогенного каллуса у всех изученных объектов вела инокуляция только зародышей через 15-17 сут после опыления. Для таких зародышей характерен определенный цито-гистологический статус: наличие органов на ранней стадии развития, имеющих значительное количество меристематических клеток, обладающих наибольшим морфогенным потенциалом. Вероятно, на процесс формирования морфогенного каллуса оказывают влияние градиенты гормональных и трофических факторов, присутствующие во всех тканях и органах незрелых зародышей, однако этот важный вопрос требует специальных исследований.

Цито-гистологические исследования показали, что морфогенный каллус пшеницы зародышевого происхождения изначально представлен различными группами клеток, что подтверждает мнение Т.Б.Батыгиной [1999] о гетерогенности структуры каллуса любого происхождения.

Морфологическими и цито-гистологическими исследованиями установлено, что в условиях культуры *in vitro* различные группы клеток каллуса пшеницы реализуют морфогенетические программы различными путями (геммогенез, ризогенез, гемморизогенез, соматический эмбриогенез).

Выявленные пути морфогенеза *in vitro* в целом известны по литературным данным в каллусах различного происхождения у различных растений [Батыгина, 1987, 1999; Эльконин, Тырнов, 1990; Рахимбаев с соавт., 1992; Бутенко, 1999; Дунаева с соавт., 2000; Бишимбаева с соавт., 2001; Oldach *et al.*, 2001; Лутова, 2003; Румянцева с соавт., 2004; Huang, Wei, 2004; Pellegrineschi *et al.*, 2004; Эмбриологические основы.., 2005; От микроспоры к сорту, 2008 и др.]. Важно подчеркнуть установленную цито-гистологическими методами универсальность начального этапа всех выявленных путей морфогенеза *in vitro*: в каллусе формируется морфогенетический очаг, представленный главным образом меристематическими клетками, способными к морфогенезу. При этом повышения количества очагов можно добиться оптимальной продолжительностью культивирования каллуса *in vitro* на индукционной среде.

Согласно полученным данным, морфогенные каллусы пшеницы зародышевого происхождения можно отнести к тем объектам, у которых клеточные деления и последующий соматический эмбриогенез индуцируются в клетках глубинных слоев, в отличие от описанных в литературе многочисленных случаев формирования соматических зародышей из эпидермальных и субэпидермальных клеток, как, например, у арахиса [Chengalrayan *et al.*, 2001] или кофе [Quiroz-Figueroa *et al.*, 2002]. Кроме того, в данном случае соматический зародыш формируется путем реорганизации всего эмбриодогенного клеточного комплекса (ЭКК). Это может свидетельствовать о том, что процесс образования и развития ЭКК является, по сути, незавершенным эмбриогенезом. При индукции соматического эмбриогенеза в каллусе, по-видимому, завершается экспрессия текущей программы развития и происходит её замещение на эмбриогенную программу экспрессии генов, как считают A.P.Mordhorst *et al.* [1997].

Полученные данные свидетельствуют о том, что морфогенез в культуре *in vitro* разновозрастных зародышей зависит от комплекса разнообразных факторов, сочетание которых определяет как пути морфогенеза, так и способы образования растений-регенерантов.

Анализ полученных экспериментальных данных позволяет дать рекомендации по управлению морфогенезом каллуса *in vitro* в нужных биотехнологу направлениях, ведущих к формированию и развитию полноценных фертильных растений-регенерантов (гемморизогенез, соматический эмбриогенез). Важно подчеркнуть, что соматический эмбриогенез биотехнологически оптимален, поскольку в данном случае, как и в случае андроклиной гаплоидии (глава 1), в растение прорастает зародыш со всеми сформированными органами.

В тех случаях, когда цель конкретной биотехнологии – получить растения-регенеранты пшеницы, минимизировав соматическую изменчивость, в процессе культивирования *in vitro* следует избегать этапа формирования каллуса. Для этого незрелый зародыш пшеницы следует изолировать в стадии автономности на 20–25 сут после опыления. К этому времени в зародыше имеется определенный уровень эндогенных регуляторов роста, обеспечивающих в сочетании с другими веществами дальнейшую нормальную дифференциацию зародыша и его прорастание [Батыгина, 1987]. Для массового получения растений-регенерантов, а также для повышения соматической изменчивости, например, в целях клеточной селекции, целесообразна регенерация растений пшеницы через этап формирования морфогенного каллуса. В этом случае следует культивировать незрелые зародыши, изолированные на 15–17 сут после опыления. Оптимизированный биотехнологический регламент получения растений-регенерантов яровой мягкой пшеницы в каллусной культуре *in vitro* зародышевого происхождения и в условиях *ex vitro* приведен на рис. 84.

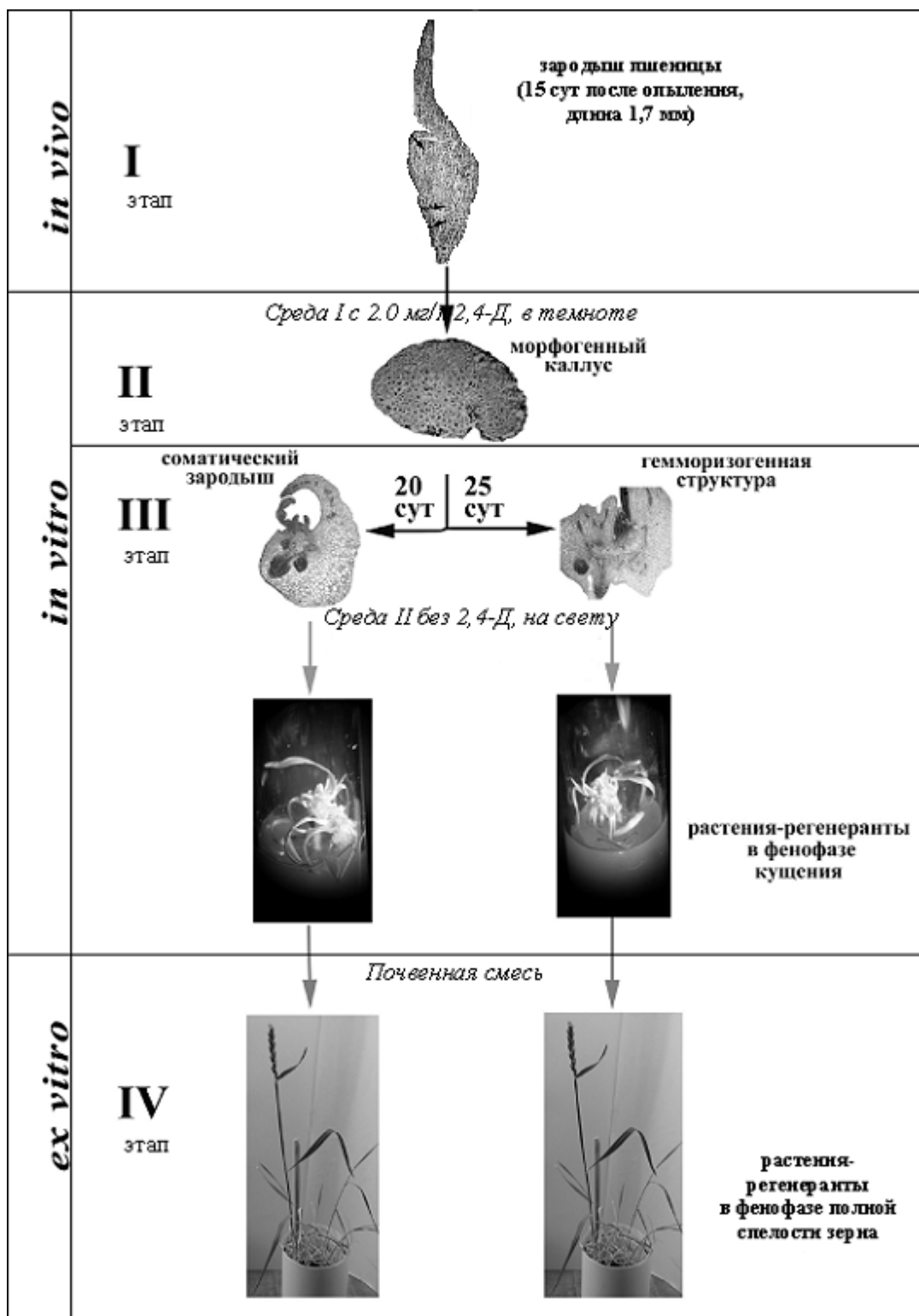


Рис. 84. Оптимизированный регламент биотехнологии получения растений-регенерантов яровой мягкой пшеницы в условиях *in vitro* и *ex vitro*

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Одной из сложнейших фундаментальных проблем биологии остается изучение регенерации растений как результата реализации онтогенеза и его частного случая – морфогенеза.

Прекрасными моделями для изучения процесса развития многоклеточных организмов из одной инициальной клетки (или группы инициальных клеток) служат культуры *in vitro* клеток растений. Клетки в условиях *in vitro* способны проявлять свой морфогенетический потенциал вплоть до формирования плодоносящего растения-регенеранта, причем контролируемые условия роста и развития позволяют управлять этим процессом.

В последние годы сделаны важные обобщения, позволяющие приблизиться к пониманию клеточных и тканевых механизмов регенерации полноценных растений в нетрадиционных системах размножения в условиях *in vitro* и *ex vitro*, в том числе андроклиной гаплоидии и эмбриокультуре. Хорошо установлено, что регенерация растений *in vitro* и *ex vitro* – сложный интегральный процесс, зависящий от целого комплекса разнообразных факторов, сочетание которых определяет образование полноценных фертильных растений-регенерантов.

Однако далекими от окончательного решения остаются многие принципиальные вопросы, которые, безусловно, следует решать на клеточном, тканевом и органном уровнях с привлечением не только световых микроскопов последнего поколения (подробнее об этом: [Световой микроскоп как инструмент в биотехнологии растений, 2008]), но и других современных методов цитологических исследований, например флуоресцентной, конфокальной лазерной, туннельной микроскопии и электронной микроскопии – трансмиссионной и сканирующей.

Кроме того, важно привлечение данных иных, помимо микроскопии, современных подходов в биологических исследованиях.

В этом плане интересны работы, посвященные эпигенетике – направлению генетики, предмет которой – изучение наследственных изменений генной экспрессии, происходящих без изменений ДНК–последовательностей. Разрабатывается направление эпигенетики растений, связанной с анализом изменчивости единиц наследственности (в ядре и цитоплазме) и сопутствующая им изменчивость признаков и свойств особей на уровне целого организма [Эпигентика растений, 2005]. Концепция эпигенов как систем генов, имеющих не менее двух устойчивых режимов функционирования подчиненных ей генов и способных сохранять каждый из режимов в последовательном ряду генераций [Чураев, 2005, 2006], по-видимому, применима, например, для объяснения путей морфогенеза сильновакуолизированной микроспоры *in vitro* или путей морфогенеза клеток каллуса, полученного в культуре *in vitro* пыльников или зародышей. Вполне вероятно, что в этих случаях происходит реализация эпигеномных подпрограмм развития компетентных клеток.

В последние годы возник значительный интерес к так называемым стволовым клеткам, сохраняющим мощный потенциал к развитию в разных направлениях и способным давать в ходе дифференциации самые разнообразные производные. Такие клетки хорошо изучены на примере животных. Установлено, что в данном случае это тотипотентные клетки бластоцист (эмбриональные стволовые клетки) и мультипотентные герминативные клетки энто–, экто– и мезодермы, дающие в эмбриогенезе начало всем тканям организма (по [Викторов, 2001]).

Существование стволовых клеток у растений частью исследователей ставится под сомнение. Большинство же авторов,

допускающих наличие стволовых клеток у растений, в качестве таковых рассматривают часть клеток апикальных меристем побега и корня, т.е. осевых органов (обзор [Иванов, 2003]).

По мнению Т.Б.Батыгиной [Батыгина с соавт., 2004; Батыгина, Рудский, 2006], образование стволовых клеток растений характерно не только для апексов побега и корня (меристема ожидания и покоящийся центр), но, по-видимому, для всех органов (цветок, стебель, лист, корень) и всех этапов жизненного цикла (спорофит, гаметофит), причем их функционирование зависит, прежде всего, от их локализации и назначения. Исследователи на основании анализа литературных и оригинальных данных, выделяют следующие характерные черты стволовым клеткам растений: свойство тотипотентности или плюрипотентности, т.е. способность к образованию не только разных типов тканей и органов, но и нового индивидуума за счет различных путей морфогенеза (эмбрио-, эмбриоидо-, гемморизогенез); относительный покой (низкая метаболическая активность, растянутость клеточного цикла) и, как следствие, редкие деления по сравнению с окружающими клетками; свойство самоподдержания, т.е. создания пула клеток, главным образом, благодаря симметричным делениям и системе межклеточных взаимодействий; способность к пролиферации и образованию клеток-предшественников разных типов тканей («ниши») за счет асимметричных делений при действии определенных сигналов; пульсирующий и многоступенчатый характер образования в ткани или органе и способность к переключению программы развития, что обеспечивается различными молекулярно-генетическими механизмами. Следует учитывать, что время и способ реализации морфогенетических потенций стволовых клеток в значительной степени определяется их функциональным назначением и созданной ими «нишей» (окружающими тканями – дериватами самих стволовых клеток),

возникающими между ними морфофизиологическими корреляциями и определенными молекулярно-генетическими механизмами.

По-видимому, именно в аспекте проблемы ствольных клеток следует рассматривать инициальные клетки андроклинии в пыльнике, поскольку для них характерны все выше перечисленные свойства. Особенное звучание с позиций теории ствольных клеток приобретает морфогенетическая компетентность инициальных клеток андроклинии к переключению программы развития с гаметофитной на спорофитную, т.е. переключению способа репродукции с полового на бесполой.

В целом, спорогенные клетки пыльника, нетрадиционно развивающиеся по спорофитной программе *in vitro* с образованием растения-регенеранта, в отличие от обычного развития по гаметофитной программе *in vivo* с образованием пыльцевого зерна, представляют собой удобную модель для исследования фундаментальных проблем биологии развития, таких как индукция, детерминация, дифференциация клеток, стволовость клеток.

Важно и прикладное значение полученных полноценных фертильных растений-регенерантов и их семян в генетико-селекционных исследованиях яровой мягкой пшеницы – основного хлебного злака.

Современные биотехнологические методы – андроклинная гаплоидия, эмбриокультура, соматическая гибридизация, клеточная селекция, во многом основанные знаниях о клеточных и тканевых механизмах морфогенетических процессов в эксплантах, – способны кардинально изменить процесс селекционной работы по выведению новых высокопродуктивных и устойчивых сортов пшеницы [От микроспоры к сорту, 2008].

При этом к качеству удобных модельных систем при изучении устойчивости пшеницы к воздействию неблагоприятных факторов,

например грибным заболеваниями, могут быть использованы каллусы зародышевого происхождения [Максимов с соавт., 2004a,b; Трошина с соавт., 2004a,b; Maksimov *et al.*, 2006; Яруллина с соавт., 2008].

Таким образом, изучение клеточных и тканевых особенностей регенерации растений в условиях *in vitro* и *ex vitro* открывает широкие перспективы как для изучения ряда сложнейших фундаментальных проблем современной биологии, так и для прикладных разработок.

ЛИТЕРАТУРА

Анапияев Б.Б. Культура микроспор и гаплоидная биотехнология пшеницы / под ред. И.Р.Рахимбаева. – Алматы, 2001. – 220 с.

Батыгина Т.Б. Эмбриология пшеницы. – Л.: Колос, 1974. – 206 с.

Батыгина Т.Б. О некоторых закономерностях морфогенеза при регенерации растений *in vitro* // Регион. научн. конф. «Теоретические вопросы регенерации растений»: Тезисы докладов.– Махачкала, 1978. – С. 13-14.

Батыгина Т.Б. Хлебное зерно: атлас. – Л.: Наука, 1987. – 103 с.

Батыгина Т.Б. Морфогенетические резервы репродуктивных структур (тотипотентность и детерминированность) // III съезд ВОФР: Тезисы докладов. Ч. 1. – СПб., 1993а. – С. 65.

Батыгина Т.Б. Эмбриоидогения – новая категория способов размножения цветковых растений // Труды Ботан. ин-та им. В.Л.Комарова. Вып. 8. – 1993б. — С. 15-25.

Батыгина Т.Б. Развитие зародышевых мешков в пыльнике // Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепции. Т. 1: Генеративные органы цветка / Ред. Т.Б.Батыгина. – СПб.: Мир и семья, 1994а. – С. 118-120.

Батыгина Т.Б. Пыльник как модель изучения морфогенетических потенциалов и путей морфогенеза // Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепции. Т. 1: Генеративные органы цветка / Ред. Т.Б.Батыгина. – СПб.: Мир и семья, 1994б. – С. 120-121.

Батыгина Т.Б. Новые типы эмбриогенеза. Graminad-тип // Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепции. Т. 2. Семя / Ред. Т.Б.Батыгина. – СПб.: Мир и семья, 1997а. – С. 520-526.

Батыгина Т.Б. Эмбриогенез злаков // Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепции. Т. 2. Семя / Ред. Т.Б.Батыгина. – СПб.: Мир и семья, 1997б. – С. 528-539.

Батыгина Т.Б. Эмбриодогения // Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепции. Т. 2: Семя / Ред. Т.Б.Батыгина. – СПб.: Мир и семья, 1997в. – С. 624-648.

Батыгина Т.Б. Эмбриогенез и морфогенез половых и соматических зародышей // Физиология растений – 1999. – Т. 46. – № 6. – С. 884-898.

Батыгина Т.Б. Воспроизведение, размножение и возобновление растений // Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепции. Т. 3: Системы репродукции / Ред. Т.Б.Батыгина. – СПб.: Мир и семья, 2000а. – С. 35-39.

Батыгина Т.Б. Эмбриодогения – новый тип вегетативного размножения // Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепции. Т. 3: Системы репродукции / Ред. Т.Б.Батыгина. – СПб.: Мир и семья, 2000б. – С. 334-349.

Батыгина Т.Б., Васильева В.Е. Сингамия // Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепции. Т. 2: Семя / Ред. Т.Б.Батыгина. – СПб.: Мир и семья, 1997а. – С. 143-161.

Батыгина Т.Б., Васильева В.Е. Зигота // Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепции. Т. 2: Семя / Ред. Т.Б.Батыгина. – СПб.: Мир и семья, 1997б. – С. 307-321.

Батыгина Т.Б., Васильева В.Е., Маметьева Т.Б. Проблемы морфогенеза *in vivo* и *in vitro* (эмбриодогенез у покрытосеменных) // Ботан. журн. – 1978. – Т. 63. – № 1. – С. 87-111.

Батыгина Т.Б., Круглова Н.Н. Методические рекомендации по исследованию морфогенетического потенциала пыльника яровой мягкой пшеницы. – Уфа: ИБ УНЦ РАН, 2001. – 39 с.

Батыгина Т.Б., Круглова Н.Н., Горбунова В.Ю. Культура изолированных пыльников злаков с позиции экспериментальной эмбриологии растений (методологические аспекты). – Уфа: БНЦ УрО РАН, 1992. – 32 с.

Батыгина Т.Б., Круглова Н.Н., Горбунова В.Ю. Андрогагенез *in vitro* у злаков: анализ с эмбриологических позиций // Цитология. – 1994. – Т. 36. – № 9-10. – С. 993-1005.

Батыгина Т.Б., Рудский И.В. Роль ствольных клеток в морфогенезе растений // Доклады Академии наук. – 2006. – Т.410. – №5. – С. 1-3.

Батыгина Т.Б., Титова Г.Е., Шамров И.И., Брагина Е.А., Васильева В.Е., Рудский И.В. Проблема ствольных клеток у растений // X Школа по теорет. морф. раст. «Конструкционные единицы в морфологии растений»: Материалы. – Киров, 2004. – С. 20-30.

Белинская Е.В. Влияние холодной предобработки колосьев на эффективность индукции гаплоидов ячменя в культуре пыльников *in vitro* // Физиол. и биохим. культ. раст. – 2005. – Т. 37. - № 5. – С. 436-442.

Белинская Е.В. Создание признаковой коллекции ячменя по способности к андрогагенезу *in vitro* и ее использование в генетических и биотехнологических исследованиях// Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів. – 2007. – Т. 5. – № 1,2. – С. 11-20.

Белинская Е.В. Наследование способности к андрогагенезу *in vitro* у ярового ячменя // Цитология и генетика. – 2008. – Т. 41. – № 4. – С. 27-37.

Белинская Е.В., Наумова Л.Н., Манзюк В.Т. Генотипические особенности индукции гаплоидов в культуре пыльников ячменя // Цитология и генетика. – 1993. – Т. 27. – № 5. – С. 84-88.

Белоусов А.А., Замбриборщ И.С., Игнатова С.А. Изменение частоты андрогагенеза в пыльничковой культуре путем рекуррентного отбора в популяциях кукурузы // Цитология и генетика. – 1998. – Т. 32. – № 6. – С. 63-68.

Биологический энциклопедический словарь / Гл. ред. М.С.Гиляров. – М.: Сов. энциклопедия, 1986. – 831 с.

Бишимбаева Н.К. Цитофизиологические основы биотехнологии длительной регенерации растений в культуре тканей зерновых злаков:

Автореф. ... д-ра биол. наук. – Алматы: Ин-т биологии и биотехнологии растений, 2007. – 37 с.

Бишимбаева Н.К., Денебаева М.Г., Амирова А.К., Рахимова Е.В. Особенности гистологического строения рыхлых эмбрионных каллусов ячменя (*Hordeum vulgare*) // Известия НАН Республики Казахстан. Серия биологическая и медицинская. – 2001. – № 1,2. – С. 7-14.

Білінська О.В. Підвищення ефективності експериментального андрогенезу *in vitro* у ячменю шляхом оптимізації попередньої обробки колосся в умовах низької позитивної температури // Фактори експериментальної еволюції організмів. Т. 3. – К.: Логос, 2006. – С. 437-441.

Білінська О.В. Прояв генотипних особливостей експериментального андрогенезу *in vitro* у ячменю в залежності від елементів технології гаплоїдної індукції і умов вирощування донорних рослин // IV міжун. научн. конф. «Факторы экспериментальной эволюции организмов»: Материалы. – Алушта, 2008. В печати.

Білінська О.В., Манзюк В.Т., Козаченко М.Р., Васько Н.І. Біотехнологія одержання гаплоїдів ячменю і її використання для прискорення селекційного процесу // Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології: Збірник наукових праць. Т. 2. – К.: Логос, 2007. – С. 448-452.

Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. – М.: Наука, 1964. – 272 с.

Бутенко Р.Г. Тотипотентность растительной клетки // Культура изолированных органов, тканей и клеток растений. – М.: Наука, 1970. – С. 43-46.

Бутенко Р.Г. Дифференциация и морфогенез в культуре тканей, клеток и протопластов // Биология развития растений. – М.: Наука, 1975а. – С. 48-65.

Бутенко Р.Г. Экспериментальный морфогенез и дифференциация в культуре клеток растений // XXXV Тимирязевские чтения. – М.: Наука. 1975б. – 51 с.

Бутенко Р.Г. Клеточные технологии в сельскохозяйственной науке и практике // Основы сельскохозяйственной биотехнологии. – М.: Агропромиздат, 1990а. – С. 154-235.

Бутенко Р.Г. Состояние и перспективы изучения морфогенеза растений // Всесоюзное общество физиологов растений. Вып. 8. – М.: ИФР АН СССР, 1990б. – С. 5-8.

Бутенко Р.Г. Клеточные и молекулярные аспекты морфогенеза растений *in vitro* // I Чайлахяновские чтения. – Пушкино: Пушкинский НЦ, 1994. – С. 7-26.

Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. – М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. – 160 с.

Васильева В.Е., Батыгина Т.Б. Автономность зародыша // Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепции. Т. 2. Семя / Ред. Т.Б.Батыгина. – СПб.: Мир и семья, 1997а. – С. 579-588.

Викторов И.В. Стволовые клетки мозга млекопитающих: биология стволовых клеток *in vitro* и *in vivo* // Известия РАН. Серия биол. – 2001. – № 6. – С. 646-655.

Галиева Э.Р. Феномен альбинизма в культуре изолированных пыльников пшеницы: влияние низких положительных температур: Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. – Уфа, 2001в. – 24 с.

Галиева Э.Р., Круглова Н.Н. Альбинизм андроклинных регенерантов пшеницы // Международная научная конференция «Современные проблемы генетики»: Тезисы докладов – Минск, 2005. – С. 130.

Галиева Э.Р., Круглова Н.Н., Абрамов С.Н. Влияние низких положительных температур на индукцию эмбриоидогенеза и формирование регенерантов в культуре *in vitro* пыльников пшеницы // Физиология и биохимия культ. раст. – 2005. – Т. 37. – № 2. – С. 132-138.

Галиева Э.Р., Шакирова Ф.М., Круглова Н.Н. Феномен андроклинии и альбинизм у злаков // Успехи соврем. биол. – 2002. – Т. 122. – № 4. – С. 342-352.

Гапоненко А.К., Мунтян М.А., Маликова Н.И., Созинов А.А. Регенерация растений пшеницы *Triticum aestivum* L. *in vitro* // Цитология и генетика. – 1985. – Т.19. – № 5. – С. 335-342.

Гапоненко А.К., Петрова Т.Ф., Исаков А.Р. и др. Цитогенетика культивируемых *in vitro* соматических клеток и растений-регенерантов злаков. Сообщение I. *Hordeum vulgare* L. // Генетика. – 1987. – Т. 23. – № 1. – С. 2036.

Горбунова В.Ю. Андрогенез *in vitro* у яровой мягкой пшеницы: Автореф. дисс. ... д-ра биол. наук. – СПб., 2000. – 48 с.

Горбунова В.Ю. Генетические предпосылки спорофитного пути развития микроспор злаков в условиях *in vitro*. – Уфа: УНЦ РАН, 1993.–104с.

Горбунова В.Ю., Круглова Н.Н. Методические аспекты культивирования изолированных пыльников пшеницы. – Уфа: БНЦ УрО АН СССР, 1988. – 20 с.

Горбунова В.Ю., Круглова Н.Н. Индукция андрогенеза *in vitro* у яровой мягкой пшеницы. Оптимальная фаза микроспорогенеза // Известия РАН. Серия биол. – 1997. – № 6. – С. 668-676.

Горбунова В.Ю., Круглова Н.Н., Абрамов С.Н. Индукция андрогенеза *in vitro* у яровой мягкой пшеницы. Баланс эндогенных и экзогенных фитогормонов // Известия РАН. Серия биол. – 2001. – № 1. – С. 31-36.

Горпенченко Т.Ю. Влияние гена *rolC* агробактерий на процессы органогенеза и соматического эмбриогенеза в клеточной культуре *Panax ginseng* С.А. Меу.: Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. – Владивосток: Биолого-почвенный ин-т ДВО РАН, 2006. – 20 с.

Дунаева С.Е., Лукьянова М.В., Ковалева О.Н., Козырева О.Г. Способность незрелых зародышей к образованию растений-регенерантов в культуре *in vitro* у ранне- и позднеспелых сортов ячменя. I. Регенерация растений в первичном каллусе, полученном от незрелых зародышей // Физиология растений. – 2000. – Т. 47. – № 1. – С. 53-57.

Дьячук Т.И., Дьячук П.А. Культура пыльников злаков: современное состояние, проблемы, перспективы // С.-х. биология. – 1989. – № 5. – С. 3-10.

Ежова Т.А. *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. как модельный объект для изучения генетического контроля морфогенеза // Генетика. – 1999. – Т. 35. – № 11. – С. 1522-1537.

Зайнутдинова Э.М., Круглова Н.Н., Шаяхметов И.Ф. Роль АБК в соматическом эмбриогенезе растений в культуре *in vitro* // Физиология и биохимия культ. раст. – 2005. – Т. 37. – № 3. – С. 208-219.

Зибарова И.В., Рыбалка А.И., Игнатова С.А. Анализ выхода регенерантов при культивировании пыльников интрогрессивных форм пшеницы // Цитология и генетика – 1998. – Т. 32. – № 6. – С. 73-77.

Иванов В.Б. Проблема ствольных клеток у растений // Онтогенез. – 2003. – Т.34 – № 4. – С. 253-261.

Игнатова С.А. Биотехнологические основы получения гаплоидов, отдаленных гибридов и соматических регенерантов зерновых и бобовых культур в различных системах *in vitro*: Автореф. дисс. ... д-ра биол. наук. – Одесса: Южный биотехнологический центр в растениеводстве УААН, 2004. – 48 с.

Камелина О.П. Тапетум // Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепции. Т. 1: Генеративные органы цветка / Ред. Т.Б.Батыгина. – СПб.: Мир и семья, 1994. – С. 46-47.

Катасонова А.А., Шаяхметов И.Ф., Круглова Н.Н. Этапы биотехнологии получения растений-регенерантов яровой мягкой пшеницы путём эмбриоидогенеза в каллусной культуре *in vitro* // Известия Челябинского НЦ УрО РАН. – 2006. – Вып. 2(32). – С. 78-82.

Кордюм Е.Л. Эволюционная цитозембриология покрытосеменных растений. – Киев: Наукова думка, 1978. – 220 с.

Корочкин Л.И. Введение в генетику развития. – М.: Наука, 1999. – 253 с.

Корочкин Л.И. Биология индивидуального развития (генетический аспект). – М.: Изд-во МГУ, 2002. – 264 с.

Корочкин Л.И. Стволовые клетки как генетическая проблема // Вестник ВОГиС. – 2004. – Т. 8. - № 2. – С. 73-80.

Круглова Н.Н. Периодизация развития пыльника злаков как методологический аспект изучения андрогенеза *in vitro* // Известия РАН. Серия биол. – 1999. – № 3. – С. 275-281.

Круглова Н.Н. Морфогенез в культуре пыльников пшеницы: эмбриологический подход. – Уфа: Гилем. – 2001. – 203 с.

Круглова Н.Н. Микроспора злаков как модельная система для изучения путей морфогенеза: Автореф. дисс. ... д-ра биол. наук. – СПб., 2002. – 48 с.

Круглова Н.Н. К оценке качества пыльцевых зерен // Всерос. научн. конф. «Ботанические исследования в Поволжье и на Урале»: Материалы. – Саратов: СарГУ, 2006а. – С. 360-361.

Круглова Н.Н. К репродуктивной биологии злаков: качество пыльцевых зерен // IX Всерос. популяционный семинар «Особь и популяция: стратегия жизни»: Материалы. – Уфа, 2006б. – С. 135-139.

Круглова Н.Н. Биотехнология получения *in vitro* регенерантов пшеницы на основе комплексных цитофизиологических исследований // Материалы VI съезда Общества физиологов растений. – Сыктывкар, 2007. – С. 180-182.

Круглова Н.Н. К оценке качества пыльцевых зерен в природных условиях и в культуре *in vitro* // Научн. конф. по репродукт. биол. раст., посвящ. памяти Р.Е.Левиной: Материалы. – Ульяновск, 2008. – С. 18-20.

Круглова Н.Н., Батыгина Т.Б. Стресс как фактор индукции андроклинии у злаков. Компетентный объект стрессового воздействия // Успехи соврем. биол. – 2001. – Т. 121. – № 1. – С. 67-78.

Круглова Н.Н., Батыгина Т.Б. Методические рекомендации по использованию морфогенетического потенциала пыльника в

биотехнологических исследованиях яровой мягкой пшеницы. – Уфа: ИБ УНЦ РАН, 2002. – 39 с.

Круглова Н.Н., Батыгина Т.Б., Сельдиминова О.А. Морфогенетический потенциал спорогенных клеток пыльника злаков // Успехи соврем. биол. – 2000. – Т. 120. – Вып. 5. – С. 490-500.

Круглова Н.Н., Горбунова В.Ю. Стресс как фактор индукции андроклинии у злаков. Стресс-реакция *in situ* компетентных спорогенных клеток пыльника // Успехи соврем. биол. – 2001. – Т. 121. – № 4. – С. 378-387.

Круглова Н.Н., Горбунова В.Ю., Куксо П.А. Морфогенез в культуре изолированных пыльников: роль фитогормонов // Успехи соврем. биол. – 1999. – Т. 119. – Вып. 6. – С. 567-577.

Круглова Н.Н., Куксо П.А. Инициальная клетка андроклинии // Физиология и биохимия культ. раст. – 2006а. – Т. 38. - № 4. – С. 279-291.

Круглова Н.Н., Куксо П.А. Стрессовая индукция андроклинии // Успехи соврем. биол. – 2006б. – Т. 126. - № 3. – С. 275-285.

Круглова Н.Н., Сельдиминова О.А., Зайцев Д.Ю., Катасонова А.А. Биотехнологическая оценка экспланта для получения растений-регенерантов яровой мягкой пшеницы в культуре *in vitro* в целях адаптивной селекции в условиях Южного Урала // Известия Челябинского НЦ УрО РАН. – 2006. – Вып. 2 (32). – С. 94-98.

Круглова Н.Н., Сельдиминова О.А., Катасонова А.А., Зайцев Д.Ю., Круглова А.Е. Биотехнология получения растений яровой мягкой пшеницы в условиях *in vitro* и *ex vitro* на основе феномена андроклинной гаплоидии // VIII Съезд Украинского общества генетиков и селекционеров: Материалы. – Алушта, 2007. – С. 517-520.

Кунах В.А. Изменчивость растительного генома в процессе дифференцировки и каллусообразования // Физиология растений. – 1999. – Т. 46. – № 6. – С. 919-929.

Куперман Ф.М. Морфофизиология растений. – М.: Изд-во Московск. ун-та, 1977. – 256 с.

Куперман Ф.М., Дворянкин Ф.А., Ростовцева З.П., Ржанова Е.И. Этапы формирования органов плодоношения злаков. – М.: Изд-во Московск. ун-та, 1955. – 319 с.

Лобанова Е.И., Шестопад О.Л., Игнатова С.А. Абсцизовая кислота как экзогенный фактор повышения регенерационного потенциала в культуре пыльников мягкой пшеницы // Вестник Харьковского национального аграрного ун-та. – 2007. – Вып. 1 (10). – С. 102-110.

Лукьянюк С.Ф., Игнатова С.А. Методы культуры тканей и органов в селекции растений. Методические рекомендации. Одесса: ВСГИ. – 1980. – С. 1-21.

Лутова Л.А. Генетика развития цветка // Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепции. Т. 3: Системы репродукции / Ред. Т.Б.Батыгина. – СПб.: Мир и семья, 2000. – С. 355-369.

Лутова Л.А. Биотехнология высших растений. – СПб.: Изд-во Санкт-Петербургского ун-та, 2003. – 227 с.

Максимов И.В., Сурина О.Б., Сахабутдинова А.Р., Трошина Н.Б., Шакирова Ф.М. Изменение уровня фитогормонов в каллусах пшеницы под влиянием салициловой кислоты и инфицирования возбудителем твердой головни *Tilletia caries* (DC.) Tul. // Физиология растений. – 2004а. – Т. 51. – № 2. – С. 256-261.

Максимов И.В., Черепанова Е.А., Сурина О.Б., Сахабутдинова А.Р. Влияние салициловой кислоты на активность пероксидазы в совместных культурах каллусов пшеницы с возбудителем твердой головни *Tilletia caries* // Физиология растений. – 2004б. – Т. 51. – № 2. – С. 534-540.

Манзюк В.Т., Белинская Е.В. Эффективность индукции гаплоидов ярового ячменя в зависимости от способа гаплопродукции и генотипа исходных диплоидов // Цитология и генетика. – 2000. – Т. 34. – № 2. – С. 63-68.

Махновская М.Д., Сечняк А.Л., Игнатова С.А. и др. Разработка условий получения регенерантов из незрелых зародышей пшенично-ржаных

гибридов // Физиология и биохимия культ. раст. – 1994. – Т. 26. – № 6. – С. 584-587.

Мачс Э.М., Гриф В.Г. Структура клеточного цикла и ритм деления клеток в меристемах растений // Цитология. – 1996. – Т. 38. – № 8. – С. 842-853.

Молканова О.И., Ковалева И.С., Коновалова Л.Н., Слюсаренко А.Г. Индукция гаплоидных растений в культуре *in vitro* пыльников межвидовых гибридов пшеницы // Бюлл. Гл. ботан. сада АН СССР. – 1990. – № 156. – С. 73-78.

Морозова Н.М. Экспрессия генов в эмбриогенезе // Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепции. Т. 2: Семя / Ред. Т.Б.Батыгина. – СПб.: Мир и семья, 1997. – С. 605-616.

Орлов П.А., Ленивко С.М., Хотылёва Л.В. Наследование параметров пыльцевого эмбриогенеза у дигаплоидных линий яровой мягкой пшеницы // Доклады НАН Беларуси. – 2001. – Т. 45. – № 6. – С. 79-82.

От микроспоры к сорту / Батыгина Т.Б., Круглова Н.Н., Горбунова В.Ю., Егорова О.В., Титова Г.Е., Сельдимирова О.А. – М.: Наука, 2008. В печати.

Поддубная-Арнольди В.А. Цитоэмбриология покрытосеменных растений. Основы и перспективы. – М.: Наука, 1976. – 508 с.

Рахимбаев И.Р., Тивари Ш., Бишимбаева Н.К. и др. Биотехнология зерновых культур. – Алма-Ата: Гылым, 1992. – 240 с.

Резникова С.А. Цитология и физиология развивающегося пыльника. – М.: Наука, 1984. – 270 с.

Румянцева Н.И., Акулов А.Н., Мухитов А.Р. Экстраклеточные полимеры в каллусных культурах *Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn. с разной морфогенной активностью: количественная и качественная динамика в ходе культурального цикла // Прикладная биохимия и микробиология. – 2004. – Т. 40, № 5. – С. 571–578.

Сатарова Т.Н. Прямая регенерация растений в культуре пыльников кукурузы // Физиология и биохимия культ. раст. – 2002. – Т. 34. – № 2. – С. 152-177.

Световой микроскоп как инструмент в биотехнологии растений / Круглова Н.Н., Сельдимирова О.А., Катасонова А.А., Зайцев Д.Ю., Круглова А.Е. – Уфа: Гилем, 2008. В печати.

Сельдимирова О.А. Морфогенез эмбриоида *in vitro* и зародыша *in vivo* у пшеницы: Автореф. дисс канд. биол. наук. – Уфа, 2002. – 23 с.

Сельдимирова О.А. Сходство и различие андроклинного эмбриоида *in vitro* и зиготического зародыша *in vivo* пшеницы // II Съезд Общ-ва биотехн. России: Материалы. – М., 2004. – С. 79-80.

Сельдимирова О.А. Зависимость индукции путей морфогенеза в культуре *in vitro* пыльников пшеницы линии Фотос от баланса экзогенных и эндогенных фитогормонов // IX Междун. конф. молодых ботаников в Санкт-Петербурге: Материалы. – СПб., 2006. – С. 196.

Сельдимирова О.А., Абрамов С.Н., Круглова Н.Н. Развитие микроспориальных эмбриоидов в культуре *in vitro* пыльников пшеницы // Физиология и биохимия культ. раст. 2004. – Т. 36 (203). – № 4. – С. 320-326.

Сельдимирова О.А., Титова Г.Е. особенности развития микроспориальных эмбриоидов в культуре *in vitro* пыльников яровой мягкой пшеницы // II Междун. Школа «Эмбриология, генетика и биотехнология»: Материалы. – Уфа, 2007. – С. 105-106.

Сельдимирова О.А., Титова Г.Е., Батыгина Т.Б., Круглова Н.Н. Эмбриогенез *in vivo* и эмбриоидогенез из микроспор у пшеницы: сходство и различие // Вестник БГУ. – 2001. – № 2 (I). – С. 157-159.

Суханов В.М. Андроклиния и ее особенности у пшеницы: Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. – Саратов, 1983. – 24 с.

Суханов В.М., Папазян Н.Д. Условия получения каллуса и регенерантов в культуре незрелых зародышей пшеницы // Апомиксис и цитоэмбриология растений. – Саратов, 1983. – №.5. – С. 124-128.

Суханов В.М., Тырнов В.С. Получение гаплоидов *in vitro* из гаметических клеток // Гаплоидия и селекция. – М.: Наука, 1976. – С. 99-110.

Токин Б.П. Общая эмбриология. – М.: Высшая школа, 1987. – 480 с.

Трошина Н.Б., Максимов И.В., Яруллина Л.Г., Сурина О.Б., Черепанова Е.А. Индукторы устойчивости растений и активные формы кислорода. I. Влияние салициловой кислоты на генерацию перекиси водорода в клетках каллусов пшеницы при инфицировании возбудителем твердой головни // Цитология. – 2004а. – Т. 46. – № 11. – С. 1001-1005.

Трошина Н.Б., Максимов И.В., Яруллина Л.Г., Сурина О.Б., Черепанова Е.А. Индукторы устойчивости растений и активные формы кислорода. II. Влияние хитоолигосахаридов на продукцию перекиси водорода с участием оксалаксоксидазы в совместных культурах каллусов пшеницы и возбудителя твердой головни // Цитология. – 2004б. – Т. 46. – № 11. – С. 1006-1010.

Тураев А. Молекулярная генетика и биотехнология пыльцы покрытосемянных растений: Автореф. дисс. ... д-ра биол. наук. – Ташкент, 1998. – 42 с.

Тырнов В.С. Андрогенез *in vivo* у растений // Биология развития и управление наследственностью. – М.: Наука, 1986. – С. 138-164.

Тырнов В.С. Гаплоидия у растений: Научное и прикладное значение. – М.: Наука, 1998. – 53 с.

Тырнов В.С. Методы диагностики гаплоидов у покрытосемянных растений. – Саратов: Изд-во Саратовского ун-та, 2003. – 27 с.

Тырнов В.С. Гаплоидия у растений: терминология и классификация. – Саратов: Изд-во Саратов. ун-та, 2005. – 41 с.

Тырнов В.С., Хохлов С.С. Андрогенез у покрытосемянных растений // Генетика. – 1974. – Т. 10. – № 9. – С. 154-167.

Хохлов С.С. Общие вопросы гаплоидии // Гаплоидия и селекция. – М.: Наука. – 1976. – С. 5-14.

Челак В.Р. Система размножения пшеницы *Triticum L.* – Кишинев: Штиинца, 1991. – 320 с.

Чураев Р.Н. Контуры неканонической теории наследственности: от генов к эпигенам // Журнал общей биологии. – 2005. – Т. 66. – № 1. – С. 13-36.

Чураев Р.Н. Эпигенетика: генные и эпигенные сети в онто- и филогенезе // Генетика. – 2006. – Т. 67. – № 9. – С. 1276-1296.

Шаяхметов И.Ф. Соматический эмбриогенез и селекция злаковых культур. – Уфа: Изд-во Башкирск. ун-та, 1999. – 165 с.

Шаяхметов И.Ф. Культура клеток и тканей пшеницы *in vitro* и соматический эмбриогенез: Автореф. дисс. ... д-ра биол. наук. – СПб., 2001. – 45 с.

Шаяхметов И.Ф. Основы биотехнологии растений. – Уфа: РИЦ БашГУ, 2007. – 134 с.

Шаяхметов И.Ф., Ибрагимов Р.И. Биотехнология растений. Методические указания к большому практикуму. – Уфа: РИЦ БашГУ, 1997. – 34с.

Эльконин Л.А., Тырнов В.С. Гистологическое исследование каллусных культур *Sorghum caffrorum (Poaceae)* со стабильной регенерационной способностью // Ботан. журн. – 1990. – Т. 75. – № 1. – С. 44-48.

Эмбриологические основы андроклинии пшеницы: атлас / Круглова Н.Н., Батыгина Т.Б., Горбунова В.Ю., Титова Г.Е., Сельдимирова О.А. – М.: Наука, 2005. – 99 с.

Эпигенетика растений: Сборник научных трудов. – Новосибирск: Институт цитологии и генетики СО РАН, 2005. – 373 с.

Яруллина Л.Г., Трошина Н.Б., Юсупова З.Р., Сурина О.Б., Максимов И.В. Фитогормоны в защитном ответе каллусов пшеницы на инфицирование возбудителем твердой головни // Агрехимия. – 2008. – № 5. – С. 1-7.

Androgenesis and haploid plants (in memory of J.-P.Bourgin) / Eds Y. Chupeau, M.Caboche, Y.Henry. – Berlin; Heidelberg; New York: Springer-Verlag, 1998. – 297 p.

Anther and pollen. From biology to biotechnology / Eds C.Clement, E.Pacini, J.C.Aurdan. – Berlin; Heidelberg; New York: Springer-Verlag, 1999. – 318 p.

Bahieldin A., Dyer W.E., Qu R. Concentration effects of dicamba on shoot regeneration in wheat // *Plant Breeding*. – 2000. – V. 119. – P. 437-439.

Batygina T.B. A new approach to the system of reproduction in flowering plants // *Phytomorphology*. – 1989a. – V. 39. – № 4. – P. 311-325.

Batygina T.B. New concept of asexual reproduction in flowering plants // *Some aspects and actual orientation in plant embryology* / Eds J.Pare, M.Bugnicourt. – Amiens: Picardie Univ. press, 1989b. – P. 28-44.

Batygina T.B. Critical periods used to embryonal structures // *XVII Congr. on Sexual Plant Reproduction: Abstr.* – Lublin, 2002. – P. 33.

Batygina T.B., Vasilyeva V.E. Periodization of development of reproductive structures. Critical periods // *Acta Biol. Cracov. Ser. Bot.* – 2003. – V. 45. – № 1. – P. 27-36.

Bell P.R. The contribution of the ferns to an understanding of the life cycle of vascular plants // *The experimental biology of ferns* / Ed. A.F.Dyer. – London, New York, San Francisco: Academic Press, 1979. – P. 58-85.

Blaydes D.F. Interaction of kinetin and various inhibitors in the growth of soybean // *Physiol. Plant.* – 1966. – V. 19. – № 3. – P. 748-753.

Bohorova N.E., Luna B., Briton R.M., Huerta L.D., Hoistington D.A. Regeneration potential of tropical, and subtropical, midaltitude, and highland maize inbreds // *Maydica*. – 1995. – V. 40. – P. 275-281.

Bonet F.J., Azbaid L., Olmedilla A. Pollen embryogenesis: atavism or totipotency? // *Protoplasma*. – 1998. – V. 202. – P. 115-121.

Carvalho C.H.S., Bohorova N., Bordallo P.N., Abreu L.L., Valicente F.H., Bressan W., Paiva E. Type II callus production and plant regeneration in tropical maize genotypes // *Plant Cell Repts.* – 1997. – V. 17. – P. 73-76.

Chaudhary H.K., Dhaliwal I., Singh S., Sethi G.S. Genetics of androgenesis in winter and spring wheat genotypes. // *Euphytica.* – 2003. – V. 132. – № 3. – P. 311-319.

Chengalrayan K., Hazra S., Gallo-Meagher M. Histological analysis of somatic embryogenesis and organogenesis induced from mature zygotic embryo-derived leaflets of peanut (*Arachis hypogaea* L.) // *Plant Science.* – 2001. – V. 161. – P. 415-421.

Chuang Ch.-Ch., Ouyang T.-W. A set of potato media for wheat anther culture // *Sympos. on Plant Tissue Culture: Proceed.* – Peking: Sci. Press, 1978. – P. 51-56.

Dickinson H.G. The physiology and biochemistry of meiosis in the anther // *Intern. Rev. Cytol.* – 1987. – V. 107. – P. 79-109.

Dunwell J.M. Embryogenesis from pollen *in vitro* // *Biotechnology in plant science.* – New York: Acad. press, 1985. – P. 49-55.

Felfoldi K., Purnhauser L. Induction of regenerating callus cultures from immature embryos of 44 wheat and 3 *Triticale* cultivars // *Cereal Res. Comm.* – 1992. – V. 20. – P. 273-277.

Foisset M., Delourme R., Lucas M.O., Renard M. Segregation analysis of isozyme markers on isolated microspore-derived embryos in *Brassica napus* L. // *Plant Breed.* – 1993. – V. 110. – № 3. – P. 315-322.

Goldberg R.B., Beals Th.P., Sanders P.M. Anther development: basic principles and practical application // *Plant Cell.* – 1993. – V. 5. – № 10. – P. 1217-1229.

Guha S., Maheshwari S. *In vitro* production of embryos from anther of *Datura* // *Nature.* – 1964. – V. 204. – № 4957. – P. 497.

Guo Y.-D., Pulli S. An efficient androgenic embryogenesis and plant regeneration method through isolated microspore culture in timothy (*Phleum pratense* L.) // Plant Cell Repts. – 2000. – V. 19. – № 1. – P. 761-767.

Haberlandt G. Physiologische Pflanzenanatomie. – Leipzig: Engelmann, 1909. – 650 p.

Haploids in higher plants / III Intern. Conf. “Haploids in Higher Plants”: Abstr. – Vienna-Austria, 2006. – 65p.

Haploids of higher plants *in vitro* / Eds H.Hu, H.Yang. – New York; Heidelberg; Beijing: China Acad. Publ., Berlin; Heidelberg; New York; Tokyo: Springer-Verlag, 1986. – 205 p.

Hause B., Hause G., Pecham P., Lammeren van A.A.M. Cytoskeletal changes and induction of embryogenesis in microspore and pollen cultures of *Brassica napus* L. // Cell Biol. Intern. – 1993. – V. 17. – № 2. – P. 153-168.

Heberle-Bors E. Experimental control of pollen development // Androgenesis and haploid plants (in memory of J.-P.Bourgin) / Eds Y.Chupeau, M.Caboche, Y.Henry. – Berlin; Heidelberg; New York: Springer-Verlag, 1998. – P. 38-53.

Heslop-Harrison J. The forgotten generation: some thoughts on the genetics and physiology of angiosperm gametophytes // The plant genome. – Norwich: The John Innes Charity, 1980. – P. 1-14.

Hoekstra S., Bergen van S., Brouwershaven van I.R. Androgenesis in *Hordeum vulgare* L.: effects of mannitol, calcium and abscisic acid on anther pretreatment // Plant Science. – 1997. – V. 126. – № 1. – P. 211-218.

Huang B. Genetical manipulation of microspores and microspore-derived embryos // *In Vitro* Cell Develop. Biol. – 1992. – V. 28. – № 3. – P. 53-58.

Huang X.-Q., Wei Z.-M. High-frequency plant regeneration through callus initiation from mature embryos of maize (*Zea Mays* L.) // Plant Cell Repts. – 2004. – V. 22. – № 11. – P. 793-800.

Immonen S., Antilla H. Impact of microspore developmental stage on induction and plant regeneration in rye anther culture // *Plant Science*. – 1998. – V. 139. – № 1. – P. 213-222.

Immonen S., Robinson J. Stress treatments and ficoll for improving green plant regeneration in triticale anther culture // *Plant Science*. – 2000. – V. 150. – № 1. – P. 77-84.

Komma D.J., Endow Sh.A. Haploidy and androgenesis in *Drosophyla* // *Nat. Acad. Sci. USA: Proceed.* – 1995. – V. 92. – № 25. – P. 11884-11888.

Kruglova N.N., Batygina T.B. Biotechnology of obtaining in vitro of spring soft wheat hybrids with fixed heterosis effect // *Intern. Conf. on Science and Business “III Intern. Cooperation in Biotechnology: Expectations and Reality”*: *Proceed.* – Pushchino, 2006. – P. 155-157.

Kusha K.J., Song L.S.P., Park S.J., Reinbergs E. Fixation of heterosis: comparison of F₁ hybrids with their respective homozygous lines developed using doubled haploid procedures // *Cereal Res. Comm.*, 1977. – V. 5. – № 3. – P. 205-214.

Maksimov I.V., Troshina N.B., Surina O.B. Growth and development of bunt and smut agents on wheat calluses and availability that received co-culture as a suitable test-system for the search of plant resistance inducers // *Czech. J. Genet. Plant Breed. (Special issue)* – 2006. – V. 42. – P. 6-12.

McCabe P.F., Valentine T.A., Forsberg L.S., Pennel R.I. Soluble signals from cells identified at the cell wall establish a developmental pathway in carrot // *The Plant Cell*. – 1997. – V. 9. – P. 2225-2241.

Mordhorst A.P., Toonen M.A.J., de Vries S.C. Plant embryogenesis // *Crit. Rev. Plant Sci.* – 1997. – V. 16. – P. 535-576.

Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures // *Physiol. Plant.* – 1962. – V. 15. – № 3. – P. 473-497.

Oldach K.H., Morgenstern A., Rother S., Girgi M., O’Kennedy M., Lorz H. Efficient in vitro plant regeneration from immature zygotic embryos of

pearl millet [*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.] and *Sorghum bicolor* (L.) Moench // Plant Cell Repts. – 2001. – V. 20. – № 5. – P. 416-421.

Ozgen M., Taret M., Altinok S., Sancak C. Efficient callus induction and plant regeneration from mature embryo culture of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes // Plant Cell Repts. – 1998. – V. 18. – P. 331-335.

Pellegrineschi A., Brito R.M., McLean S., Hoisington D. Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and NaCl on the establishment of callus and plant regeneration in durum and bread wheat // Plant Cell, Tissue, Organ Cult. – 2004. – V. 77. – № 3. – P. 245-250.

Przetakiewicz A., Orczyk W., Nadolska-Orczyk A. The effect of auxin on plant regeneration of wheat, barley and triticale // Plant Cell, Tissue and Organ Cult. – 2003. – V. 73, № 3 – P. 245–256.

Quiroz-Figueroa F.R., Fuentes-Cerda C.F.J., Rojas-Herrera R., Loyola-Vargas V.M. Histological studies on the developmental stages and differentiation of two different somatic embryogenesis systems of *Coffea arabica* // Plant Cell Repts. – 2002. – V. 20. – P. 1141-1149.

Reynolds Th., Crawford R.L. Effects of light on the accumulation of abscisic acid and expression of an early cysteine-labeled methallothionein gene in microspores of *Triticum aestivum* during induced embryogenic development // Plant Cell Repts. – 1997. – V. 16. – № 1. – P. 458-463.

Sangwan R.S., Ducrocq C., Sangwan-Norreel B. *Agrobacterium*-mediated transformation of pollen embryos in *Datura innoxia* and *Nicotiana tabacum*: production of transgenic haploid and fertile homozygous dihaploid plants // Plant Science. – 1993. – V. 95. – № 2. – P. 99-115.

Seldimirova O.A., Zaitsev D.Yu., Kruglova N.N. Evaluation of the collection of spring soft wheat genotypes by the anther response to culture *in vitro* conditions // Современные проблемы генетики. – Минск, 2005. – С. 121-122.

Skoog F., Miller C.O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro* // Sympos. Soc. Exp. Biol.: Proceed. – 1957. – V. 11. – № 2. – P. 118.

Smykal P. Pollen embryogenesis – the stress mediated switch from gametophytic to sporophytic development. Current status and future prospects // *Biologia Plant.* – 2000. – V. 43 – № 4. – P. 481-489.

Sunderland N. The concept of morphogenetic competence with reference to anther and pollen culture // *Plant cell culture in crop improvement.* – New York, London: Plenum press, 1983. – P. 125-139.

Varshney A., Kant T., Sharma V.K., Rao A., Kothari S.L. High frequency plant regeneration from immature embryo cultures of *Triticum aestivum* and *T. durum* // *Cereal Res. Comm.* – 1996. – V. 24. – P. 409-416.

Vasil I.K., Hildebrandt A.C. Variations of morphogenetic behavior in plant tissue cultures. I. *Cichorium endivia* // *Amer. J. Bot.* – 1966. – V. 53. – № 9. – P. 869-874.

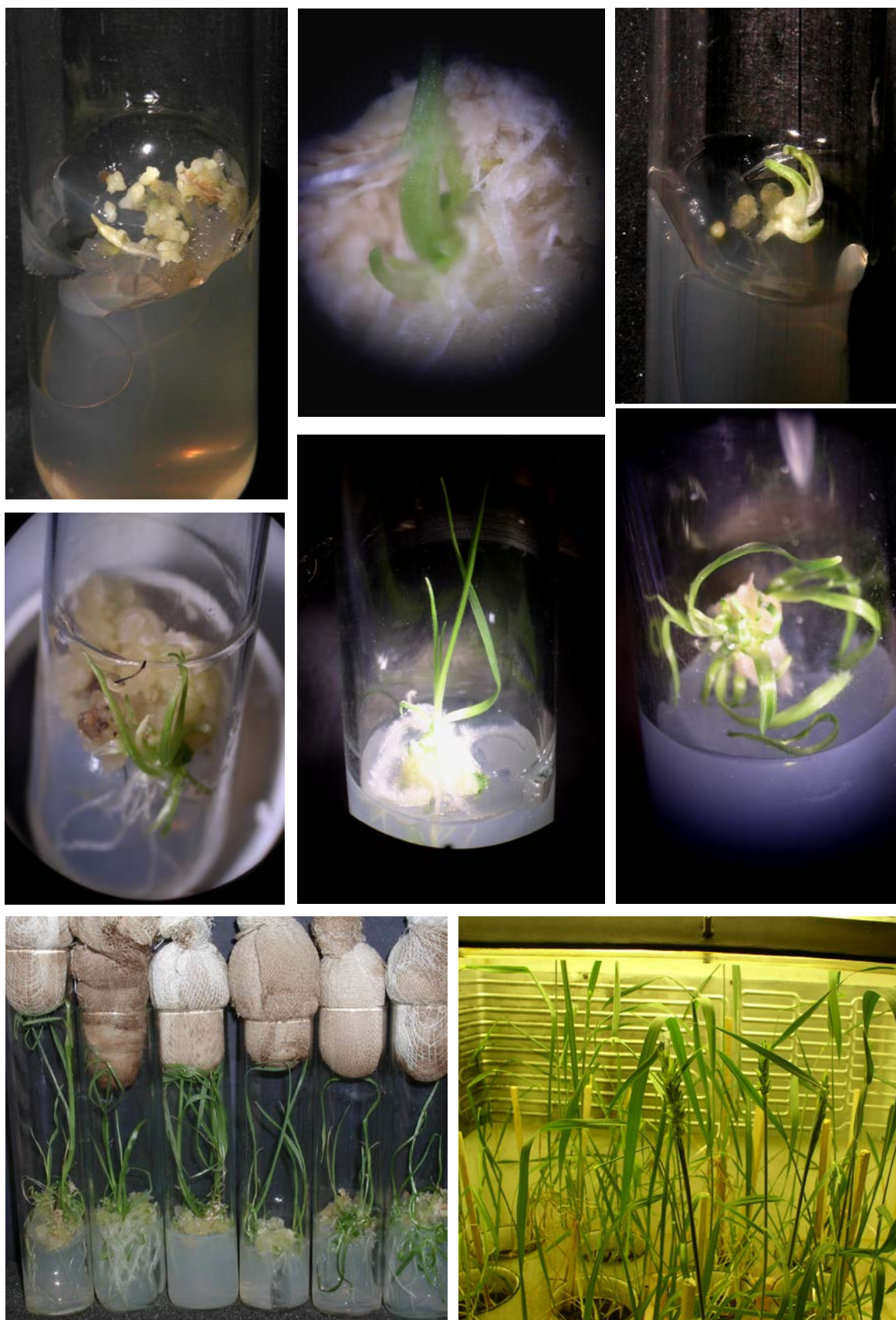
Vikrant , Rashid A. Comparative study of somatic embryogenesis from immature and mature embryos and organogenesis from leaf-base of Triticale // *Plant Cell Tissue and Organ culture.* – 2001. – V. 64. – P. 33-38.

Wang M., Bergen van S., Duijn van B. Insights into a key developmental switch and its importance for efficient plant breeding // *Plant Physiol.* – 2000. – V. 124. – № 2. – P. 523-530.

Zale J.M., Borchardt-Wier H., Kidwell K.K., Steber C.M. Callus induction and plant regeneration from mature embryos of a diverse set of wheat genotypes // *Plant Cell, Tissue, Organ Cult.* – 2004. – V. 76, № 3. – P. 277–281.



Этапы регенерации андроклиных растений яровой мягкой пшеницы в культуре *in vitro* и в условиях *ex vitro*



Этапы регенерации растений яровой мягкой пшеницы из соматических зародышей в культуре *in vitro* и в условиях *ex vitro*

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение.....	3
Глава 1. Цито-гистологические особенности андроклиной гаплоидии <i>in vitro</i> у пшеницы (Н.Н.Круглова, О.А.Сельдимирова).....	6
1.1. Отбор донорного растения.....	12
1.2. Холод как триггер спорофитной программы морфогенеза микроспоры <i>in vitro</i>	39
1.3. Цитологический мониторинг начальных этапов культивирования пыльников <i>in vitro</i>	41
1.4. Цито-гистологический анализ эмбриодогенеза как биотехнологически оптимального пути морфогенеза микроспоры по спорофитной программе <i>in vitro</i>	45
1.5. Регенерация андроклиных растений в условиях <i>in vitro</i> и <i>ex vitro</i>	49
Глава 2. Цито-гистологические особенности эмбриокультуры <i>in vitro</i> у пшеницы (Н.Н.Круглова, О.А.Сельдимирова, А.А.Катасонова, И.Ф.Шаяхметов).....	59
2.1. Отбор донорного растения.....	60
2.2. Отзывчивость на условия культуры <i>in vitro</i> разновозрастных зародышей.....	70
2.3. Цито-гистологический анализ путей морфогенеза в каллусной культуре <i>in vitro</i>	76
2.4. Регенерация растений, полученных в эмбриокультуре, в условиях <i>in vitro</i> и <i>ex vitro</i>	87
Заключение.....	99
Литература.....	104
Приложение. Этапы регенерации растений яровой мягкой пшеницы в культуре <i>in vitro</i> и в условиях <i>ex vitro</i>	123