

УДК 633.1
ББК 42.112
Э54

Ответственный редактор
доктор биологических наук *И.И. Шамров*

Рецензенты:
доктор биологических наук *Г.Р. Кудоярова*,
кандидат биологических наук *В.Е. Васильева*

Исследования поддержаны грантами РФФИ (99-04-48002, 99-04-48496, 00-15-97828, 01-04-06565, 02-04-48701, 02-04-49807, 02-04-06132, 03-04-06213, 05-04-97911), грантами ФЦП “Интеграция” (ЯО 128/1644, Ц0004), грантом программы “Ведущие научные школы России” (НШ-2148.2003.4).

Эмбриологические основы андроκληнии пшеницы : атлас / Н.Н. Круглова, Т.Б. Батыгина, В.Ю. Горбунова и др. ; [отв. ред. И.И. Шамров] ; Ин-т биологии УНЦ ; Ботан. ин-т им. В.Л. Комарова. – М. : Наука, 2005. – 99 с. – ISBN 5-02-033478-2.

Изложены теоретические основы культивирования генеративных структур цветковых растений: универсальность путей морфогенеза, концепция эмбриодогении, теория критических периодов, возможные источники гаплоидов, а также принципы разработанных авторами методических подходов их получения. Выявлена критическая стадия развития пыльника, оптимальная для переключения программы развития с гаметофитной на спорофитную и получения гаплоидных растений-регенерантов яровой мягкой пшеницы посредством различных путей морфогенеза (эмбриодогенез, гемморизогенез). Предложены методические рекомендации биотехнологических приемов их тиражирования.

Для научных работников, селекционеров, биотехнологов, преподавателей, аспирантов, бакалавров и магистров биологических и аграрных вузов.

ТП 2005-1-192

Embryological bases of wheat androcliny : Atlas / N.N. Kruglova, T.B. Batygina, V.Yu. Gorbunova, etc. ; [ed. by I.I. Shamrov]. – Moscow: Nauka, 2005. – 99 p. – ISBN 5-02-033478-2.

The theoretical bases on cultivating of flowering plants generative structures are stated in the atlas: the universality of morphogenesis pathways, the concept of embryoidogeny, the theory of the critical periods, possible source of haploids as well as the principles of methodological approaches to their obtaining elaborated by authors. The critical stage of anther development was revealed, optimal for switching the developmental program from gametophytic to sporophytic one, and the obtaining of haploid plant-regenerants of spring soft wheat by means of various morphogenesis pathways (embryoidogenesis, hemmorhizogenesis). Methodical recommendations on biotechnological techniques of their multiplication are offered.

The atlas intends for scientists, plant-breeders, biotechnologists and could be the manual for teachers, post-graduate students, bachelors, and masters of biological and agricultural higher school.

ISBN 5-02-033478-2

© Российская академия наук, 2005
© Круглова Н.Н., Батыгина Т.Б.,
Горбунова В.Ю., Сельдиминова О.А.,
Титова Г.Е., 2005
© Редакционно-издательское оформление.
Издательство “Наука”, 2005

ВВЕДЕНИЕ

Один из нетрадиционных путей получения и размножения новых форм и сортов растений – создание экспериментальных систем, обеспечивающих воспроизводимые результаты при строго определенных условиях. Перспективным направлением в этой области является разработка биотехнологических подходов культивирования *in vitro* как вегетативных, так и различных генеративных структур, таких как пыльник, завязь, семязачаток, зародыш, эндосперм и др.

Все исследования, проводимые с использованием генеративных структур в культуре *in vitro*, в частности пыльника, тесно связаны с решением проблем морфогенеза. Несмотря на то что вопросами получения гаплоидов-регенерантов из пыльника и его отдельных элементов занимаются в течение десятков лет, продолжает оставаться дискуссионным, какой из существующих терминов является более корректным: “андрогенез *in vitro*”, “андрогенный эмбриогенез”, “пыльцевой эмбриогенез” и др. В зоологии и ботанике под понятием “андрогенез” понимают мужской партеногенез, так же как под понятием “гиногенез” – женский партеногенез (см. [Поддубная-Арнольди, 1976; Батыгина и др., 1978]). В настоящей работе мы используем термин “андроклиния”¹ (см. [Хохлов, 1976]). Под этим термином понимается развитие спорофита из микроспоры и пыльцы в культуре изолированных пыльников. Суть этого феномена состоит в переключении программы развития морфогенетически компетентных гаплоидных клеток пыльника с обычного гаметофитного пути (образование пыльцевого зерна) на иной путь – спорофитный, т.е. образование гаплоидного регенеранта. При этом клетки в условиях культуры *in vitro* реализуют свой потенциал посредством различных путей морфогенеза [Батыгина и др., 1978; Batygina, 1989a].

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. Важно и то, что использование андроклинных регенерантов – единственный на сегодняшний день способ сохранить гетерозисный эффект исходной ценной гибридной линии. Все это имеет, безусловно, большое значение в селекционно-генетических исследованиях, в том числе яровой мягкой пшеницы – основного хлебного злака.

¹ С нашей точки зрения, термин требует обсуждения.

Для совершенствования биотехнологии получения гаплоидов необходимо привлечение эмбриологической информации. Действительно, эффективность технологии стабильного массового получения растений-регенерантов и возможность управления отдельными этапами их развития находятся в прямой зависимости от полноты знаний о морфогенетических процессах в пыльниках как в условиях *in vivo*, так и *in vitro*.

Пыльник является моделью для изучения важнейшей биологической проблемы морфогенеза – процесса становления формы различных органов и структур в онтогенезе, совершающегося на субмолекулярном, молекулярном, надмолекулярном, клеточном, тканевом и организменном уровнях. Как правило, исследования морфогенеза затруднены интегральным характером морфогенетических процессов, их зависимостью от различных внутренних и внешних факторов. Именно поэтому изучение изолированных пыльников в строго контролируемых условиях *in vitro* может способствовать выявлению фундаментальных закономерностей морфогенетических процессов и механизмов, лежащих в их основе, в частности детерминации путей морфогенеза. Более того, именно пыльник наиболее перспективен в качестве модели для изучения различных аспектов морфогенеза [Батыгина, 1983, 1994а; Batygina, 2002]. Во-первых, в морфогенезе пыльника находят отражение основные морфогенетические процессы, свойственные растению в целом, например чередование диплоидного и гаплоидного поколений в жизненном цикле. Во-вторых, пыльник – наиболее эмбриологически изученная из генеративных структур растений. В-третьих, с методической точки зрения, пыльник является относительно более простой (по сравнению с семязачатком и другими генеративными структурами) интегрированной системой, что в определенной мере облегчает задачу моделирования и управления отдельными этапами его развития. Исходя из этого, разработана стратегия исследования, позволяющая вскрыть критические периоды в развитии пыльника, выявить морфогенетические потенциалы его различных клеток, а также пути морфогенеза в культуре *in vitro*: эмбриоидогенез, гемморизогенез и гистогенез.

Для понимания природы андроклинии и ее использования в практических целях необходима разработка теоретических основ культивирования генеративных структур *in vitro*, и в первую очередь, изучение морфогенеза пыльника с позиции комплексного системного подхода. Данный подход включает детальный анализ всех этапов его формирования (с применением сравнительного цитоэмбриологического метода), выявление критических периодов развития, связанных с переключением программы с гаметофитного пути на спорофитный и образованием гаплоидных андроклинных растений-регенерантов пшеницы в условиях культуры *in vitro* [Батыгина, 1987, 1999; Batygina, 2002; Batygina, Vasilyeva, 2003]. Использование именно такого подхода позволяет не только разработать схему снятия гаметофитной детерминации в пыльнике пшеницы, но и выявить различные способы получения гаплоидов на ее основе и тем самым существенно повысить эффективность биотехнологических приемов получения массового количества андроклинных гаплоидов.

Представленные в атласе теоретические положения разработаны в отделе эмбриологии и репродуктивной биологии Ботанического института

им. В.Л. Комарова РАН (Санкт-Петербург). Оригинальные данные, полученные на основе этих теоретических разработок, получены в этом же отделе и лаборатории генетики и цитологии растений Института биологии Уфимского НЦ РАН (Уфа). При написании атласа были использованы монографии и обзоры ведущих специалистов в области эмбриологии и биотехнологии растений, в том числе: *Sunderland N. Pollen and anther culture* [1973]; *Plant tissue and cell culture* / Под ред. *H.E. Street* [1973, 1977]; *Батыгина Т.Б. Эмбриология пшеницы* [1974] и *Хлебное зерно* [1987]; *Raghavan V. Experimental emryogenesis in vascular plants* [1976] и *Molecular embryology of flowering plants* [1997]; *Experimental embryology of vascular plants* / Под ред. *B.M. Johri* [1982]; *Embryology of Angiosperms* / Под ред. *B.M. Johri* [1984]; *Haploids of higher plants in vitro* / Под ред. *H. Hu, H. Yang* [1986]; Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепции. Т. 1–3 / Под ред. *Т.Б. Батыгиной* [1994–2000] (в англ. переводе – *Embryology of flowering plants. Terminology and concepts* [2001–2005]); *Горбунова В.Ю. Генетические предпосылки спорофитного пути развития микроспор злаков в условиях in vitro* [1993]; *Current trends in the embryology of Angiosperms* / Под ред. *S.S. Bhojwani, W.Y. Soh* [2001]; *Батыгина Т.Б., Круглова Н.Н. Методические рекомендации по исследованию морфогенетического потенциала пыльника яровой мягкой пшеницы* [2001]; *Круглова Н.Н. Морфогенез в культуре пыльников пшеницы: эмбриологический подход* [2001]; *Батыгина Т.Б., Васильева В.Е. Размножение растений* [2002]; и др.

Работа поддержана грантами: РФФИ (99-04-48002, 99-04-48496, 00-15-97828, 01-04-06565, 02-04-48701, 02-04-49807, 02-04-06132, 03-04-06213, 05-04-97911), программы ФЦП “Интеграция” (ЯО 128/1644, Ц0004) и программы “Ведущие научные школы России” (НШ-2148.2003.4).

Авторы выражают сердечную благодарность коллегам, принявшим участие в обсуждении результатов исследования: **Г.Я. Жуковой** – за консультации по вопросам ультраструктурных исследований, **Л.А. Карцевой** – за обеспечение работ по сканирующей электронной микроскопии, **Я.В. Осадчому, Е.Е. Евдокимовой и Е.А. Брагиной** – за помощь на отдельных этапах подготовки рукописи (**Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН**); **В.И. Никонову (Башкирский НИИ СХ РАСХН)** – за помощь в проведении генетико-селекционных испытаний полученных дигаплоидных линий яровой мягкой пшеницы; **С.Н. Абрамову (Башкирский государственный педагогический университет)** и **Э.Р. Галиевой (Институт цитологии и генетики СО РАН)** – за содействие в исследованиях с использованием трансмиссионной электронной микроскопии. Авторы особенно признательны **И.И. Шамрову** – ответственному редактору и **Г.Р. Кудояровой и В.Е. Васильевой** – рецензентам издания.

PREFACE

The one of the non-traditional ways of obtaining and propagating of the new plant forms and breeds is making the experimental systems, providing the reproducible results under strictly defined conditions. The promising trend in this field is working-out the biotechnological approaches to cultivating *in vitro* the vegetative, as well as the various generative structures, such as the anther, ovary, ovule, embryo, endosperm etc.

All investigations, carried out using the generative structures, particularly anthers, in culture *in vitro* are closely dealing with solving the problem of morphogenesis. Despite the fact that the work on obtaining of haploids-regenerants from the anther and its separate elements continues during decades of years, the questions stay to be disputable, which term among existing ones is more correct: “androgenesis *in vitro*”, “androgenic embryogenesis”, “pollen embryogenesis” etc. In zoology and botany the concept “androgenesis” is treated as male parthenogenesis, as well as the concept “ginogenesis” is treated as female parthenogenesis [Poddubnaja-Arnoldi, 1976; Batygina et al., 1978]. In the present work we use term “androcliny” (Khohlov, 1976). This term is treated as the sporophyte developing from the microspore or pollen in culture of isolated anthers. The essence of this phenomenon is the switching of developmental program of the morphogenetically competent haploid anther cells from the usual gametophytic way (the pollen grain formation) to another, sporophytic way, i.e. formation the haploid regenerant. Herewith, the cells under condition of culture *in vitro* realize their potential by mean of different morphogenetic pathways [Batygina et al., 1978; Batygina, 1989a].

The haploids are the clones maintaining the genotype of original economically valuable donor plants. The main advantage of using them is the possibility to obtain quickly the homozygous lines, facilitating the certain phenotypes selection basing on the qualitative and quantitative signs. It is important also, that using of the androcliny regenerants today is the only method to maintain the effect of heterosis of the valuable original hybrid line. The all mentioned above doubtless has a big importance in breeding and genetical investigations, particularly those of spring soft wheat – the main grain cereal.

The involving of the embryological information is necessary to improve the biotechnological methods of haploids producing. Actually, the efficiency of the technology of stable extensive regenerant plants producing and the possibility to manage the separate stages of these plants development depend directly on the completeness of our knowledge about the morphogenetic processes in anthers under conditions *in vivo*, as well as *in vitro*.

The anther is the model for investigation of the very important biological problem of the morphogenesis – the process of establishing of the various organs and structures shape in the ontogenesis, occurring at submolecular, molecular, supermolecular, cellular, tissue and organismic level. As a rule, the morphogenesis investigations are difficult due to the integral nature of the morphogenetic processes and their dependence on the various internal and external factors. That's why the investigation of the isolated anthers under strictly controlled conditions *in vitro* could facilitate the revealing of the fundamental regularities of the morphogenetic processes and their basic mechanisms, particularly those of the morphogenetic pathways determination. Moreover, namely the anther is the most perspective as a model for investigation of the various aspects of morphogenesis [Batygina, 1983, 1994; Batygina, 2002]. First, the anther morphogenesis reflects the main morphogenetic processes, characteristic for whole plant, e.g. alternation of the diploid and haploid generations in life cycle. Secondly, among the plant generative structures the anther is the most thoroughly embryologically studied one. Thirdly, from the methodological point of view the anther is the relatively simple (as compared with the ovule and other generative structures) integrated system, and this fact facilitates up to certain extent the modeling and managing the separate stages of its development. Basing on all mentioned above the strategy of investigation was worked out, allowing to uncover the critical periods in anther development and to reveal the morphogenetic potencies of its various cells and also the morphogenesis pathways in culture *in vitro*: the embryoidogenesis, gemmorrhizogenesis and histogenesis.

To understand the nature of the androcliny and use it in the practical purpose the studying of the theoretical background of the generative structures cultivating *in vitro* is necessary, and first of all the studying of anther morphogenesis on the base of complex system approach. Such approach includes the detailed analysis of all stages of anther formation (using comparative cyto-embryological methods), the revealing of critical periods of development related with the triggering of program from gametophytic pathway to sporophytic one and with the formation of the haploid androclinic regenerant plants of the wheat upon the conditions of culture *in vitro* [Batygina, 1987, 1999, 2002; Batygina, Vasilyeva, 2003]. Using namely this approach allows not only to work out the scheme of removal the gametophytic determination in wheat anthers, but also to reveal various methods of haploids obtaining and thus to improve significantly the efficiency of the biotechnological techniques for obtaining large amounts of the androclinic haploids.

The theoretical principles presented in the atlas are worked out in the Department of Embryology and Reproductive Biology of the Komarov Botanical Institute RAS (Saint Petersburg). On the base of this theoretical work the original data obtained in the same department and also in the Laboratory of Genetics and Cytology of Plants of the Institute of Biology Ufa Scientific Center RAS (Ufa). During the working on Atlas the monographs and reviews of leading specialists in field of plant embryology and biotechnology were used, particularly: *Sunderland N.* Pollen and anther culture [1973]; *Plant tissue and cell culture* / Ed. *H.E. Street* [1973, 1977]; *Batygina T.B.* The embryology of wheat [1974] and *The grain of cereals* [1987]; *Raghavan V.* Experimental embryogenesis in vascular plants [1976] and *Molecular embryology of flowering plants* [1997]; *Experimental embryology of vascular plants* / Ed. *B.M. Johri* [1982]; *Embryology of Angiosperms* / Ed. *B.M. Johri* [1984]; *Haploids of higher plants in vitro* / Ed. *H. Hu, H. Yang* [1986]; *Embryology of flowering plants.*

Terminology and concepts. Vol. 1–3 / Ed. *T.B. Batygina* [1994–2000] (in English translation – Embryology of flowering plants. Terminology and concepts [2001–2005]); *Gorbunova V.Yu.* Genetical prerequisites of the sporophytic developmental pathway of cereals microspores under conditions *in vitro* [1993]; Current trends in the embryology of Angiosperms / Ed. *S.S. Bhojwani, W.Y. Soh* [2001]; *Batygina T.B., Kruglova N.N.* Methodical recommendations on investigation of morphogenetic potential of the anther of spring soft wheat [2001]; *Kruglova N.N.* Morphogenesis in wheat anthers culture: the embryological approach [2001]; *Batygina T.B., Vasilyeva V.E.* Plant propagation [2002]; etc.

The work supported by grants: RFBR (99-04-48002, 99-04-48496, 00-15-97828, 01-04-06565, 02-04-48701, 02-04-49807, 02-04-06132, 03-04-06213, 05-04-97911), programs of FCP “Integration” (ЯО 128/1644, Ц0004) and programs “Leading scientific schools of Russia” (HIII-2148.2003.4).

Authors express the sincere thanks to colleagues, participated in discussing the results of investigation: to **G.Ya. Zhukova** – for consultations about the ultrastructural investigations, **L.A. Kartseva** – for providing the work with scanning electron microscopy, **Ya.V. Osadtchiy, E.E. Evdokimova** and **E.A. Bragina** – for assistance at some stages of the manuscript preparation (**Komarov Botanical Institute RAS**); to **V.I. Nikonov (Bashkirian Institute of Agriculture RAAS)** for assistance in carrying out the genetical and breeding tests of obtained dihaplois lines of spring soft wheat; to **S.N. Abramov (Bashkirian State Pedagogical University)** and **E.R. Galieva (Institute of Cytology and Genetics SD RAS)** – for big assistance in work using transmission electron microscopy. Authors are especially thankful to **I.I. Shamrov** – the responsive editor and **G.R. Kudoyarova** and **V.E. Vasilyeva** – reviewers of the edition.

ГЛАВА 1

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ПЫЛЬНИКОВ

Получение гаплоидов в культуре *in vitro* из мужских и женских генеративных структур, в частности пыльника, имеет огромное значение для создания новых форм и сортов растений, в особенности хлебных злаков [Haploids in higher plants..., 1986; Батыгина, 1987; Атанасов, 1993; Рахимбаев и др., 1992; Palmer, Keller, 1997; Тырнов, 1998; Hu, Guo, 1999; Datta, 2001]. Однако выход гаплоидных регенерантов *in vitro* у многих видов цветковых растений крайне низок; при этом их значительная часть представлена альбиносамы. Хотя у некоторых злаков выход гаплоидов достаточно высок (например, у ячменя [Kozun, 2004]), для большинства видов их получение представляет весьма трудоемкий процесс, состоящий в инокуляции тысяч пыльников. Несмотря на большое количество гаплоидных клеток в пыльнике (от нескольких тысяч до миллионов в зависимости от вида и сорта), выход гаплоидов у злаков часто исчисляется долями процента или несколькими процентами. Совершенно очевидно, что **управление процессом индукции и нормального развития гаплоидов и, следовательно, эффективность биотехнологических приемов их тиражирования напрямую зависят от степени и глубины разработки теоретических основ их культивирования.**

Несмотря на определенные успехи, достигнутые в этой области за последние годы [Sunderland, 1980; Vasil, 1980; Maheshwari et al., 1982; Резникова, 1984; Ермаков, Матвеева, 1986; Батыгина, 1987; Шамров и др., 1988; Т. Дьячук, П. Дьячук, 1989; Горбунова, 1993; Сатарова, 1994, 2001; Palmer, Keller, 1997; Raghavan, 1997; Reynolds, 1997; Heberle-Bors, 1998; Goralski et al., 1999; Wang et al., 2000; Круглова, 2001; Huang, Wei, 2004; и др.], продолжает оставаться не совсем ясным, из каких гаплоидных клеток образуются регенеранты: имеющих нормальное строение или аномальных, определенный процент которых в силу полиморфизма всегда присутствует в пыльнике (в обоих случаях под действием различных факторов происходит смена программы развития с гаметофитной на спорофитную). При этом доказательств того, какие именно гаплоидные клетки (микроспора, вегетативная, генеративная, спермии) участвуют в образовании регенерантов, как правило, косвенные. Дискуссионными остаются вопросы о стадии развития пыльника, оптимальной для переключения программы развития гаплоидных кле-

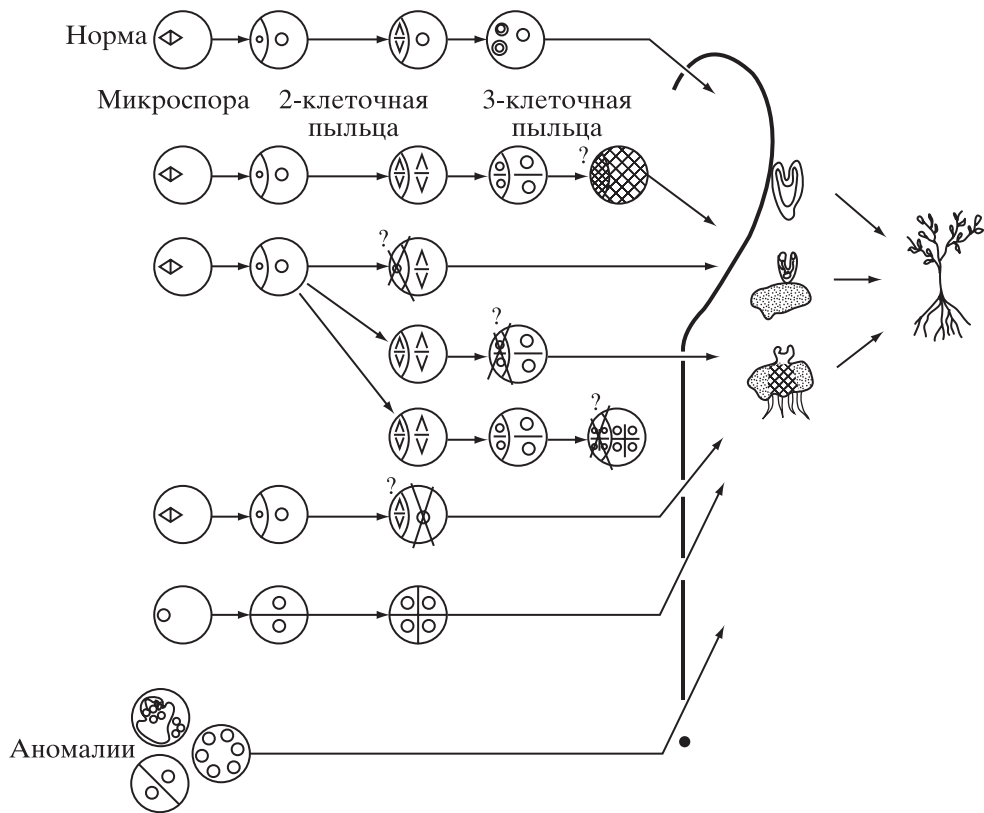


Рис. 1. Теоретически возможные способы и пути получения растений-регенерантов из тотипотентных гаплоидных клеток пыльника в культуре *in vitro* [Nitsch, 1969; Sunderland, Wicks, 1969, 1971; Bernard, 1971; Clapham, 1971; Iyer, Raina, 1972; Norrell, 1973; Picard, 1973; Rashid, Street, 1973, 1974; Vasil, Nitsh, 1975; Shevchenko, 1977; Narajanaswamy, George, 1982; Mitchell, Petolino, 1991; Сатарова, 1994; Palmer, Keller, 1997; Immonen, Antilla, 1998; Guo, Pulli, 2000; Testillano et al., 2000; и др.] (по [Батыгина, 1987] с изменениями)

ток на спорофитный путь морфогенеза *in vitro*, а также о роли различных факторов в этом процессе (рис. 1, 2). **Одной из ключевых задач является прогнозирование путей морфогенеза, по которым пойдет развитие гаплоидов, а также выхода гаплоидных растений-регенерантов на конечном этапе эксперимента.** Отсутствуют данные о путях морфогенеза, наиболее эффективных для получения гаплоидов, характере их зависимости от стадии развития пыльника (гаметофитная или спорофитная детерминация), а также причинах склонности различных видов к определенным путям морфогенеза (их таксоноспецифичность).

Существенным препятствием для решения этих проблем является недостаточная изученность закономерностей прохождения различных путей морфогенеза, особенно их ранних стадий (например, способы образования почки и эмбриоидов, или соматических зародышей). В подавляющем боль-

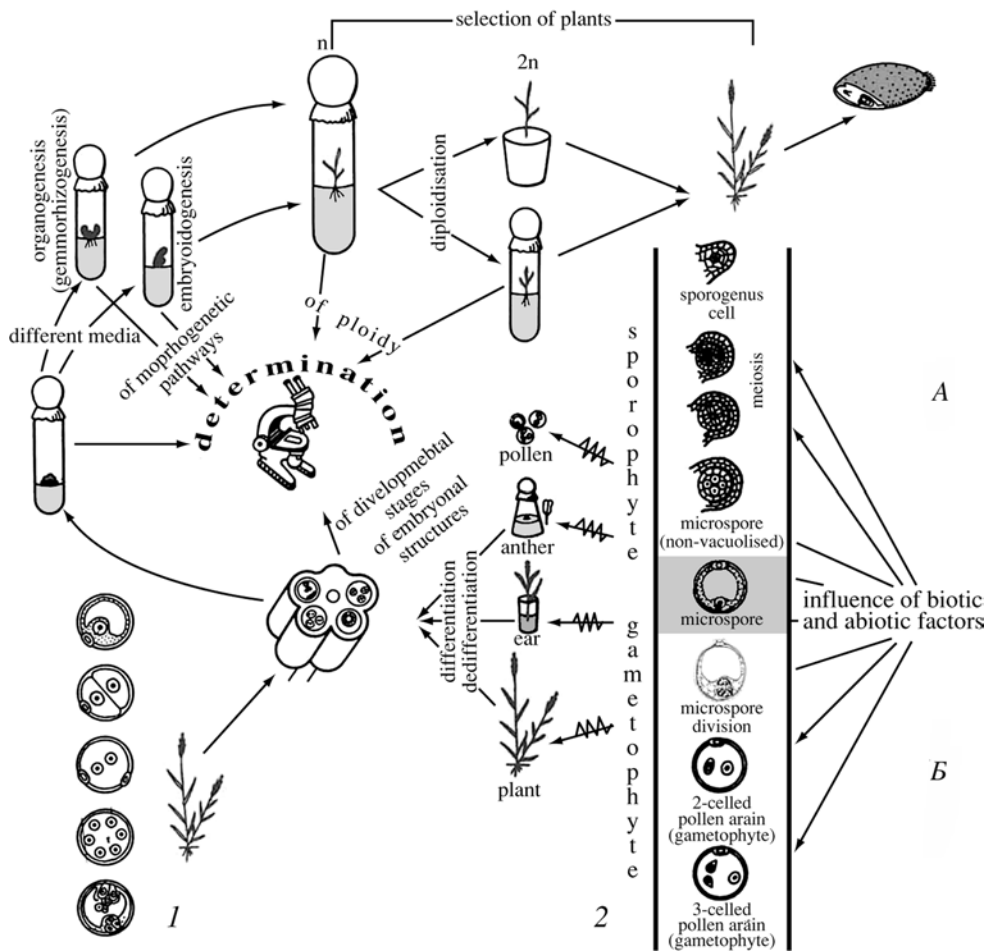


Рис. 2. Возможные способы получения гаплоидов

1 – из естественных аномалий (микроспор и пыльцевых зерен); 2А – из искусственно вызванных аномалий, 2Б – из нормальных микроспор, дву- и трехклеточных пыльцевых зерен путем снятия детерминации нормального развития (по [Батыгина, 1987] с изменениями)

шинстве случаев создание экспериментальных систем тиражирования ценных генотипов *in vitro* ведется без учета данных о генезисе генеративных структур, а также анализа морфогенетических и морфофизиологических корреляций, обуславливающих специфику их развития. Используя метод культуры клеток, тканей и органов, экспериментатор-селекционер не должен забывать, что работает не просто с клеткой, тканью или органом, а с элементами целого организма, т.е. системой, где все подчинено определенным законам развития.

Перечисленные выше вопросы свидетельствуют о том, насколько сложна проблема управления процессом получения гаплоидов, которая, являясь во многом морфофизиологической, должна решаться совместными усилиями эмбриологов и ученых других специальностей.

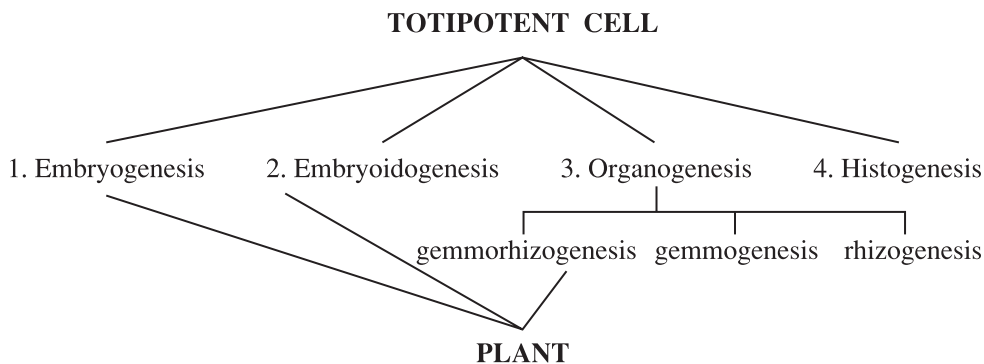


Рис. 3. Универсальность путей морфогенеза у цветковых растений в естественных условиях и в культуре *in vitro* (по [Батыгина, Бутенко, 1981; Batygina, 1984] с изменениями)

В лаборатории эмбриологии и репродуктивной биологии БИН РАН разработан системный комплексный подход к проблеме морфогенеза генеративных структур *in vivo* и *in vitro* [Batygina, 1987; Батыгина и др., 1978; Батыгина, 1983; Батыгина, Васильева, 1983; Batygina, Zakharova, 1997; Batygina, Vasilyeva, 2003]. В соответствии с этим подходом, заключающимся в изучении пыльника как сложной интегрированной системы предложена стратегия исследований по андроклинной гаплоидии: 1) изучение развития пыльника в естественных условиях, с учетом биологии развития всего растения и особенно антропоэкологии, а также у видов, контрастирующих по способу опыления (например, хазмогамия и клейстогамия); 2) сопоставление фактов, полученных при изучении развития пыльника в естественных условиях и культуре *in vitro*, в динамике с учетом кинетики физиолого-биохимических процессов; 3) моделирование условий для каждой стадии развития пыльника на базе данных, полученных в результате комплексных морфофизиологических и генетических исследований.

Использование разработанного подхода и стратегии исследования позволило сформулировать ряд теоретических положений, касающихся вопросов культивирования пыльников с целью получения гаплоидов [Батыгина, 1987]. Установлена относительная универсальность путей морфогенеза как в естественных условиях, так и в культуре *in vitro* (рис. 3). Независимо от типа культивируемой структуры (генеративной и вегетативной), способа ее репродукции (полового и агамного) и условий произрастания морфогенез может реализоваться четырьмя путями: эмбриогенез, эмбриоидогенез, органогенез (геммогенез, ризогенез, гемморизогенез) и гистогенез (включая каллусогенез), не считая аномалий морфогенеза. Репродукция растений в культуре *in vitro* может идти посредством трех путей – эмбрио-, эмбриоидо- и гемморизогенеза, которые также сопровождаются этапами гистогенеза и органогенеза и могут осуществляться разными способами. Реализация конкретного пути морфогенеза как в естественных условиях, так и в культуре *in vitro* детерминирована, т.е. в значительной степени определяется генетическими и физиологическими характеристиками

донорного растения, а также условиями выращивания, например соотношением цитокинин : ауксин.

В отличие от **эмбриогенеза**, т.е. процесса развития полового зародыша, **эмбриоидогенез** представляет собой процесс развития **эмбриоида** – зачатка индивидуума, образующегося асексуально в естественных условиях и в культуре *in vitro* (синонимы: соматический зародыш, зародышеподобная структура, адвентивный зародыш) [Батыгина, 1987, 1997б; Batygina, 1998]. Для эмбриоида характерно образование собственной новой оси (по отношению к материнскому организму), соединяющей полярно формирующиеся апексы побега и корня. Как правило, он не имеет общей васкулярной системы с материнским организмом (закрытый радикулярный полюс). Лишь у некоторых видов отмечена кратковременная связь с материнским организмом. Продолжительность контакта и стадия развития эмбриоида, на которой этот контакт осуществляется, различны. Генезис эмбриоида, как и его форма и размеры, таксоноспецифичны. **Таким образом, подобно половому зародышу, эмбриоид является биполярной структурой. Однако эмбриоид представляет собой элементарную структурную единицу не только семенного, но и вегетативного размножения.** Это отличает его от другой структурной единицы вегетативного размножения – почки, образующейся при **геммориогенезе**: почка – **монополярная структура**, имеющая открытую связь с материнским растением, формирование из которой нового индивидуума происходит лишь после нарушения этой связи и образования адвентивных корней.

Образование эмбриоидов, или эмбриоидогения, наблюдается у растений, относящихся к разным таксонам и произрастающих в разных экологических зонах. **Эмбриоидогения** (греч. *embryon* – зародыш, *oidos* – вид, *genus* – происхождение) – **тип гомофазной репродукции цветковых растений, категория вегетативного размножения в естественных условиях и в культуре *in vitro*.** Разработана концепция эмбриоидогении [Batygina, 1978, 1989a, b, 1999a; Батыгина, 1997б, 2000], основным тезисом которой является **универсальность морфогенеза половых зародышей и эмбриоидов. При выделении эмбриоидогении** в особый тип репродукции и размножения были использованы **два критерия: онтогенетический (гомофазная репродукция**, не сопровождающаяся мейозом и процессом слияния гамет, т.е. бесполой способ образования нового поколения, – **унипарентальное наследование**) и **морфологический** (образование новой полярной оси – “апекс побега – апекс корня” и соответственно **биполярная организация эмбриоида**). В этом состоит принципиальное отличие эмбриоидогении от **эмбриогении (гетерофазная репродукция)**, при которой образование новой особи происходит благодаря половому процессу, т.е. мейозу и слиянию гамет (**бипарентальное наследование**). В зависимости от происхождения и положения соматических зародышей на материнском растении можно выделить **две основные формы эмбриоидогении: репродуктивную**, или флоральную (образование эмбриоидов в цветке и семени), и **вегетативную** (образование эмбриоидов на вегетативных органах – листе, стебле, корне).

Сходство и различия в развитии полового, соматического зародышей и почки составляют одну из важнейших проблем морфогенеза. Дискуссионным остается вопрос, в какой степени морфогенез соматического зароды-

ша подчиняется законам развития полового зародыша – законам происхождения, чисел, положения и назначения и закону экономии, а также законам клеточного деления. Выявлен **полиморфизм полового и соматического зародышей**, а также **параллелизм в их развитии**, проявляющийся в основных закономерностях морфогенеза: полярности (формировании новой оси), симметрии (радиальной и билатеральной, или дорсовентральной), клеточной и гистогенной дифференциации, морфогенетических и морфофизиологических корреляциях, способности к пролиферации; высказано предположение о возможных эволюционных тенденциях перехода от почки к классическому половому зародышу (и/или обратно) через “переходные формы” [Батыгина, 1987; Batygina, 1990a, b, 1991a, b, 1999b, 2004; Батыгина, Захарова, 1997; Батыгина, Васильева, 2002].

Еще один путь морфогенеза – **гистогенез** – может реализовываться не только в процессе эмбрио-, эмбриоидо- и гемморизогенеза, но и посредством образования каллуса (**каллусогенеза**). **Каллус – гетерогенная структура (система), образующаяся в результате пролиферации клеток на поверхности отдельных структур растительного организма**. Как правило, он состоит из неоднородных клеток, **тотипотентность которых может быть различна, что и обуславливает их разные пути морфогенеза**. Морфогенетические потенции каллуса видоспецифичны и могут меняться в процессе генезиса, что в определенной степени зависит от различных факторов (температура, влажность, время культивирования и т.д.), а также характера связей между группами клеток в каллусе, что, в свою очередь, обусловлено их формой, размером (критической массой) и т.д.

Одной из основных проблем морфогенеза продолжает оставаться идентификация инициальных клеток соматических зародышей (рис. 4), так как в большинстве случаев эксплант по структуре гетерогенный. Эти инициальные клетки в условиях культуры *in vitro* целесообразнее всего сравнивать с инициальными клетками как полового зародыша, так и соматических зародышей в семени (кливажные, нуцеллярные, интегументальные) и на вегетативных органах (фолиарные, каулигенные, ризогенные) в естественных условиях [Батыгина, 1987; Batygina, 1990a, b, 1991a, b, 2004; Батыгина, Захарова, 1997]. Получение большого количества соматических зародышей и регенерантов у разных таксонов в культуре *in vitro* зависит от полноты наших знаний о генезисе инициальных клеток и их основных характеристиках (о периоде митотического цикла, строении оболочки, состоянии цитоплазмы, количестве и распределении органелл и т.д.). В связи с этим первоочередным представляется решение следующих вопросов: 1) какую клетку в зародышевом мешке можно рассматривать как аналог инициальной клетки соматического зародыша – яйцеклетку (гамету) или зиготу (спорофит); 2) в каком периоде митотического цикла находятся эти клетки, каков темп прохождения цикла (в частности, интерфазы).

В системе “яйцеклетка–зигота” имеет место чередование процессов: меристематизация, дифференциация, специализация, дедифференциация и снова меристематизация. Вероятно, яйцеклетку и зиготу можно сравнивать с инициальной соматического зародыша только на тех этапах ее развития, которые характеризуются тотипотентностью и способностью к пролиферации (см. рис. 4). Однако до сих пор достоверно не установлено, происхо-

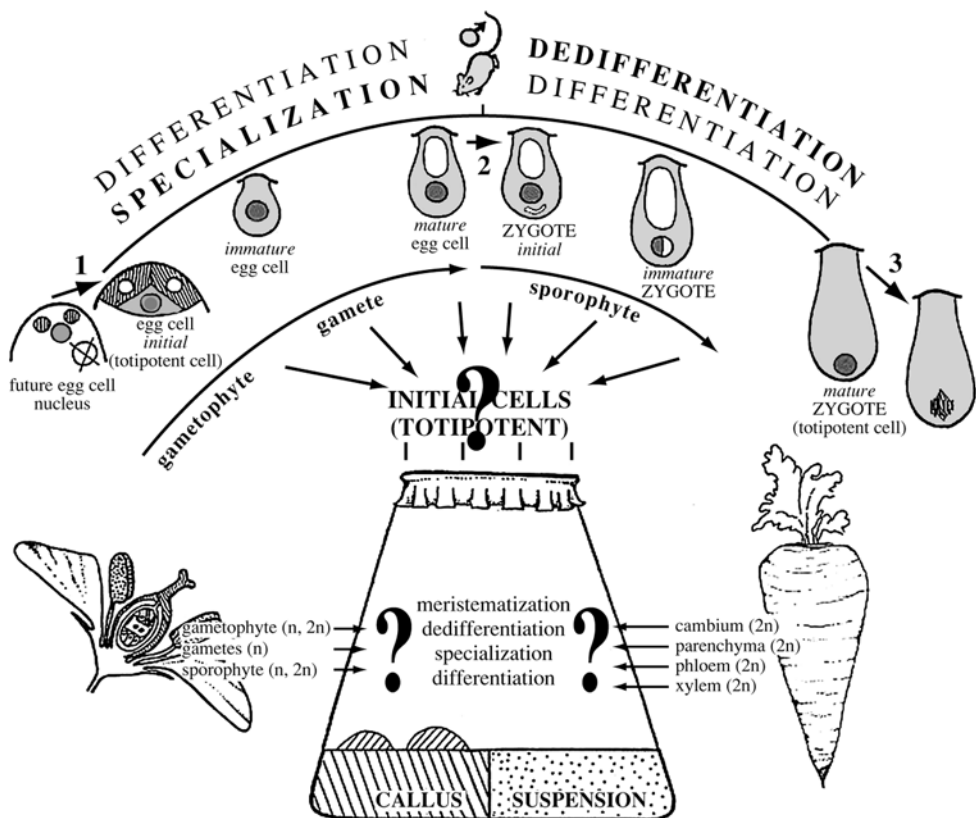


Рис. 4. Возможные пути образования инициальных клеток полового и соматических зародышей в естественных условиях и культуре *in vitro* (по [Батыгина, Захарова, 1997] с изменениями)

дят ли подобные процессы в клетках, дающих соматические зародыши. Можно полагать, что **имеется определенная универсальность строения всех инициальных клеток, образующихся в естественных условиях и в культуре *in vitro* и дающих новые организмы.**

В культуре ткани существуют две модельные системы, различающиеся по характеру взаимодействия клеток: калусная и суспензионная культуры. В обеих системах запуск процессов пролиферации, дифференциации и специализации инициальных клеток в значительной степени определяется критической массой клеток и структур.

Любые теоретические разработки невозможны без четкой дифференциации понятий и терминов, поскольку “это не просто игра словами, но совершенно необходимое условие, чтобы разобраться в природе вещей” [Pijl van der., 1969]. Поэтому для корректного подхода к решению проблемы получения гаплоидов следует также **уточнить ряд важных понятий**, таких как “микроспора” и “пыльцевое зерно”. **Микроспора** – клетка с гаплоидным набором хромосом, возникающим в результате мейоза. Стадия микроспоры длительна и продолжается до первого митоза. С началом деления микро-

спора переходит к стадии формирования пыльцевого зерна (“прорастание” микроспоры и образование мужского гаметофита). В норме пыльцевое зерно злаков проходит две стадии развития – двухклеточную и трехклеточную, а не “двуядерную” и “трехъядерную”, как часто пишут. Этот момент принципиально важен, поскольку при рассмотрении возможности получения гаплоидов из двухклеточного и зрелого трехклеточного пыльцевого зерна исследователь должен представлять, что имеет дело **не с одной клеткой, а со сложной системой клеток пыльцевого зерна.**

Следует также обратить внимание на то, что стадии развития пыльника, используемые для получения гаплоидов (см. рис. 1, 2), у различных цветковых видов специфичны. Причинами видоспецифичности являются **разный тип образования стенки пыльника** (различное число ее слоев, их происхождение и т.д.), а отсюда разное ее строение у разных видов на одной и той же стадии развития пыльцевого зерна; **разные типы формирования** (сукцессивный, симультанный) и **строения** (изобилатеральный, тетраэдрический) **тетрады микроспор** и т.д.

Существует генный контроль, обуславливающий видоспецифичность развития спорофита и гаметофита. В пользу этого говорят экспериментальные данные о спорофитной детерминации – способности микроспор в культуре *in vitro* к развитию по определенному пути морфогенеза.

Многочисленными исследованиями показана возможность изменения хода формирования растения путем различных воздействий, причем эффект воздействия зависит от стадии развития генеративных структур (подробнее см. [Батыгин и др., 1975; Батыгин, 1986; Батыгина, 1987]). Наиболее чувствительной у большинства видов оказалась стадия мейоза. Например, в пыльниках растений пшеницы, облученных рентгеном на этой стадии, наблюдалось резкое снижение процента нормальной пыльцы.

В связи с тем что возникновение гаплоидной фазы при чередовании поколений (спорофит–гаметофит–спорофит) в жизненном цикле растений также связано с процессом мейоза, его изучению уделяется особое внимание. Выделены ключевые этапы мейоза, в отношении которых установлен генный контроль; рассмотрены ранги мейотических генов; выявлен принцип иерархии действия генов в ходе мейоза [Голубовская, 1985, 1994, 1997]. Многие естественные аномалии развития пыльцевых зерен, согласно И.Н. Голубовской [1985], представляют собой фиксированные мейотические мутации (мей-мутации), проявляющиеся в эксперименте в виде фенкопий. Эти исследования делают возможными регуляцию характера митоза в микроспоре, приводящего к образованию мужского гаметофита (дву- или трехклеточного пыльцевого зерна), а также экспериментальное получение множества аномальных структур.

Ультраструктурные и биохимические данные свидетельствуют об исключительной интенсификации энергетических процессов в микроспороцитах перед мейозом, что, вероятно, необходимо для осуществления его двух быстро следующих друг за другом делений [Резникова, 1984]. В них происходят значительные изменения объема ядер, дифференциация пластид и митохондрий, восстановление популяции рибосом. В отличие от профазы митоза в профазе мейоза синтезируются РНК и белки, необходимые как для прохождения самого мейоза, так и для развития микроспор. Вероятно, биосинтез

белка в микроспорах на ранних стадиях развития обеспечивается главным образом рибосомами, образующимися в микроспороцитах в период поздней профазы первого деления мейоза. Все это обеспечивает нормальное постмейотическое формирование микроспор. Любые **нарушения морфофизиологических корреляций в развитии как стенки пыльника, так и самих микроспороцитов на этих этапах** могут привести к **аномальному развитию** микроспор или **прекращению развития**. Такой эффект наблюдается, в частности, при разных типах мужской стерильности (см. [Батыгина, 1974; Симоненко, 1994]). **Таким образом, мейоз, а возможно, и более ранние стадии развития пыльника являются критическими стадиями, воздействуя на которые каким-либо фактором, в том числе через состав среды, можно изменять детерминацию дальнейшего развития спорогенной ткани.**

Выявление критической стадии развития гаплоидной клетки пыльника, оптимальной для переключения морфогенеза с гаметофитной программы на альтернативную спорофитную программу *in vitro* – один из основных факторов, определяющих успех культивирования и получение андроклиных гаплоидных регенерантов. Согласно современным представлениям, развитие генеративных структур включает ряд критических периодов и стадий, характеризующихся тем, что в эти временные промежутки происходят ступенчатые процессы детерминации и переключения программ развития [Batygina, 2002; Batygina, Vasilyeva, 2003]. В развитии пыльника выделены три критических периода – премейотический, мейотический, постмейотический, каждый из которых включает определенные критические стадии (рис. 5). Изучение действия всего комплекса факторов на культивируемые пыльники во время различных критических стадий развития позволит выявить как морфогенетические потенции различных клеток пыльника, так и триггеры различных путей морфогенеза, по которым пойдет их развитие (эмбриоидогенез, органогенез, гистогенез – рис. 6).

Эмбриоидогенез, несомненно, является более эффективным и выгодным путем получения гаплоидов по сравнению с гемморизогенезом, поскольку не связан с прохождением сложного и многоступенчатого процесса образования генетически неоднородного каллуса и не требует трудоемкой процедуры многократных пересадок на среды разного состава. Однако не исключено, что для более эффективного получения регенерантов следует сочетать оба пути, т.е. сначала из микроспоры или клеток пыльцевого зерна получать каллус, а затем вызывать образование на нем массового количества первичных и вторичных эмбриоидов [Шамров и др., 1988; Кударов и др., 1988; Kударов et al., 1992; Shamrov et al., 1992].

Анализ оригинальных и литературных данных показывает, что для **получения гаплоидов в культуре пыльников *in vitro* можно использовать следующие возможные пути.**

I. Получение гаплоидов из естественных аномалий (см. рис. 2, 1). В пыльнике цветковых растений всегда присутствуют различные аномалии в развитии микроспороцитов, микроспор и пыльцевых зерен. Их характер, количество и время проявления генетически детерминированы и видоспецифичны. Аномалии могут проявляться в нарушении полярности микроспор и пыльцевого зерна, характера митоза (равный вместо неравного, или дифференцирующего), ориентации пыльцевого зерна по отношению к

Рис. 5. Развитие пыльника злаков

A – археспорий (archesporium); *C* – каллоза (callose); *EN* – эндотеций (endothecium); *EP* – эпидермис (epidermis); *GC* – генеративная клетка (generative cell); *ML* – средний слой (middle layer); *Ms* – микроспора (microspore); *O* – орбикула (orbicule); *PT* – парietальная ткань (parietal tissue); *SP* – спермий (sperm cell); *ST* – спорогенная ткань (sporogenous tissue); *TP* – тапетум (tapetum); *V* – вакуоль (vacuole); *VC* – вегетативная клетка (vegetative cell); *VN* – ядро вегетативной клетки (vegetative nucleus) (по [Batygina, Vasilyeva, 2003])

стенке гнезда пыльника, образовании многоядерных или многоклеточных структур разной ploидности, изменении сексуализации пыльцевого зерна (образования в нем зародышевого мешка – см. [Батыгина, 1994б]) и т.п.

Для злаков, например, характерно специфическое однослойное расположение микроспор и пыльцы в гнезде пыльника, ориентированных порами в сторону тапетума. На стадиях распада тетрад на отдельные микроспоры и дифференциации пыльцевого зерна наряду с нормальными отчетливо выявляются аномальные структуры, которые часто располагаются в центре пыльцевого гнезда и не имеют контакта со стенкой пыльника. Некоторые из них в условиях культуры *in vitro* начинают активизироваться с образованием гаплоидов.

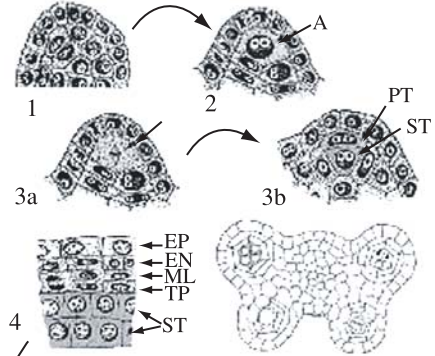
Так, рядом исследований [J. Nitsch, C. Nitsch, 1969; Maheshwari et al., 1982; Ouyang, 1986; Шамров и др., 1988] подтверждено, что определенный процент гаплоидов у отдельных видов цветковых растений связан именно с определенным процентом аномальной “пыльцы”, имеющейся в пыльнике. В частности, детально изучена зависимость образования гаплоидов у пшеницы от стадии развития инокулированных пыльников – начиная от премейотической до трехклеточного пыльцевого зерна. Показано, что в пыльниках, высаженных на стадии зрелой трехклеточной пыльцы (более 15000 шт.), гаплоиды развиваются только из аномальной пыльцы [Ouyang, 1986]. Таким образом, используя пыльники злаков на указанных стадиях развития (без дополнительного воздей-

CRITICAL PERIODS	
PREMEIOTIC	
MEIOTIC	
POSTMEIOTIC	THE ALTERNATION OF GENERATIONS

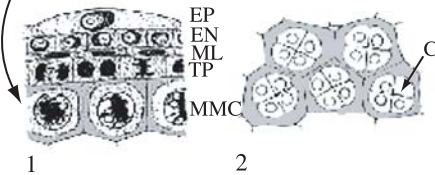
CRITICAL STAGES

SPOROPHYTE

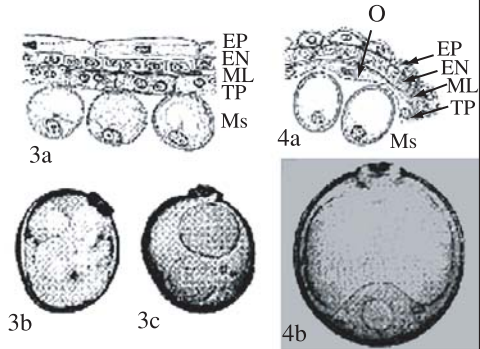
- ➔ Meristem primordium transition to archesporium (1, 2)
 - ➔ Archisporial cell and its division into parietal layer and sporogenous tissue (3)
 - ➔ Anther locule wall formation from the parietal layer derivatives (centripetal type of development) (4)
- Full-formed anther with sporogenous cells



- ➔ Microspore mother cell transition to reductive division (1)
- Isobilateral tetrads formation according to successive type; formation of specific callose ridges in microsporocytes and microspore tetrads during active functioning of all layers of anther locule wall (2, 3a)

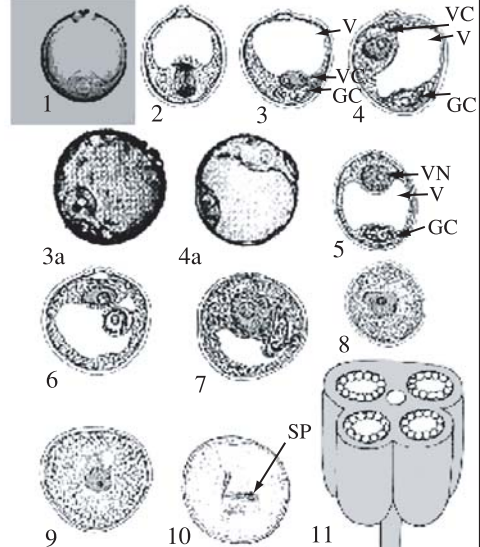


- ➔ Microspore development; establishment of species-specific one-layered orientation of microspores in the anther locule; (3, 4)
- establishment of microspore polarity and degeneration of some anther wall layers; (3abc, 4ab)
- sporopollenin wall and orbicules formation



GAMETOPHYTE

- ➔ Inequal division of highly vacuolated microspore leading to generative and vegetative cell formation (1-3)
 - ➔ Conjointed repeated displacement of generative cell and vegetative nucleus relative to the aperture in the pollen grain (3-8)
 - ➔ Gametogenesis – the formation of sperm cells of specific shape (9, 10)
- Mature anther before its dehescence (with exothecium, endothecium and tapetal membrane bearing orbicules preserved) (11)



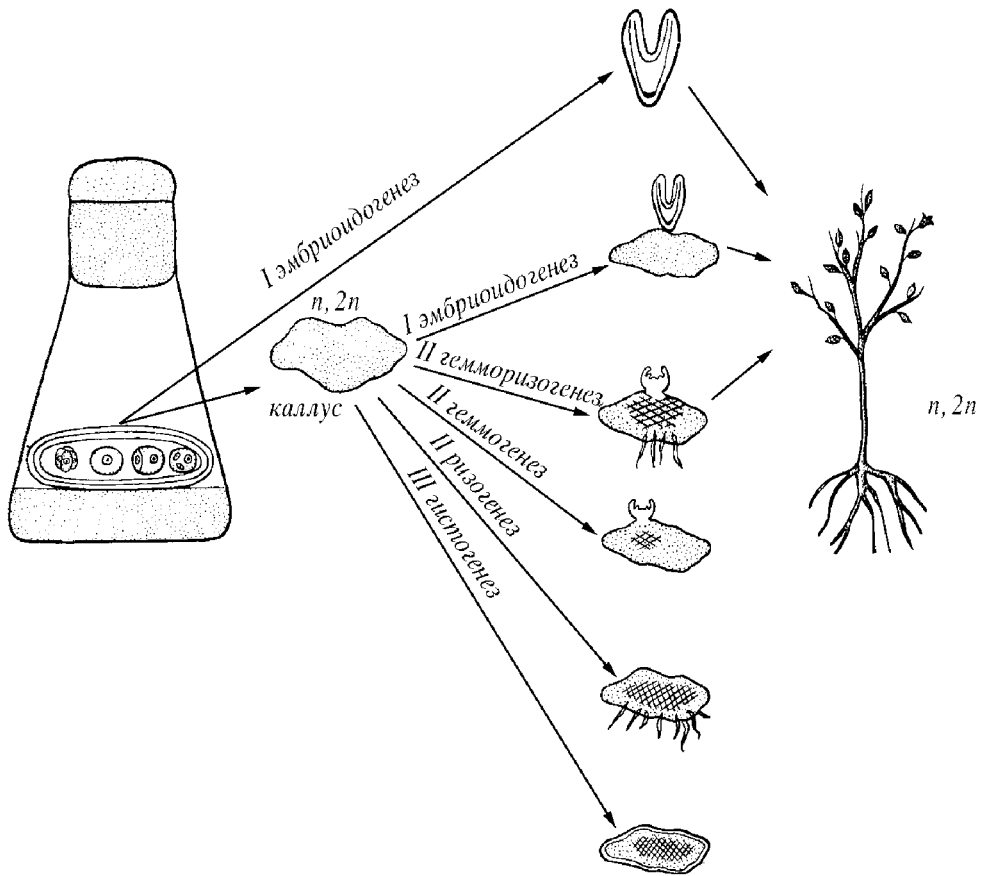


Рис. 6. Возможные пути морфогенеза в культуре *in vitro* пыльников цветковых растений (схема) (по [Batygina, 1984] с изменениями)

ствия, не считая посадку в культуру *in vitro*), экспериментатор получает гаплоидные растения, вероятнее всего, из аномальной пыльцы. Подтверждением этого является также и тот факт, что остальные, нормальные, микроспоры и пыльцевые зерна в культивируемом пыльнике у большинства видов обычно гибнут.

II. Получение гаплоидов из искусственно вызванных аномалий (рис. 2, 2А). Данный способ состоит в инокуляции пыльников, на которые было оказано воздействие различными факторами на ранних стадиях развития – прямое или косвенное, через донорное растение. Очевидно, в этих случаях происходит нарушение детерминации нормального хода микроспорогенеза и образования пыльцы, в результате – существенное увеличение процента различных аномалий развития.

Для получения аномалий из исходно нормальной спорогенной ткани могут быть использованы такие факторы, как температура, биологически активные вещества, магнитные поля, облучение и т.д. Так, воздействие *He*-лазером или концентрированным импульсным белым светом на пыльники пшеницы в процессе формирования микроспоры позволило увеличить вы-

ход гаплоидов. Сходные результаты были получены при воздействии на пыльники некоторых растений высокой температурой.

Для изменения спорофитной и гаметофитной детерминации возможны следующие варианты: 1) воздействие на донорное растение в целом, при этом период воздействия может быть различным: кратковременным – на один из этапов развития растения (выход в трубку, стебление и т.д.) или длительным (продолженным), что в значительной степени зависит от фактора воздействия, а также от вида растения; 2) локальное воздействие – на соцветие, пыльник или изолированный спорогенный комплекс. Независимо от способа воздействия во всех случаях, вероятно, снимается детерминация нормального хода микроспорогенеза и развития пыльцевого зерна. В результате спорогенная ткань, дающая в норме (т.е. в естественных условиях) фертильную (способную к оплодотворению) пыльцу, при воздействии становится источником аномальных структур.

Классификация аномалий детально не разработана, однако заслуживает специального рассмотрения, поскольку некоторые из них, возможно, являются **инициальными клетками гаплоидов**, и их характер, вероятно, обуславливает путь морфогенеза, по которому идет их дальнейшее развитие.

В связи с отсутствием детальных исследований по выявлению механизма образования естественных и индуцированных аномалий, а также и их классификаций в настоящее время трудно сказать, на какой этап мейоза целесообразнее воздействовать, чтобы получить максимальное количество гаплоидов. Известно, что у некоторых видов разные группы генов обуславливают различные формы аномалий. Однако дальнейший характер развития аномальных структур (многоядерных, многоклеточных и др.) неясен, поэтому остается неопределенным и путь морфогенеза (эмбриодогенез или гемморизогенез через каллус), т.е. путь воспроизведения гаплоидных растений.

Наши представления о мейозе как оптимальной стадии развития пыльника, воздействуя на которую можно увеличить выход гаплоидов, в определенной степени согласуются с литературными данными. Показано, например, что чем более ранняя стадия развития пыльника пшеницы берется для инокуляции, тем выше процент образования в нем аномальной пыльцы с равным делением и, следовательно, выход гаплоидов [Haploids in higher plants..., 1986]. При этом частота равного деления в пыльце *in vitro* намного больше, чем в таковой в естественных условиях. Кроме того, как указывается в литературе, культивирование *in vitro* пыльников на стадии мейоза вызывает образование аномальных многоядерных клеток, т.е., по-видимому, изменение характера течения мейоза. Заслуживает внимания и тот факт, что существует зависимость между стадией развития пыльника, выходом каллуса и образованием зеленых гаплоидов.

III. Получение гаплоидов из микроспор и пыльцевых зерен (рис. 2, 2Б). В этом случае получение гаплоидов связано со сложным процессом дифференциации таких высокоспециализированных клеток, как микроспора на поздних стадиях развития, вегетативная, генеративная клетки и гаметы-спермии. Наиболее благоприятной для индукции гаплоидов в культуре пыльников некоторых злаков и представителей других семейств цветковых оказалась стадия микроспоры [Narayanawamy, George, 1982; Горбунова,

Круглова, 1988, 1997; Shimada et al., 1995; Gonzales-Melendi et al., 1996; Reynolds, Crawford, 1997; Palmer, Keller, 1997; Raghavan, 1997; Guo, Pulli, 2000; Immonen, Robinson, 2000; Testillano et al., 2000; Батыгина, Круглова, 2001; Круглова, 2001; Круглова, Батыгина, 2002]. В то же время для некоторых злаков и крестоцветных такой стадией явилось двуклеточное [Narayananaswamy, George, 1982; Сатарова, 1994; Ilie-Grubor et al., 1998; и др.] или трехклеточное [Immonen, Antilla, 1998; и др.] пыльцевое зерно.

При получении гаплоидов из дву- или трехклеточного пыльцевого зерна в их формировании могут участвовать либо вегетативная и генеративная клетки одновременно, либо одна из них, либо только гаметы. Однако во многом это пока лишь теоретические посылки, поскольку детальные исследования по генезису структур, образующихся в культуре *in vitro*, отсутствуют. Кроме того, первое и даже второе деление генеративной клетки или спермиев в пыльцевом зерне еще не говорит о том, что их производные будут обязательно участвовать в образовании гаплоидов-регенерантов. Как известно, возможна их элиминация на разных этапах развития гаплоида.

Для получения гаплоидных растений из исходно нормальных микроспор и пыльцевых зерна после воздействия на них различными факторами необходима разработка специальных методик их изоляции из пыльника, что дает возможность получения гаплоидных растений “в чистом виде”. Особенно ценной является разработка метода изоляции спермиев из зрелой пыльцы. При посадке же микроспор и пыльцевых зерен вместе с тканями материнского организма (стенкой пыльника) наряду с гаплоидными могут возникнуть и негаплоидные регенеранты, что создает дополнительные трудности.

Получение гаплоидов тремя указанными выше путями представляет собой сложный многоступенчатый процесс изменения детерминации хода развития микроспоры и пыльцевого зерна, связанный с процессами дедифференциации и дифференциации.

Важным направлением исследований является разработка **методических аспектов идентификации стадии развития пыльника, используемого для получения гаплоидов**. Выявление стадии развития пыльника и характеристика содержащихся в нем микроспор и пыльцевых зерен перед инокуляцией обычно осуществляется ацетокарминовым методом. Однако обнаружить этим ускоренным методом малый процент аномалий, присутствующих в общей массе клеток, довольно сложно. Вместе с тем отсутствие строгой, **эмбриологически корректной** (с использованием классических цитоэмбриологических методик) **идентификации строения клеток и стадии их развития** может привести к неточности выводов в отношении происхождения гаплоидов. Так, большинство авторов полагают, что получают гаплоиды из исходно нормальных микроспор и пыльцы (после воздействия на них в культуре *in vitro*), ссылаясь на различные пути образования гаплоидов (А, В, С, D) в основном только из нормально развивающейся пыльцы.

В настоящее время каждый из трех рассмотренных теоретически возможных путей получения гаплоидов получил подтверждение. Однако, несмотря на эти данные, многие из поставленных вопросов не сняты с повестки дня, требуют дополнительных доказательств и создают определенные трудности в управлении процессом андроклинии.

Изложенные выше теоретические разработки в области культивирования генеративных структур *in vitro* уже нашли успешное применение в практике генетико-селекционных работ. В частности, их использование позволило выявить ряд критических периодов в развитии пыльника некоторых сельскохозяйственных культур, установить оптимальную стадию для индукции гаплоидии и создать высокоэффективную систему их тиражирования посредством определенных путей морфогенеза. **На основе этих теоретических разработок селекционерами России создан ряд ценных сортов и линий различных культур, например сорта ячменя – Раушан, Рахат и Биос-1, а также десятки дигаплоидных андроклинных линий яровой мягкой пшеницы** (НИИ СХ Центральных районов Нечерноземной зоны, Институт биологии Уфимского НЦ РАН, Башкирский государственный педагогический университет), в том числе Фотос – модельный объект для изучения морфогенетических процессов, лежащих в основе получения гаплоидов из пыльников и проиллюстрированных в настоящем атласе.

ГЛАВА 2

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектами исследования явились различные сорта и гибриды яровой мягкой пшеницы – *Triticum aestivum* L.: сорта – Башкирская 4, Башкирская 9, Башкирская 24, Диамант, Ершовская 32, Жница, Московская 35, Саратовская 29, Саратовская 55, Симбирка, Скала, Najach, Sonalika; гибриды – Гибрид 21, Линия Фотос, Линия 35, Линия 38.

В атласе данные по указанным выше сортам и гибридам приводятся в зависимости от поставленной цели исследования. **Наиболее предпочтительной моделью для изучения морфогенеза пыльника в естественных условиях и в культуре *in vitro* явилась линия Фотос;** при этом в качестве контроля был использован сорт Диамант – классический объект эмбриологических исследований для злаков. Линия Фотос характеризуется как высокой отзывчивостью пыльников на условия культивирования, так и высокой частотой образования растений-регенерантов. Данные по гормональной регуляции путей морфогенеза *in vitro* микроспоры приведены для большинства перечисленных сортов и гибридов, пыльники которых значительно различаются по содержанию эндогенных фитогормонов (см. главу 6).

В работе были использованы метод культуры *in vitro* пыльников яровой мягкой пшеницы [Горбунова, Круглова, 1988], модифицированный с учетом эмбриологических данных [Батыгина, Круглова, 2001; Круглова, Батыгина, 2002]; методы световой [Паушева, 1988; Камелина и др., 1992], трансмиссионной [Миронов и др., 1992] и сканирующей [Titova, Batygina, 1996] электронной микроскопии; гистохимические методы [Дженсен, 1965]; метод иммуноферментного анализа [Кудоярова и др., 1986]; метод фенологических наблюдений [Куперман, 1977].

Статистическую обработку полученных результатов вели с применением программы Excel.

ГЛАВА 3

МОРФОГЕНЕЗ ПЫЛЬНИКА ПШЕНИЦЫ

Формирование тычинки – единый процесс развития сложной интегрированной системы, все элементы которой развиваются сопряженно. У пшеницы сорта Диамант на ранних стадиях развития цветка закладывается околоцветник. Первой формируется наружная цветковая чешуя, затем внутренняя, и почти одновременно с последней закладываются тычинки в нижних цветках колосков (рис. 7). В верхних цветках колоска заложение тычиночных бугорков начинается позднее, когда в тычинках нижних колосков происходит мейоз.

На первых этапах тычиночный бугорок состоит из меристематических клеток (рис. 8, 1). По мере развития происходит его дифференциация на тычиночную нить и пыльник; при этом последний приобретает четырехлопастной вид вследствие формирования в нем гнезд пыльника (микроспорангиев). Гнезда пыльника попарно объединены в теки, между которыми образуется специализированная ткань – связник с проводящим пучком в центре (рис. 8, 2–8).

Пыльник – специализированная генеративная структура, основная функция которой состоит в формировании мужских гамет – спермиев. В его развитии принято различать три периода: **премейотический, мейотический и постмейотический** [Резникова, 1984; Батыгина, 1987]. В премейотический период пыльник характеризуется высокой митотической активностью клеток, формированием стенки микроспорангиев и спорогенной ткани. В мейотический период происходит мейоз в микроспороцитах (материнских клетках микроспор) с образованием тетрад гаплоидных микроспор, а также специализация клеток слоев стенки пыльника, связанная с выполняемыми ими функциями в процессе микроспоро- и микрогаметогенеза. В постмейотический период осуществляется формирование пыльцевого зерна (мужского гаметофита), сопровождающееся деструкцией одних слоев пыльника на фоне продолжения функционирования других.

Различают **сформированную стенку гнезда пыльника**, характеризующуюся определенным, таксоноспецифичным числом слоев клеток, и **стенку гнезда зрелого пыльника** – в момент его вскрывания [Батыгина, Шамров, 1981; Батыгина, 1987].

Премейотический период. В субэпидермальном слое меристемы каждого гнезда пыльника дифференцируются клетки археспория, расположенные

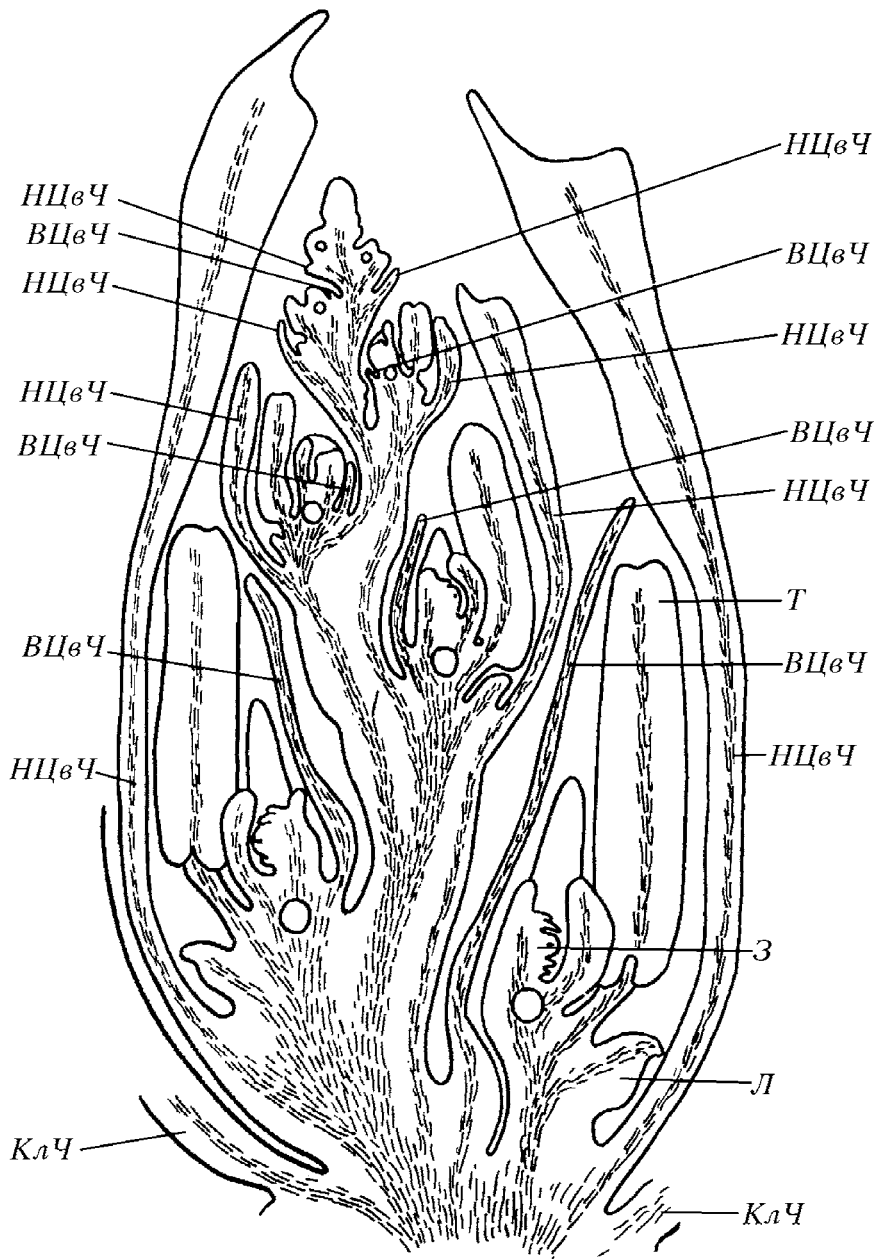


Рис. 7. Строение колоска пшеницы, состоящего из 8 цветков, на различных стадиях развития (кружки – местоположение клеток обкладки – передаточных клеток) на продольном срезе (по [Батыгина, 1987])

в один слой (рис. 8, 2–6). Эти клетки в процессе развития претерпевают антиклинальные деления, что ведет к увеличению их числа по длине пыльника. Каждая клетка археспория делится периклинально, отделяя наружу клетку париетального слоя, а к центру гнезда пыльника – спорогенную клетку (рис. 8, 5). Параллельно со стороны связника клетки его меристемы также дифференцируются в париетальный слой. В результате вокруг спорогенной ткани формируется кольцо париетальной ткани, имеющей двойное происхождение. Клетки париетального слоя также делятся периклинально, формируя два слоя: наружный, который в процессе развития преобразуется в эндотеций, и внутренний. Клетки последнего в свою очередь претерпевают еще одно периклинальное деление, отделяя средний слой и тапетум (рис. 8, 7, 8). Клетки исходного тяжа спорогенной ткани к этому моменту делятся с образованием нескольких тяжей.

Таким образом, **стенка гнезда пыльника пшеницы сорта Диамант характеризуется центростремительным типом развития** (тапетум отделяется последним и является производным париетального слоя). **Сформированная стенка пыльника состоит из четырех слоев (экзотеций, эндотеций, средний слой и тапетум – рис. 8, 8)**, клетки которых по своим характеристикам близки к меристематическим. К моменту ее возникновения митозы в спорогенных клетках полностью прекращаются.

Мейотический период. В процессе развития клетки спорогенной ткани постепенно преобразуются в микроспороциты (рис. 8, 9–11). Для исследованного сорта пшеницы, как и для всех злаков, характерно своеобразное однослойное (в виде кольца) расположение микроспороцитов, а в дальнейшем тетрад микроспор, микроспор и пыльцевых зерен, в гнезде пыльника; при этом для каждого вида количество микроспороцитов в гнезде таксоноспецифично [Романов, 1966, 1970а, б].

Мейоз протекает обычным образом: с его началом (ранняя профазы I мейотического деления) на внутренних стенках микроспороцитов, приобретающих клиновидную форму, откладываются характерные для злаков каллозные гребни, обращенные в полость гнезда пыльника. В результате I и II делений мейоза последовательно формируются диады и тетрады микроспор (сукцессивный тип образования тетрад – рис. 9, 1–8). Четыре гаплоидные клетки тетрады изобилатерального типа расположены в одной плоскости таким образом, что каждая из микроспор, а в дальнейшем образующиеся из них пыльцевые зерна, прилегают к тапетальному слою. В отдельных случаях в центре гнезда пыльника иногда встречаются микроспоры, не контактирующие с тапетумом. Дальнейшая судьба таких микроспор неясна.

Во время мейоза происходят значительные изменения в клетках слоев стенки пыльника. Клетки экзотеция и эндотеция становятся вакуолизированными. На наружных оболочках клеток экзотеция начинается отложение кутикулы. Клетки среднего слоя, а также их ядра и ядрышки сильно удлиняются и уплощаются. Тапетум приобретает признаки строения, характерные для тапетума секреторного типа: наблюдается значительный рост его клеток, увеличение числа их ядер, которые становятся крупными и содержат несколько ядрышек (рис. 8, 9–12).

Постмейотический период. В начале этого периода происходит “растворение” каллозной оболочки вокруг тетрад микроспор (в результате

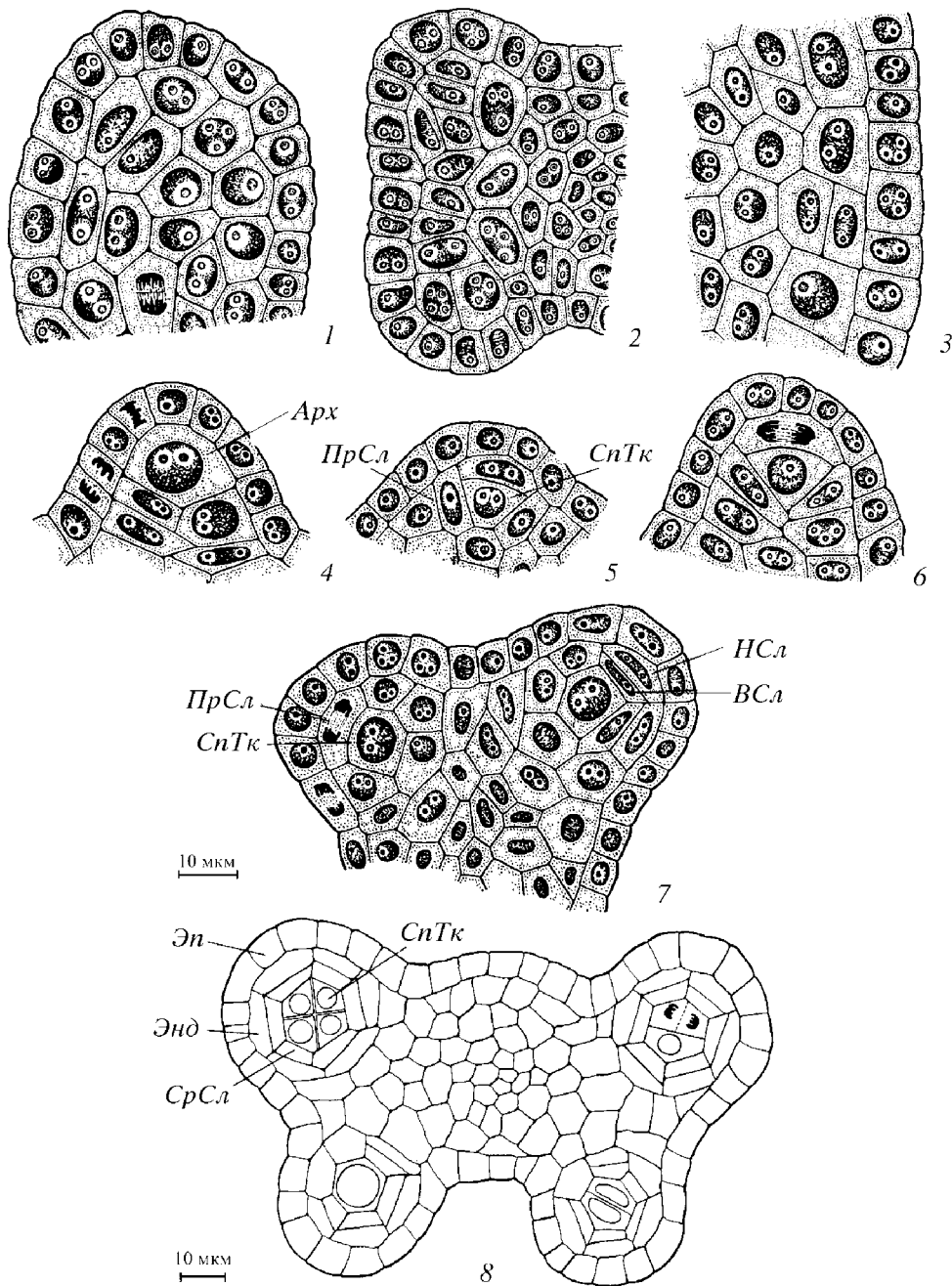
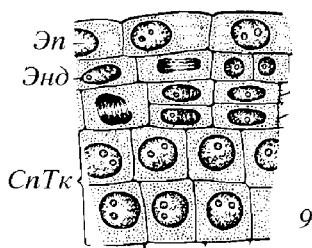


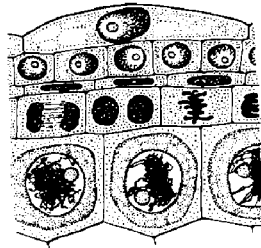
Рис. 8. Последовательные стадии формирования пыльника пшеницы сорта Диамант

1-8 – премеитический период; 9-12 – мейотический период; 13-18 – постмейотический период (по [Батыгина, 1987] с изменениями)

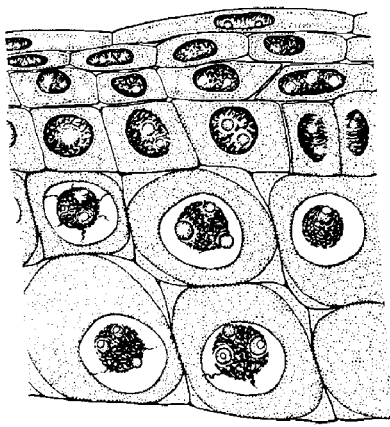
Объяснения см. текст



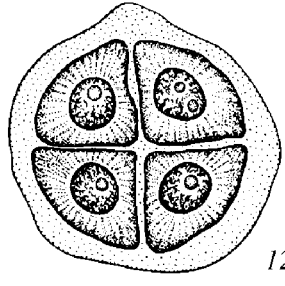
9



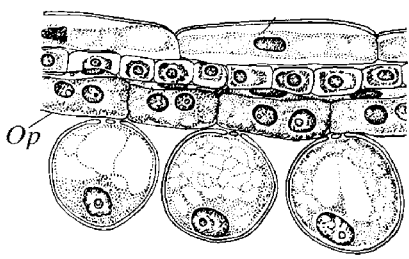
10



11

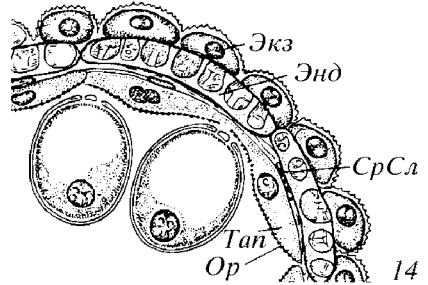


12

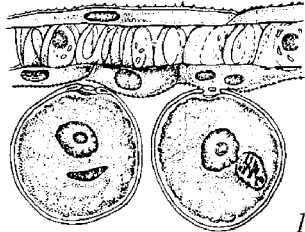


13

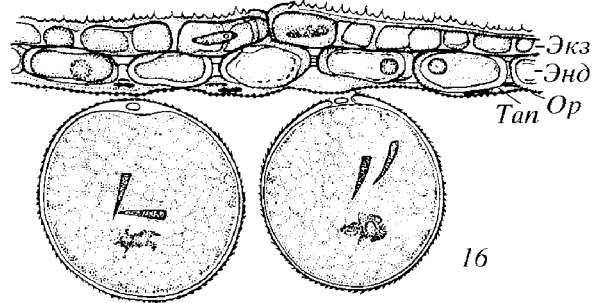
10 мкм



14



15



16

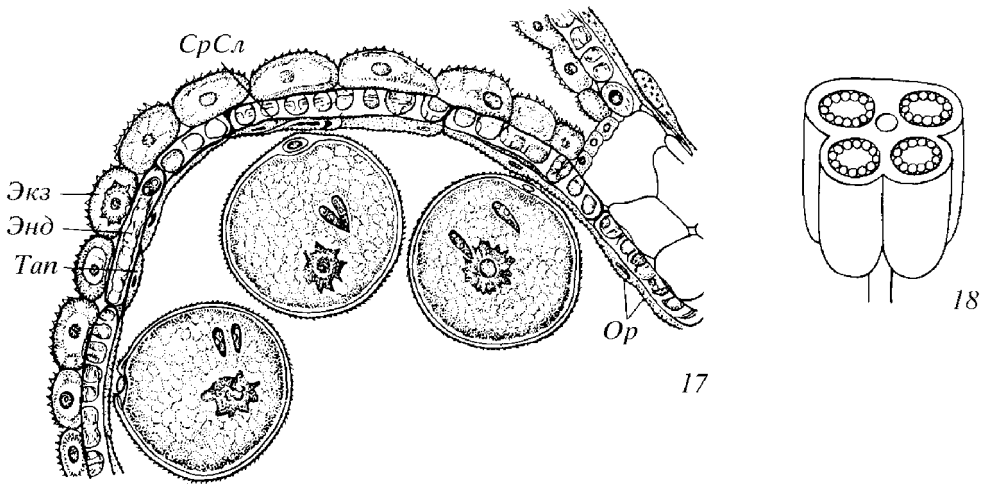


Рис. 8 (окончание)

ферментативного гидролиза под действием каллазы) и их распад на отдельные микроспоры. После этого микроспора вступает в длительный (до нескольких дней) интерфазный период, в течение которого ее размеры сильно увеличиваются. Ядро такой микроспоры обычно содержит несколько ядрышек и расположено в центре клетки, ее цитоплазма слабовакуолизована (**стадия слабовакуолизированной микроспоры** – рис. 9, 8, 9; 10, 1). В ходе этой стадии происходит постепенное усиление степени вакуолизации микроспоры и увеличение размеров вакуолей. Изменения во внутренней структуре сопряжены с усложнением строения оболочки микроспоры – образованием экзины, интины, а также будущей поры прорастания пыльцевой трубки – оперкулума, формирующегося в области контакта с тапетумом (рис. 9, 10, 11; 10, 2). В результате на этой стадии развития микроспора характеризуется становлением двух полюсов – наружного, обращенного порой к тапетуму, и внутреннего, направленного в полость гнезда пыльника (рис. 8, 13).

В конце интерфазы мелкие вакуоли в цитоплазме микроспоры сливаются в одну крупную вакуоль, а ее ядро (вследствие его направленного движения в пристенном слое цитоплазмы) перемещается на сторону, противоположную порою прорастания (**стадия сильновакуолизированной микроспоры**). Микроспора приобретает четко выраженное полярное строение, проявляющееся не только во внешнем, но и во внутреннем строении: определенном положении вакуоли – со стороны наружного полюса, обращенного к тапетуму, и ядра – со стороны внутреннего полюса, супротивно порою прорастания (рис. 8, 14; 9, 12; 10, 3, 4). Это отражается и в закономерном распределении в микроспоре цитоплазмы ее органелл и включений. Полярность микроспоры обусловлена целым комплексом факторов, в первую очередь ее положением по отношению к тканям стенки пыльника и создаваемым ими градиентом питательных веществ.

Следующая стадия – **стадия формирования двуклеточного пыльцевого зерна** – начинается с митотического деления полярной, сильновакуолизиро-

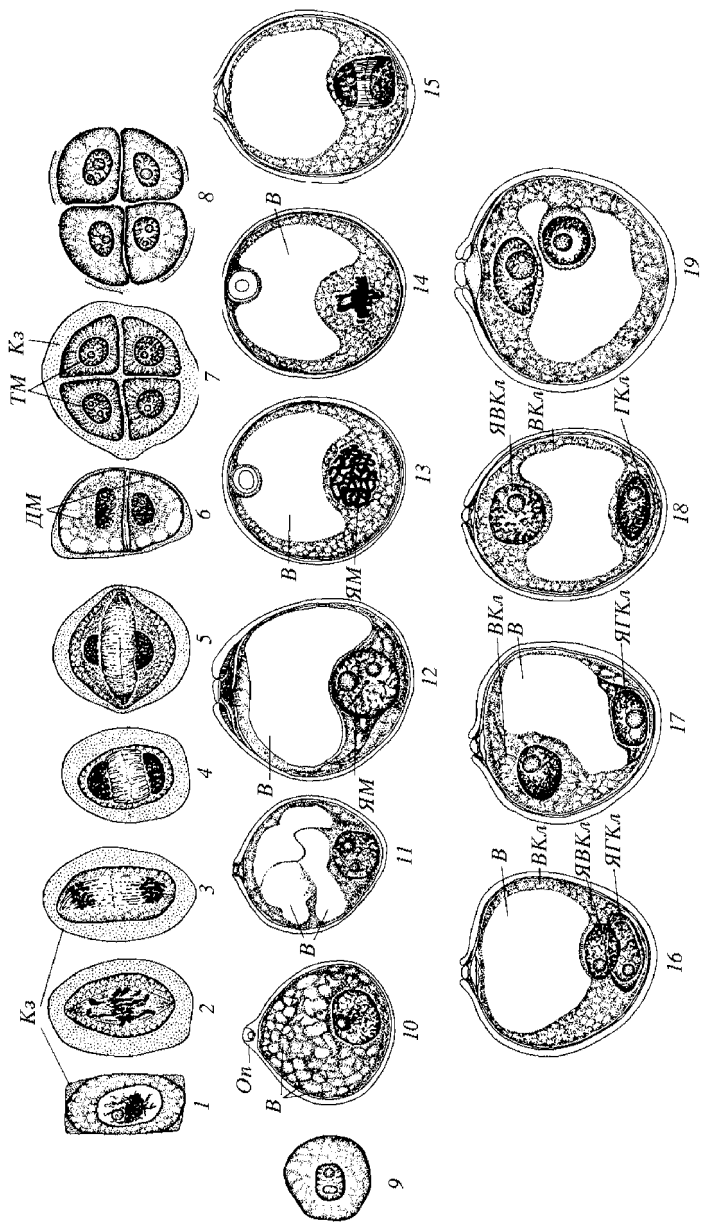
ванной микроспоры, приводящего к возникновению системы из двух гаплоидных клеток – генеративной и вегетативной. Вследствие полярности микроспоры ее деление является асимметричным, неравным и дифференцирующим: образующиеся генеративная и вегетативная клетки оказываются различными по размерам, а также характеру их дальнейшего развития. Только что образовавшаяся, меньшая по размерам генеративная клетка тесно прилегает к оболочке пыльцевого зерна со стороны, противоположащей поре, и имеет в профиль характерную линзовидную форму (рис. 9, 13–16; 10, 5–7).

Электронно-микроскопическое исследование процесса деления микроспоры показало, что клеточная стенка между вегетативной и генеративной клетками почти целиком состоит из каллозы, которая сохраняется очень недолго. После исчезновения каллозы генеративная клетка оказывается ограниченной двумя плазмалеммами – собственной плазмалеммой и плазмалеммой вегетативной клетки. Вначале ядра вегетативной и генеративной клеток не отличаются друг от друга по размерам, хотя объем ядрышка в ядре вегетативной клетки несколько больше. В дальнейшем происходит увеличение объема ядра вегетативной клетки, сопровождающееся ее постепенной девакуолизацией. Это приводит к возникновению существенных различий в ядерно-плазменном отношении двух клеток: основной объем генеративной клетки занимает ядро, тогда как слой ее цитоплазмы очень тонкий; наоборот, большую часть вегетативной клетки составляет цитоплазма. При этом генеративная клетка отделяется от оболочки пыльцевого зерна и перемещается внутрь вегетативной клетки, изменяя при этом свою форму (рис. 9, 17–21; 10, 7–10).

Возникший в процессе эволюции **интереснейший феномен последовательного закономерного движения ядра внутри микроспоры, а также перемещения генеративной клетки внутри вегетативной в пыльцевом зерне**, несомненно, обусловлен активным метаболизмом этих клеток и системой межклеточных взаимодействий, в первую очередь с клетками окружающих тканей стенки пыльника [Батыгина, 1974, 1987; Батыгина, Круглова, 1994].

Только после осуществления этапа перемещения генеративной клетки внутрь вегетативной возможен переход **к следующей стадии развития пыльцевого зерна – процессу гаметогенеза (спермиогенеза)**. Митотическое деление генеративной клетки приводит к образованию системы трехклеточного пыльцевого зерна, состоящей из вегетативной клетки и двух спермиев, располагающихся в ее цитоплазме (рис. 8, 16; 9, 22–31). Как и вегетативная клетка, спермии ограничены двумя плазмалеммами – собственной и плазмалеммой вегетативной клетки. Характерно, что спермии, локализованные в цитоплазме вегетативной клетки, связаны друг с другом, а один из них и с ядром вегетативной клетки, образуя так называемую мужскую оплодотворяющую систему (“male germ unit” [Russell, 1997]). С началом спермиогенеза совпадает интенсивное образование запасных питательных веществ в цитоплазме вегетативной клетки, которая к этому времени заполняет почти весь ее объем.

В постмейотический период экзотеций становится высокоспециализированной покровной тканью. Оболочки его клеток утолщаются, слой кутикулы, покрывающий их с внешней стороны, увеличивается. На стадии сла-



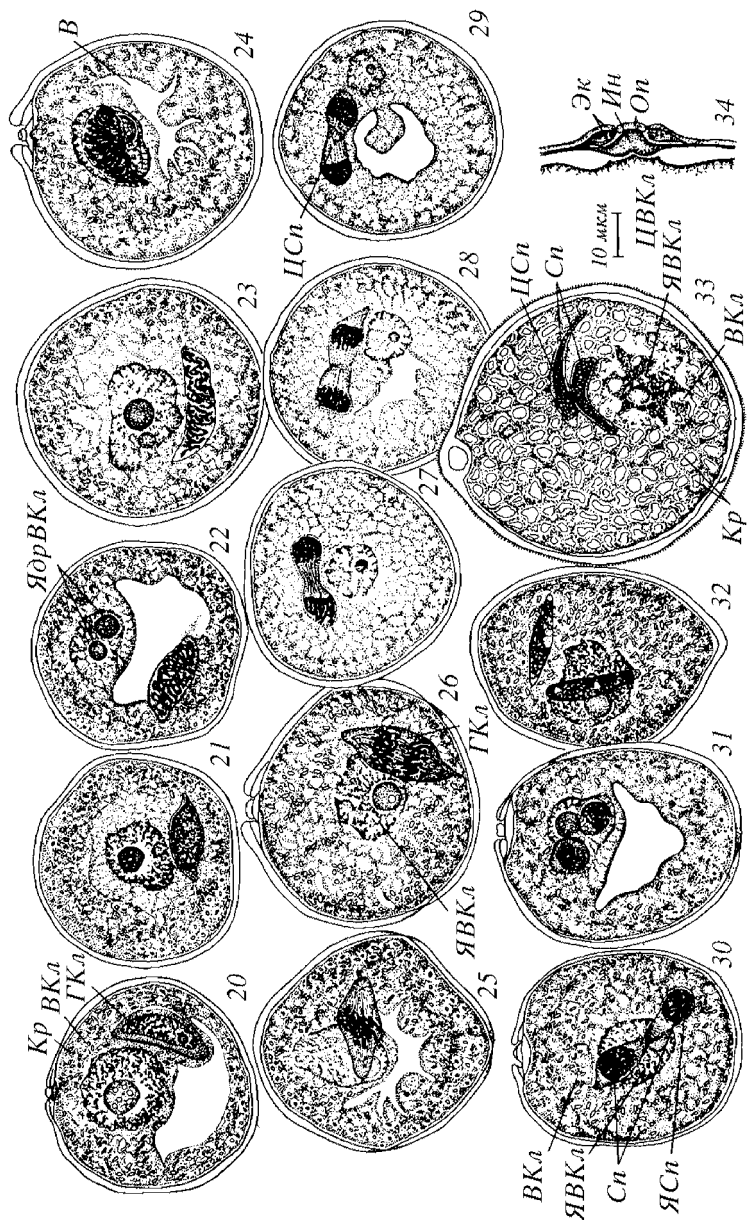
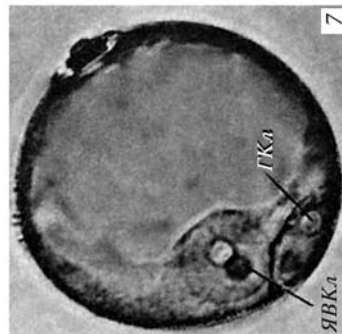
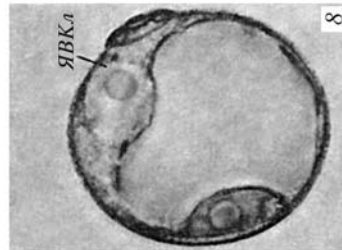
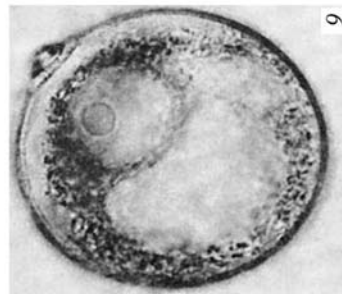
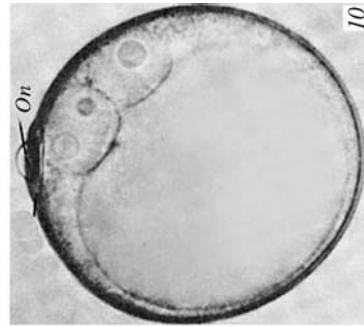
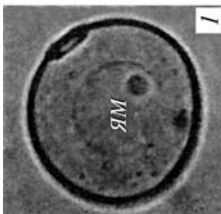
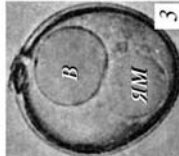
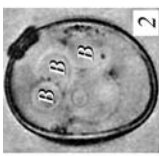
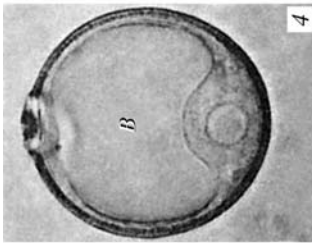
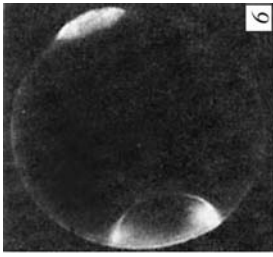


Рис. 9. Микроспорогенез и развитие пыльцевого зерна у пшеницы сорта Диамант (по [Батлыгина, 1987] с изменениями)

Объяснения см. текст



бовакуолизированной микроспоры клетки эндотеция вытягиваются в тангентальном направлении и содержат крупные ядра, в них появляются первые признаки формирования фиброзных утолщений оболочек (рис. 8, 13), становящихся еще более отчетливыми на стадии сильновакуолизированной микроспоры (рис. 8, 14). На стадии двуклеточного пыльцевого зерна отдельные клетки среднего слоя начинают проявлять признаки дегенерации, но в целом сохраняют свою жизнедеятельность достаточно долго. Считается, что первоначально эта ткань выполняет функцию аккумуляции запасных веществ, а затем транспорта ассимилятов к тапетуму и пыльцевому зерну.

Особенность развития тапетума во время распада тетрады на микроспоры – деструкция первичной целлюлозной оболочки его клеток и образование вокруг них новой, спорополлениновой, оболочки, связанной с секретцией спорополленина – одного из компонентов построения наружной оболочки микроспоры и пыльцевого зерна (эскины) на более поздних стадиях развития [Габараева, 1994]. Одновременно с образованием спорополлениновой оболочки на внутренних и частично на радиальных стенках клеток тапетума отмечается появление орбикул (рис. 8, 13), служащих, по-видимому, для прикрепления к нему микроспор и пыльцевых зерен на ранних стадиях развития. Помимо внутренней тапетальной спорополлениновой пленки (целиком окружающей каждую клетку), для тапетума также характерно наличие наружной, перитапетальной спорополлениновой, пленки, ограничивающей все его клетки со стороны среднего слоя. Функции тапетальной и перитапетальной пленок окончательно не выяснены. Полагают, что первая обеспечивает контакт пыльцевых зерен с тапетумом (в результате “прилипания” шпиков эскины к шпикам орбикул) и их однослойное расположение в гнезде, вторая – выстилает гнездо пыльника, создавая своеобразный мешок, в котором сохраняются и развиваются микроспоры и пыльцевые зерна [Heslop-Harrison, Dickinson, 1969; Романов, 1970a; Огородникова, 1994].

Максимум активности тапетума, связанной с секретцией необходимых для формирования пыльцевого зерна метаболитов, приходится на стадию слабовакуолизированной микроспоры. К этому времени завершается формирование спорополлениновой оболочки вокруг его клеток, которые продолжают оставаться в тесном контакте с пыльцевыми зернами почти до стадии их зрелости. Лишь на самых поздних стадиях развития (рис. 8, 15, 16) происходит разрушение клеток тапетума и отторжение пыльцевых зерен от



Рис. 10. Основные фазы развития пыльцевого зерна пшеницы (по наблюдениям на живом материале) (по [Романов, 1970б], Орел, ориг. данные)

1 – микроспора с невакуолизированной цитоплазмой; 2 – начало фазы вакуолизации: образование мелких вакуолей; 3, 4 – конец фазы вакуолизации: ядро расположено у внутреннего конца микроспоры, а вакуоль – у внешнего; микроспора в конце фазы роста; ядро находится у внутреннего конца пыльцевого зерна, против поры; 5, 7 – пыльцевое зерно сразу после завершения первого митоза: ядро вегетативной клетки в своем первоначальном положении около генеративной клетки; 6 – каллоза в стенке генеративной клетки (под ультрафиолетовым светом); 8 – конец фазы движения ядра вегетативной клетки, расположенного около поры; 9, 10 – конец фазы движения генеративной клетки, находящейся в контакте с ядром вегетативной клетки: в цитоплазме вегетативной клетки – крахмальные зерна. На всех фотографиях хорошо видна пора с оперкулумом. Обозначения см. на рис. 9

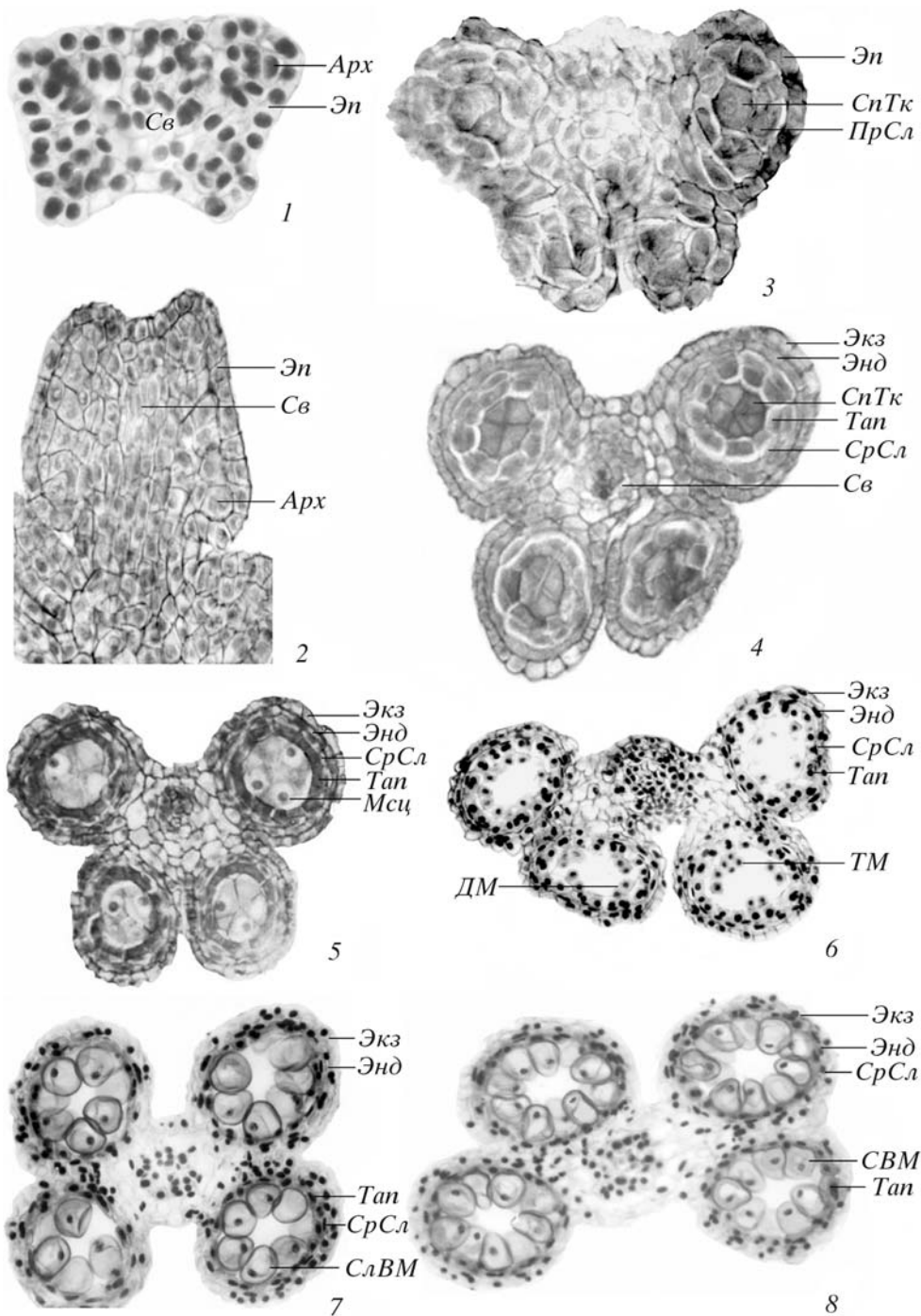


Рис. 11. Последовательные стадии формирования пыльника пшеницы линии Фотос
 1-4 – премеитический период; 5-6 – мейотический период; 7-10 – постмейотический период. Объяснения см. текст

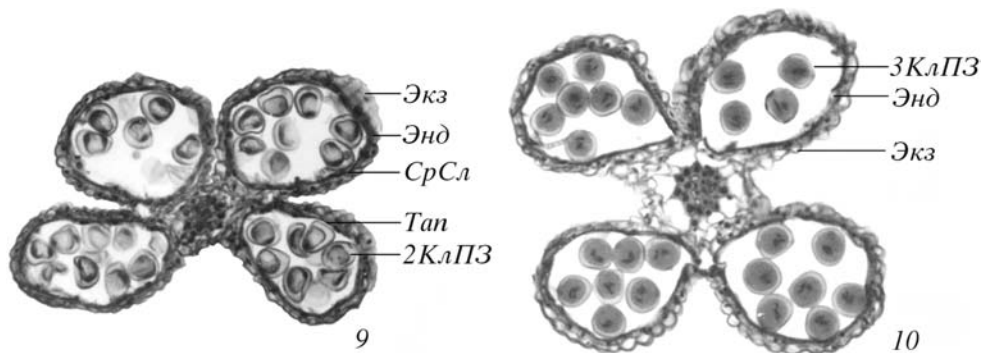


Рис. 11 (окончание)

его поверхности, которому, по-видимому, также способствуют орбикулы [Heslop-Harrison, Dickinson, 1969; Огородникова, 1994]. Одновременное образование спорополлениновой оболочки с орбикулами вокруг тапетума и экзины у микроспор, а также идентичность их химической природы являются примером сопряженного развития стенки пыльника, спорогенных структур и пыльцевых зерен.

Зрелое пыльцевое зерно, готовое к процессам опыления и оплодотворения, **трехклеточное**, состоит из крупной вегетативной клетки, цитоплазма которой содержит большое количество крахмала и ядро лопастной формы, и двух серповидных клеток-спермиев (рис. 9, 32–34). **Стенка зрелого пыльника представлена слоями экзотеция, эндотеция, дегенерирующими остатками среднего слоя и тапетума** (рис. 8, 17, 18). Экзотеций сильно кутикулирован с поверхности. Эндотеций содержит фиброзные утолщения, достигающие максимального развития и способствующие вскрыванию гнезд пыльника. Тапетум представлен, главным образом, тапетальной пленкой с орбикулами.

Проведенное детальное сравнительное исследование развития пыльника пшеницы сорта Диамант и линии Фотос убедительно показало, что оно осуществляется в целом сходно и характеризуется аналогичной системой морфогенетических корреляций в развитии его основных структур (рис. 11, 1–10; 12, 1–9). Однако следует отметить, что морфогенез пыльника у линии Фотос **отличается более ускоренными темпами** по сравнению с морфогенезом пыльника сорта Диамант. Это обусловлено более быстрыми сроками прохождения всех фаз развития как проявления скороспелости, имеющей важное значение в засушливых климатических условиях Южного Урала [Батыгина, Круглова, 2001].

Таким образом, **формирование пыльника у яровой мягкой пшеницы сорта Диамант и линии Фотос характеризуется центростремительным типом развития стенки микроспорангия, однослойным расположением микроспор и пыльцевых зерен в гнезде, полярностью их строения в определенной стадии, обусловленной спецификой контакта с клетками тапетума и градиента транспорта питательных веществ от них. Каждой стадии развития свойственна определенная система морфогенетических корреляций в формировании спорогенной ткани, микроспор, пыльцевых зерен и окружа-**



Рис. 12. Микроспорогенез и развитие пыльцевого зерна у пшеницы линии Фотос
Объяснения см. текст

ющих тканей пыльника. Характер этих корреляций обеспечивает смену программы развития пыльника со спорофитной на гаметофитную, конечным результатом которой является формирование пыльцевых зерен нормального строения (с вегетативной клеткой и двумя мужскими гаметами – спермиями) и их участие в процессах опыления и оплодотворения. Морфогенетические корреляции также обуславливают достижение тканями стенки пыльника уровня специализации, необходимой для выполнения свойственных им функций. Выявленные морфогенетические корреляции позволили выделить в процессе развития пыльника пшеницы ряд критических периодов и стадий развития, каждой из которых соответствует определенная фенофаза развития растения [Батыгина, 1974, 1987; Batygina, 2002; Batygina, Vasilyeva, 2003].

ГЛАВА 4

КРИТИЧЕСКАЯ СТАДИЯ РАЗВИТИЯ ПЫЛЬНИКА, ОПТИМАЛЬНАЯ ДЛЯ ИНДУКЦИИ МОРФОГЕНЕЗА *IN VITRO* ПО СПОРОФИТНОМУ ПУТИ

Полученные экспериментальные данные по индукции спорофитной программы развития у исследованных сортов и гибридов пшеницы **подтвердили один из теоретически возможных путей получения гаплоидов, а именно – из исходно нормальных микроспор** (см. рис. 1, 2). Установлена оптимальная стадия для смены программы развития с гаметофитной на спорофитную – **стадия сильновакуолизированной микроспоры**. Инокуляция пыльников именно на этой стадии при всех равных условиях (способ стрессового воздействия, состав индукционной питательной среды) приводила к индукции спорофитного пути морфогенеза и образованию гаплоидных растений-регенерантов.

Проведенный цитозембриологический анализ позволил **охарактеризовать стадию сильновакуолизированной микроспоры у пшеницы линии Фотос с позиции концепции критических периодов в развитии пыльника. Способность к переключению программы развития определяется, по-видимому, особенностями структурной организации этой клетки, в первую очередь ее хорошо выраженной полярностью**: наличием крупной вакуоли со стороны поры (оперкулула) и ядра, расположенного строго противоположно этой поре (рис. 13, 1–3).

Ультраструктурный анализ свидетельствует, что основная часть цитоплазмы с органеллами в микроспоре сконцентрирована вокруг ядра и лишь незначительная – пристенно, вокруг крупной электронопрозрачной вакуоли. Микроспора на этой стадии развития характеризуется активными процессами метаболизма. Доминирующими структурами цитоплазмы микроспоры являются цистерны ЭР и многочисленные тубулярные образования. Митохондрии мелкие и, судя по степени развитости крист, принимают активное участие в клеточном метаболизме. Аппарат Гольджи активный. Присутствуют липидные образования, рибосомы, включая полисомы, разные по размеру и электронной плотности сферосомы и многочисленные везикулы разнообразной структуры, образующие мультивезикулярные тела. Форма пластид округлая или амебоидная, их размер не превышает 2 мкм. Строма пластид мелкозерниста (рис. 14, 1–5).

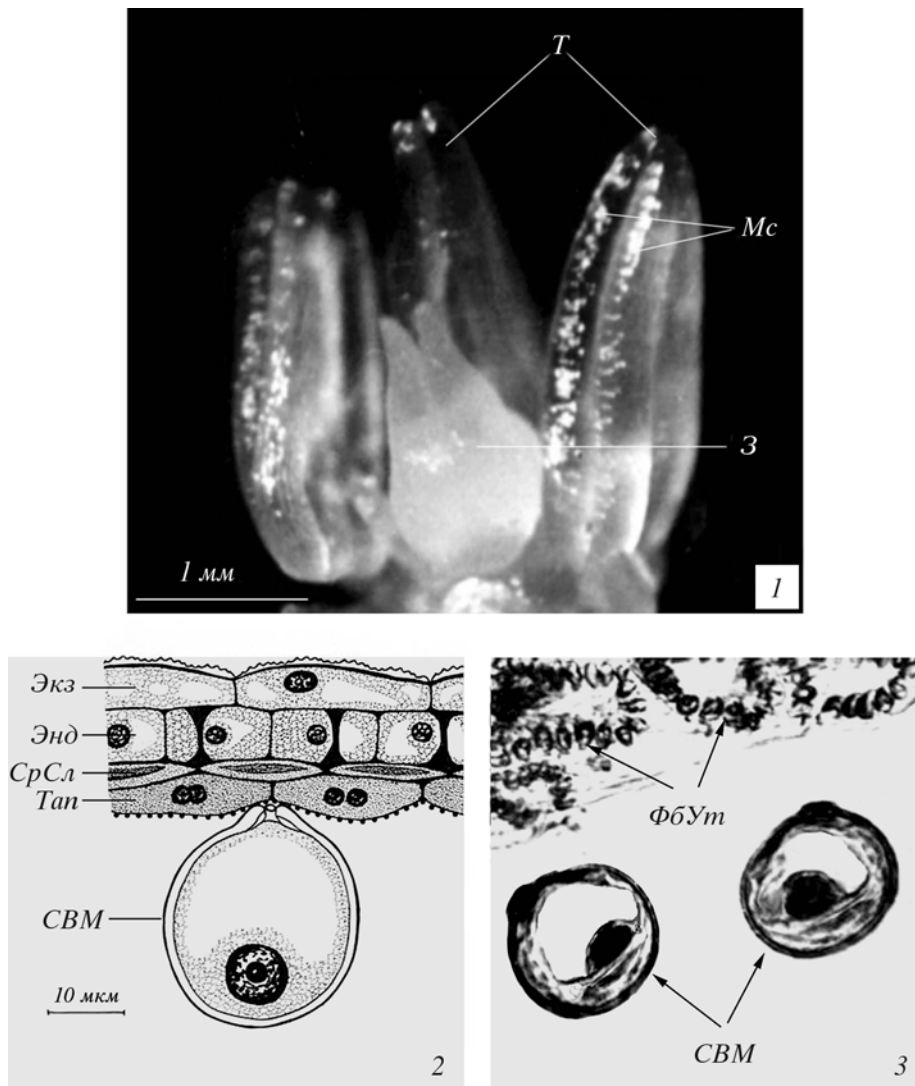


Рис. 13. Строение цветка (1) и стенки пыльника (2, 3) пшеницы линии Фотос в критической стадии развития

1, 2 – по [Круглова, 2001]; 3 – по [Горбунова, 1993]

Следует отметить, что по ряду признаков (наличие крупного ядра, хорошо развитой центральной вакуоли и апикально-базальной организации клетки) сильновакуолизированная микроспора структурно сходна со зрелой яйцеклеткой большинства цветковых растений. Это **подтверждает теоретическое положение о существовании принципиального сходства в организации инициальных клеток нового индивида при различных системах репродукции в естественных условиях и в культуре *in vitro*** (см. главу 1, рис. 4).

Вся совокупность отмеченных особенностей структурной организации сильновакуолизированных микроспор позволяет оценивать их как клетки,

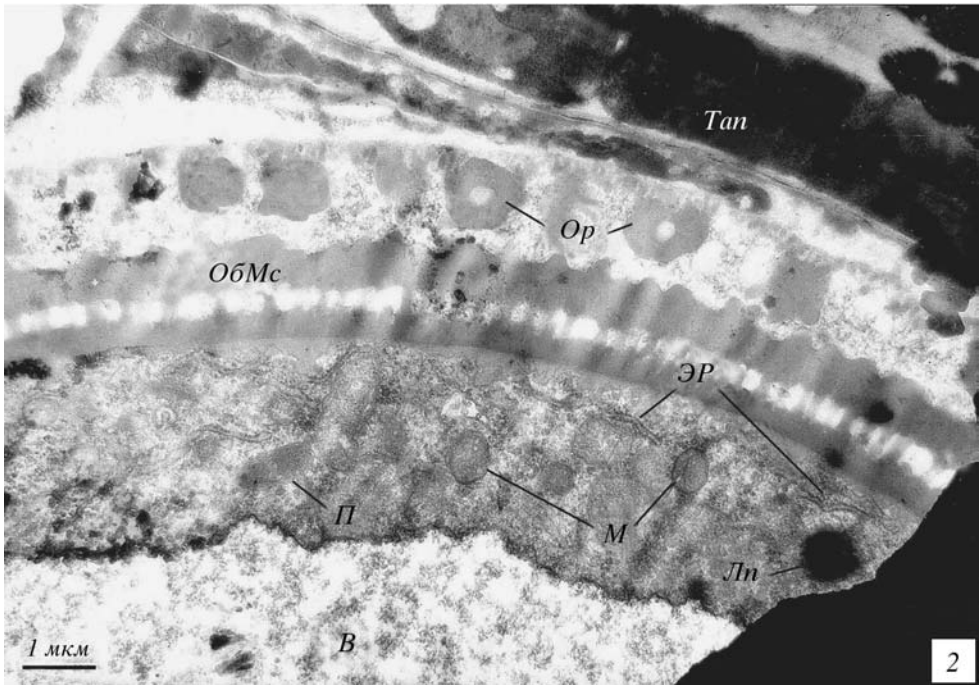
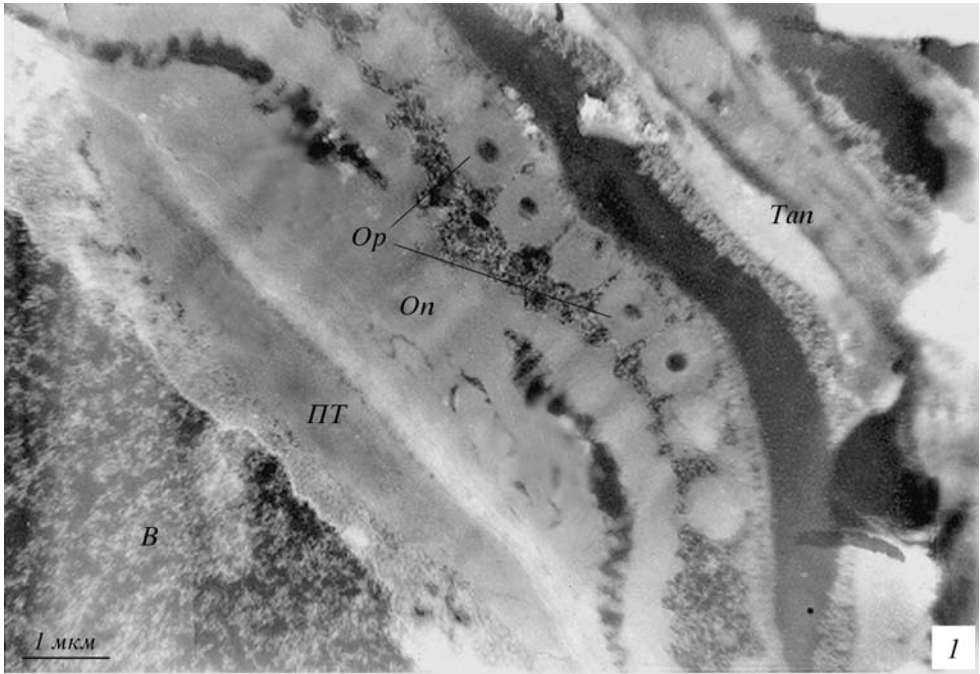


Рис. 14. Строение сильновакуолизированной микроспоры в области оперкула (1, 2) и ядра (3–5) в естественных условиях (ТЭМ); виден контакт микроспоры с клетками тапетума посредством оперкула и орбикул (1, 2)

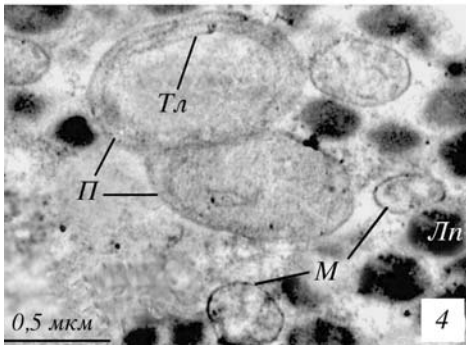
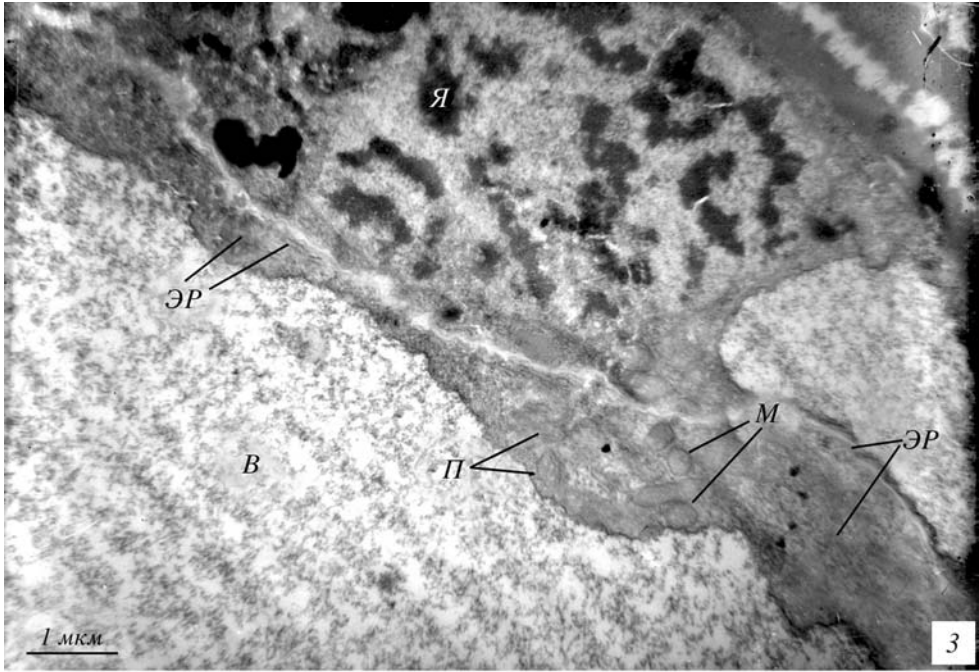


Рис. 14 (окончание)

морфогенетически компетентные к переключению программы развития с гаметофитной на альтернативную спорофитную *in vitro*.

Стенка гнезда пыльника на стадии сильновакуолизированной микроспоры характеризуется кутинизацией оболочек клеток экзотеция, началом формирования фиброзных утолщений в оболочках клеток эндотеция, а также началом деструкции клеток среднего слоя и тапетума (рис. 13, 2, 3; 15, 1). Важно подчеркнуть, что все микроспоры при этом находятся в тесном контакте с оболочками клеток тапетума, осуществляющимся в значительной степени посредством пор и орбикул (рис. 14, 1, 2; 15, 1, 2). Такой контакт обеспечивает поступление питательных веществ от его клеток к микроспорам и в то же время определяет полярность последних – за счет создаваемого градиента транспорта метаболитов.

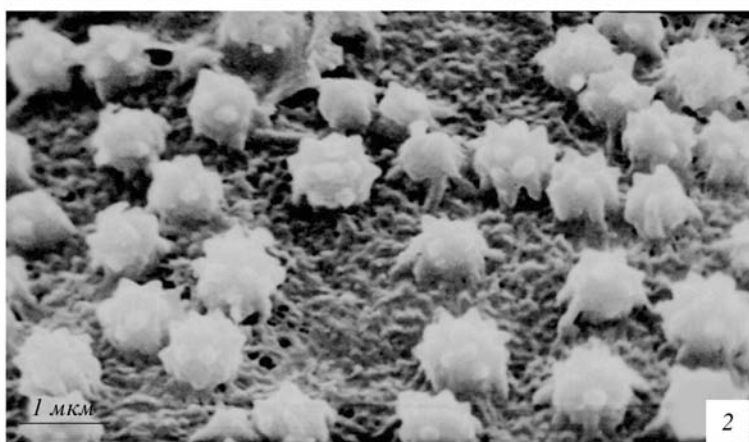
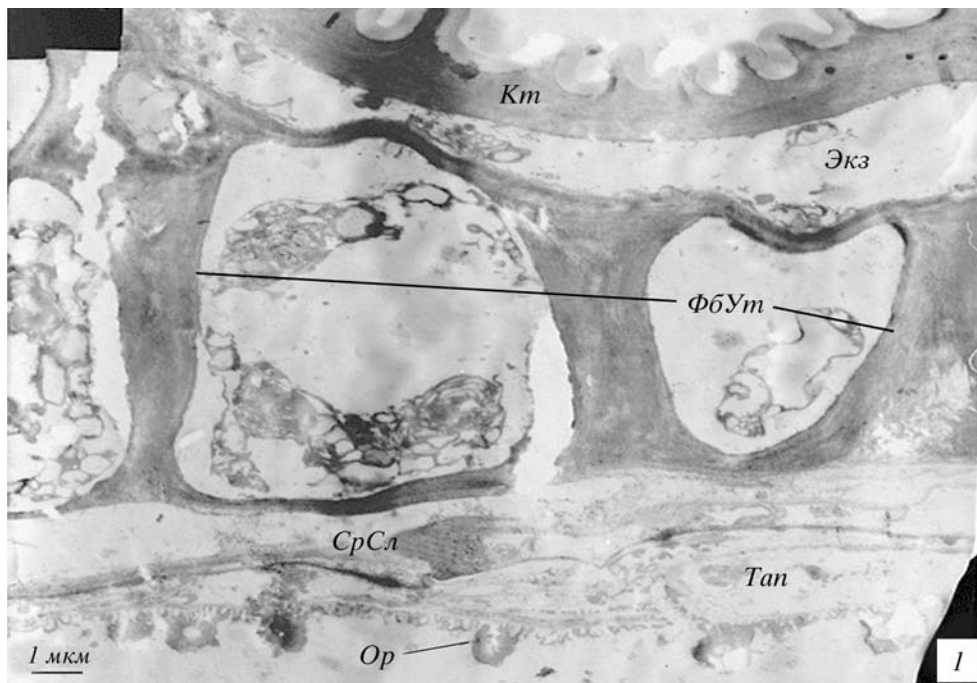


Рис. 15. Строение стенки гнезда (1) и орбикул (2) пыльника на стадии сильновакуолизированной микроспоры
1 – ТЭМ; 2 – СЭМ

Важное диагностическое значение имеет выявленная корреляция между началом формирования фиброзных утолщений в оболочках клеток эндотеция в пыльнике и увеличением количества сильновакуолизированных микроспор (более 70%) в его гнезде. Поэтому появление фиброзных утолщений в эндотеции служит четким морфологическим маркером пыльника пшеницы в критической стадии сильновакуолизированной микроспоры. Фенотипические признаки растений пшеницы линии Фотос, содержащих пыльники на этой стадии развития, также имеют диагностическое зна-

чение: кончик колоса, находящегося в листовой обертке, располагается строго на $\frac{1}{4}$ расстояния от основания флагового листа до основания предпоследнего снизу листа (VII этап органогенеза).

Сведения о стадии микроспоры как оптимальной для смены программы с гаметофитной на спорофитную приведены в ряде исследований, однако сводятся главным образом к констатации факта, без учета периодизации развития этой клетки и окружающих тканей пыльника (Shimada et al., 1995; Reynolds, Crawford, 1997; Immonen, Antilla, 1998; и др.). В отдельных работах предпринята попытка (основанная преимущественно на данных статистического анализа) интерпретировать данную стадию как своеобразное “морфогенное окно” для переключения программы развития на спорофитную [Анохин, Семова, 1991]. **Именно привлечение концепции критических периодов и оценка структурной организации пыльника с позиции системного подхода позволили охарактеризовать сильновакуолизованную микроспору как клетку, морфогенетически компетентную к переключению программы развития с гаметофитной на спорофитную, а также выявить морфологические маркеры для ее экспресс-диагностики и тем самым оптимизировать процесс получения максимального количества гаплоидов.**

ГЛАВА 5

МОРФОГЕНЕЗ МИКРОСПОРЫ ПРИ ИНДУКЦИИ СПОРОФИТНОЙ ПРОГРАММЫ

Индукция переключения программы развития микроспор, находящихся в критической сильновакуолизированной стадии, с гаметофитной на спорофитную в условиях *in vitro* достигается воздействием на пыльники перед их инокуляцией различными стрессовыми факторами (физическими, химическими, биохимическими). В биотехнологической практике наиболее удобен и предпочтителен способ воздействия на пыльники, находящиеся в изолированных соцветиях, холодом в определенном режиме – так называемая холодовая предобработка, или cold pretreatment [Narayanaswamy, George, 1982; Huang, 1986; Сатарова, 1997; Heberle-Bors, 1998; Immonen, Robinson, 2000; Wang et al., 2000; Bai, Qu, 2001; и др.]. В настоящей работе также был использован данный методический прием – **предварительное стрессовое воздействие на пыльники пшеницы, находящиеся в изолированных колосьях, холодом в следующем режиме: $4 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 7 сут.**

Стрессовое воздействие холодом приводит к нарушению целостности пыльника как единой интегрированной системы, проявляющееся в “отрыве” микроспор от стенки пыльника. Согласно данным световой и трансмиссионной электронной микроскопии, после 3 сут стрессового воздействия холодом начинается постепенное нарушение контакта микроспор с клетками тапетума (рис. 16, 17). На 7-е сут этот процесс достигает максимума – 100% отрыва микроспор от тапетума.

Нарушение морфогенетических и морфофизиологических корреляций между тканями стенки пыльника и микроспорами, связанное с переходом на спорофитный путь развития, имеет следствием изменение структурной организации микроспоры (процесс постепенной девакуолизации и синтез цитоплазмы, перемещение ядра из пристенного положения к центральному, изменение полярности – см. ниже). Одновременно наблюдается дегенерация слоев стенки пыльника, проявляющаяся в сжатии клеток, отставании протопластов от клеточной оболочки, изменении структуры цитоплазмы и т.д. (рис. 18).

Результат всех этих изменений – нарушение процесса нормального формирования пыльцевого зерна (мужского гаметофита) и переключение программы его развития с гаметофитной на спорофитную. В условиях культуры *in vitro* микроспоры, лишенные контакта со стенкой пыльника, вместо неравного деления и последовательного прохождения стадий дву- и трехклеточного пыльцевого зерна переходят к относительно равному симметричному делению. Дальнейшее развитие продуктов равного деления может осуществ-

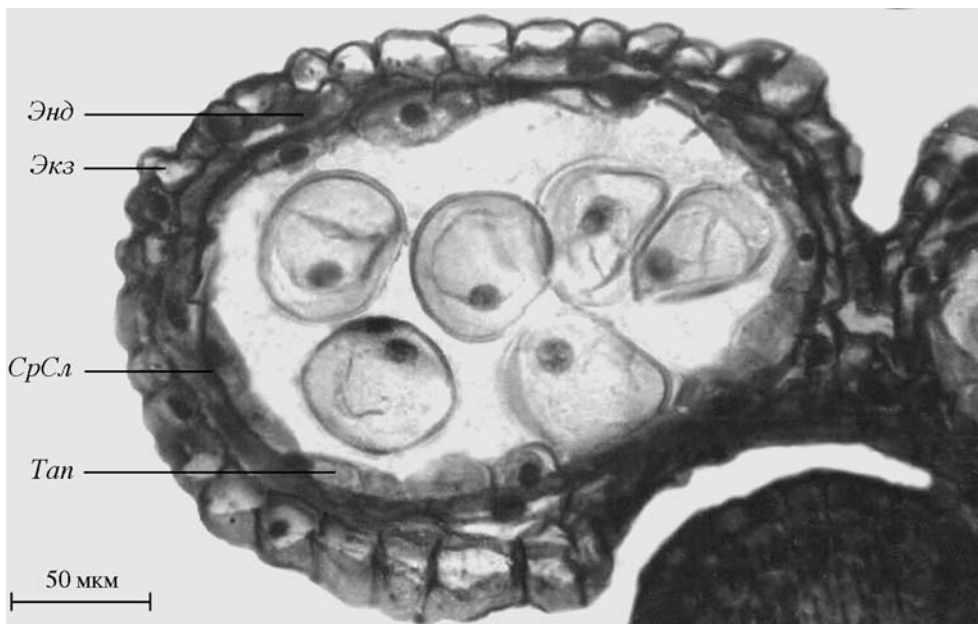


Рис. 16. Строение гнезда пыльника пшеницы линии Фотос после стрессового воздействия холодом

Наблюдается отрыв сильновакуолизированных микроспор от стенки пыльника (СМ)

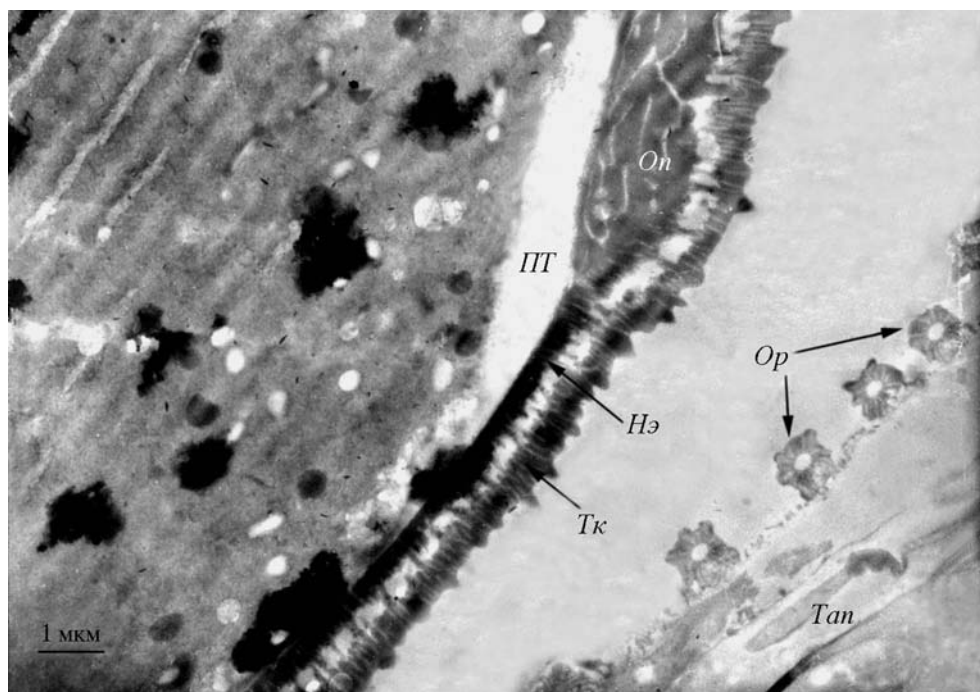


Рис. 17. Фрагмент поверхности микроспоры и клеток тапетума во время стрессового воздействия холодом, иллюстрирующий нарушение контакта между ними (ТЭМ)

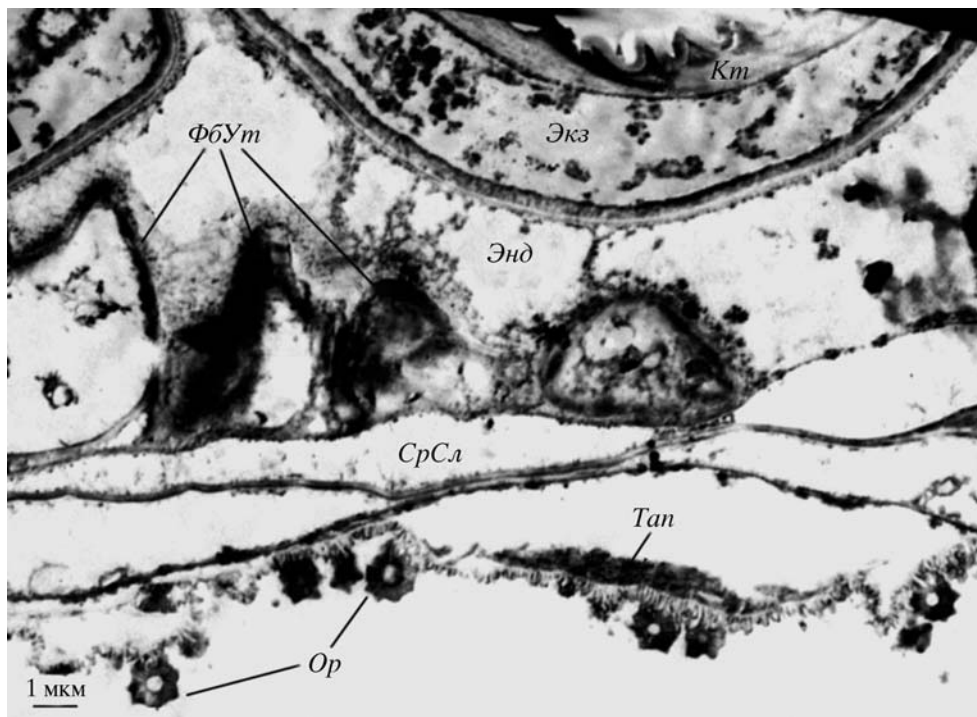


Рис. 18. Фрагмент стенки гнезда пыльника с признаками дегенерации клеток при стрессовом воздействии холодом (ТЭМ)

ляться в соответствии с различными путями морфогенеза (эмбриодогенез или органогенез – через каллусогенез), что зависит от условий культивирования, в первую очередь от гормонального состава питательной среды.

Следует отметить, что нарушение контакта микроспор со стенкой пыльника наблюдается и в естественных условиях, но в отличие от условий *in vitro* приводит к возникновению феномена цитоплазматической мужской стерильности и появлению стерильной пыльцы.

В литературе высказаны противоположные мнения о роли стрессового воздействия на пыльники холодом, индуцирующим спорофитную программу морфогенеза микроспор *in vitro*: холод активизирует дегенерацию микроспор, и именно продукты дегенерации являются индукторами спорофитного пути развития “выживших” микроспор [Wang et al., 2000]; холод приводит к задержке дегенерации микроспор и процессов деструкции клеток стенки пыльника, а индукторами служат компоненты питательной среды [Liang, Fang, 1986]. В настоящей работе **впервые показано, что стрессовое воздействие холодом в выявленном режиме вызывает нарушение морфогенетических корреляций в развитии микроспор и тканей стенки пыльника и, как следствие, – нарушение целостности пыльника как интегрированной системы. Исходя из этого, очевидно, что само стрессовое воздействие холодом (низкие положительные температуры) является возможным триггером (индуктором) спорофитного пути морфогенеза в культуре *in vitro* микроспор, находящихся в критической сильновакуолизированной стадии развития.**

ГЛАВА 6

ГОРМОНАЛЬНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ПУТЕЙ МОРФОГЕНЕЗА МИКРОСПОРЫ ПО СПОРОФИТНОЙ ПРОГРАММЕ *IN VITRO*

Важность включения фитогормонов в состав индукционной питательной среды для культивирования пыльников различных растений показана многими экспериментами [Shimada et al., 1995; Moieni, Sarrafi, 1996; Bai, Qu, 2001; Huang, Wei, 2004; и др.]. Особенно, это касается злаков, относящихся к группе гормонзависимых объектов. Поэтому один из ключевых этапов в работе с культурой *in vitro* пыльников пшеницы заключается в подборе оптимального гормонального состава среды для инокуляции пыльников.

Для культивирования пыльников пшеницы нами была использована среда Potato II [Chuang, Quyang, 1978]. Установлено, что определяющим фактором индукции развития сильновакуолизированных микроспор по спорофитной программе является введение в состав индукционной питательной среды синтетического гормона ауксинового типа действия – 2,4-дихлорфеноксисукусной кислоты (2,4-Д). Важная роль этого ауксина в индукции спорофитной программы морфогенеза пыльника *in vitro* была показана и другими исследователями [Рахимбаев и др., 1992; Носова, 1993; Moieni, Sarrafi, 1996; и др.].

Как правило, выявление оптимальной концентрации гормонов и их соотношения в составе питательной среды для индукции, например, эмбриоидогенеза достигается чисто эмпирическим путем. **Для определения оптимальной концентрации 2,4-Д в составе индукционной питательной среды был разработан оригинальный методический подход** [Горбунова, 1993; Горбунова и др., 2001], основанный на предварительном определении содержания эндогенного ауксина ИУК в пыльниках пшеницы в критической стадии развития в естественных условиях методом твердофазного иммуноферментного анализа [Кудоярова и др., 1986]. На примере коллекции сортов и гибридных линий яровой мягкой пшеницы было установлено, что диапазон искомого содержания экзogenous ауксина 2,4-Д в среде для культивирования определяется содержанием эндогенного ауксина ИУК в пыльниках (табл. 1).

Отмечена следующая тенденция: сортам и гибридным линиям яровой мягкой пшеницы, пыльники которых характеризовались относительно высоким содержанием ИУК, для индукции эмбриоидогенеза *in vitro* требовались относительно невысокие концентрации экзogenous ауксина 2,4-Д в среде, и наоборот.

**Зависимость частоты образования эмбрионов *in vitro*
от содержания эндогенного ауксина ИУК в пыльниках
в критической стадии развития и концентрации
экзогенного ауксина 2,4-Д в индукционной среде**

Сорт, линия	Эндогенное содержание ИУК (в нг/г)	Частота образования эмбрионов (в %), при концентрации 2,4-Д (в мг/л)	
	ИУК	0,25	1,0
Sonalika	502,4 ± 6,4**	82,8	6,2
Фотос	432,1 ± 2,8**	73,1	5,8
Скала	401,2 ± 2,2**	41,6	21,1
Башкирская 4	282,9 ± 3,9**	12,7	8,6
Симбирка	248,6 ± 3,9**	10,8	0,4
Najach	174,1 ± 2,4	31,4	12,5
Линия 35	104,4 ± 1,2*	14,0	71,7
Гибрид 21	93,6 ± 2,8*	9,5	11,9
Московская 35	71,1 ± 1,3	9,8	12,4
Жница	62,9 ± 1,5	1,6	3,8
Ершовская 32	61,7 ± 1,1	0,49	1,6
Саратовская 29	43,8 ± 1,4	0,5	2,12
Линия 38	31,2 ± 2,3**	0	0
Башкирская 9	21,9 ± 3,1**	4,5	13,0

* Значимо на 5%-м уровне; ** значимо на 1%-м уровне.

П р и м е ч а н и е. Частоту образования эмбрионов *in vitro* определяли как отношение количества образовавшихся эмбрионов к общему количеству инокулированных пыльников, %.

Этот вывод подтверждается данными по влиянию концентрации экзогенного ауксина 2,4-Д на индукцию морфогенеза микроспоры по спорофитной программе *in vitro*, ведущей к формированию либо эмбрионов, либо морфогенных каллусов (далее – каллусов) (табл. 2).

Согласно приведенным данным (см. табл. 1, 2), чем выше содержание эндогенного ауксина ИУК в пыльниках в критической стадии развития, тем меньшая концентрация экзогенного ауксина необходима для начала реализации развития микроспор *in vitro* по спорофитной программе. Так, у пшеницы сортов Sonalika, Скала и линии Фотос, характеризующихся повышенным содержанием в пыльниках эндогенного ауксина ИУК, индукция эмбриогенеза отмечена уже при концентрации 0,1 мг/л 2,4-Д в питательной среде.

Разработанный методический подход обеспечивает управление процессом морфогенеза сильновакуолизованных микроспор *in vitro*: строгий подбор концентрации экзогенного ауксина 2,4-Д в индукционной питательной среде, основанный на точной идентификации содержания эндогенных ауксинов в пыльниках конкретного сорта или линии пшеницы в критической стадии развития, позволяет не только направить развитие микроспор по определенному пути морфогенеза (эмбриогенезу или органогенезу), но и добиться регенерации растений нормального строения.

Таблица 2

**Влияние концентрации экзогенного ауксина 2,4-Д на индукцию
путей морфогенеза микростор по спорифигной программе *in vitro***

Сорт, линия	Частота образования эмбриондов и каллусов <i>in vitro</i> (в %) при концентрации 2,4-Д (в мг/л)																	
	0,1		0,25		0,5		1,0		1,5		2,0							
	Э	К	Э	К	Э	К	Э	К	Э	К	Э	К						
Соналіка	151,8	0	82,8	5,8	39,2	11,4	6,2	43,0	0	32,3	0	20,5						
Скала	59,1	0	41,6	0	28,1	14,0	11,1	16,1	0,8	19,3	0	11,1						
Фотос	35,3	0	73,1	0	21,9	8,7	5,8	23,9	0	12,8	0	6,5						
Саратовская 29	0	0	0,5	0	14,3	0	2,12	7,1	2,2	16,8	0	12,1						
Линия 35	0	0	14,2	0	24,5	0	76,1	0	19,1	13,8	0,4	28,3						
Башкирская 4	0	0	12,7	0	5,8	4,2	8,6	3,2	4,2	8,7	0,5	2,8						
Московская 35	0	0	0	0	2,4	1,2	12,5	1,7	3,1	8,6	0	12,6						
Најаш	0	0	24,2	0	16,2	1,4	7,4	15,3	2,1	14,7	0	15,7						

Пр и м е ч и е. Частоту образования эмбриондов (Э) и каллусов (К) *in vitro* определяли как отношение количества образовавшихся структур к общему количеству инокулированных пыльников, %.

Данный подход способствует **ускорению технологии андроклиной гаплоидии**, а также значительному **повышению ее рентабельности** за счет: а) применения сравнительно дешевого и достаточно распространенного препарата – 2,4-Д; б) управления процессом тиражирования регенерантов посредством эмбриоидогенеза как наиболее “экономически выгодного” пути морфогенеза, не требующего многократных процедур пересадок и смены питательных сред. Оба фактора являются весьма существенными при массовом характере генетико-селекционного процесса.

ГЛАВА 7

ЭМБРИОИДОГЕНЕЗ КАК ПУТЬ МОРФОГЕНЕЗА МИКРОСПОРЫ ПО СПОРОФИТНОЙ ПРОГРАММЕ *IN VITRO*

К настоящему времени эмбриоидогенез *in vitro* (в том числе при андроклиной гаплоидии) изучен у многих видов цветковых растений из различных семейств [Plant tissue and cell culture, 1973, 1977; Raghavan, 1976; Experimental embryology..., 1982; Palmer, Keller, 1997; Reynolds, 1997; Heberle-Bors, 1998; и др.]. Однако детальные данные о формировании эмбриоидов – от инициальной клетки до сформированного проростка, особенно о ранних стадиях их развития, остаются малочисленными. Вместе с тем сведения о закономерностях этого процесса в сочетании с данными сравнительного цитоэмбриологического анализа эмбриогенеза необходимы для понимания механизмов морфогенеза эмбриоидов, обеспечивающих формирование нормальных гаплоидных андроклиных регенерантов.

Проведенный сравнительный цитоэмбриологический анализ развития микроспориального эмбриоида *in vitro* и полового зародыша пшеницы сорта Диамант и линии Фотос выявил наличие общих закономерностей в прохождении основных фаз (бластомеризации и органогенеза, по [Батыгина, 1974, 1987]) и стадий их развития наряду с определенной спецификой.

Развитие полового зародыша у пшеницы сорта Диамант осуществляется в соответствии с Graminad-типом эмбриогенеза [Батыгина, 1974, 1987, 1997a], характеризующимся специфическим наклонным положением первых клеточных перегородок в зародыше, возникающим в результате асимметричного неравного деления зиготы и обусловливающим дорсовентральность его строения с самых первых этапов развития.

Фаза бластомеризации. Зигота характеризуется четко выраженной полярностью и дорсовентральным строением. Вследствие этого, а также ее неравномерной вакуолизации фигура первого деления располагается наклонно к продольной оси зиготы и сдвинута к апикальному концу клетки (1 сут после опыления – рис. 19, 1). В результате асимметричного **неравного деления, являющегося следствием полярности и дорсовентральности строения зиготы**, образуются две неравные клетки – *ca* и *cb* (рис. 19, 2, 2a). Вторая перегородка (деление клетки *cb*) также располагается наклонно, обычно в плоскости, перпендикулярной первой перего-

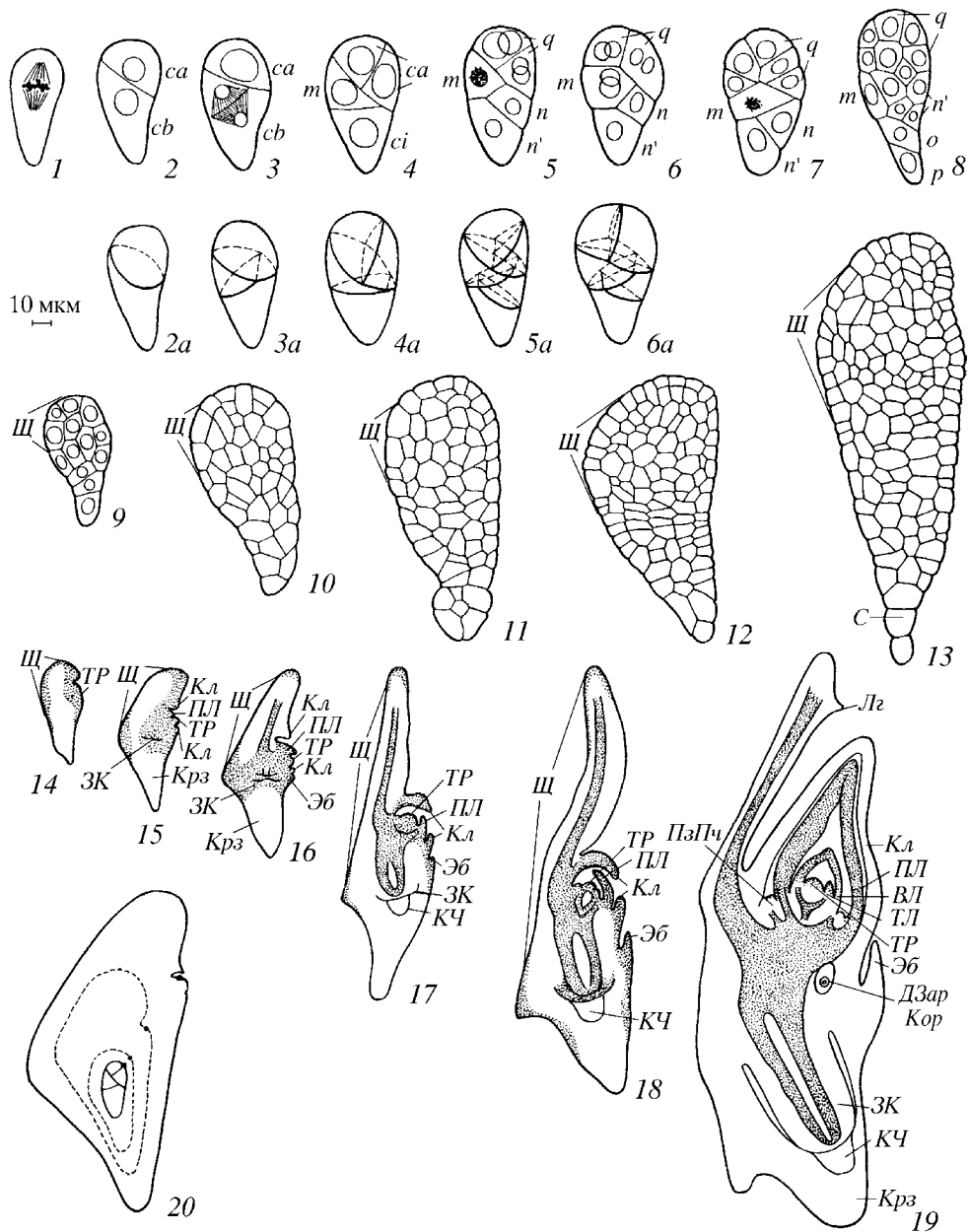


Рис. 19. Развитие зародыша пшеницы сорта Диамант (схематизировано)

1-19 – строение зародыша на продольном срезе в дорсовентральном сечении (на 14-19 точками обозначена зона митотической активности), 2а-6а – объемное изображение зародыша, 20 – схематическое изображение зародыша, иллюстрирующее процесс развития дорсовентральности его строения (по [Батыгина, 1987] с изменениями)

родке (рис. 19, 3, 3a). Такой своеобразный характер заложения первых клеточных перегородок приводит к формированию тетрады клеток особого типа: в билатеральной плоскости она имеет типичное Т-образное строение, однако при просмотре в профиль проявляется ее истинное, дорсовентральное, строение (рис. 19, 4, 4a). В результате серии последующих клеточных делений образуется многоклеточный зародыш с хорошо выраженным суспензором, характеризующийся дорсовентральностью строения и четкой полярной, апикально-базальной, организацией (3–4 сут после опыления – рис. 19, 5–8). Дорсовентральность строения зародыша сохраняется на всем протяжении его дальнейшего развития. Определенную роль в ее становлении играет асимметричность окружающих структур – зародышевого мешка, семязачатка, семени (рис. 20).

Фаза органогенеза. В ходе этой фазы формирования зародыша начинается разрастание его апикально-латеральной области со стороны плацентохалазы вследствие активных клеточных делений, приводящих к образованию семядоли, или щитка; одновременно с этим процессом происходит заложение эпидермы, которое осуществляется в базипетальном направлении (5–6 сут после опыления – рис. 19, 9–13). С противоположной стороны формируется точка роста побега (рис. 19, 14).

В процессе органогенеза в зародыше происходят сложные преобразования, в результате которых щиток смещается из латерального положения в терминальное, а точка роста побега – из терминального в латеральное (7–9 сут после опыления – рис. 19, 11–14). Следующая стадия – увеличение числа митозов в зоне образования точки роста – апекса побега, а также обособление колеоптиля, возникающего как вырост основания щитка. Заложение колеоптиля совпадает по времени с дифференциацией прокамбиального тяжа в зародыше и образованием инициалей меристемы главного зародышевого корня (10–12 сут после опыления – рис. 19, 15, 16). Корень закладывается эндогенно, в базальной части зародыша – в области окончания прокамбиального тяжа, в соответствии с закрытым типом. При этом характерно образование колеоризы, которая возникает как единое образование с чехликом корня.

В ходе последующих стадий развития колеоптиль постепенно приобретает вид конусообразной трубки с отверстием на вершине; наблюдается заложение эпибласта со стороны, противоположной щитку, в виде чешуевидного выроста и зачатка первого листа на апексе побега (13–15 сут после опыления – рис. 19, 16–18).

На поздних стадиях эмбриогенеза наблюдается формирование в апикальной части щитка особого выроста – лигулы (брюшной чешуи), а на его поверхности в области контакта с эндоспермом становится отчетливо дифференцированным особый, эпителиальный, слой, выполняющий функцию абсорбции питательных веществ (гаусториальная функция). На апексе побега происходит последовательное заложение зачатков последующих листьев, а также зачатков нескольких (3–5) адвентивных корней. Начинается обособление колеоризы, сопровождающееся изменениями в структуре клеток суспензора (увеличение их размеров, сильная вакуолизация, деструкция клеток в базальной части суспензора). Эмбриогенез завершается примерно на 29–30 сут после опыления (рис. 19, 19).

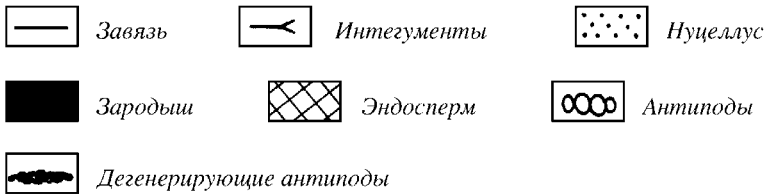
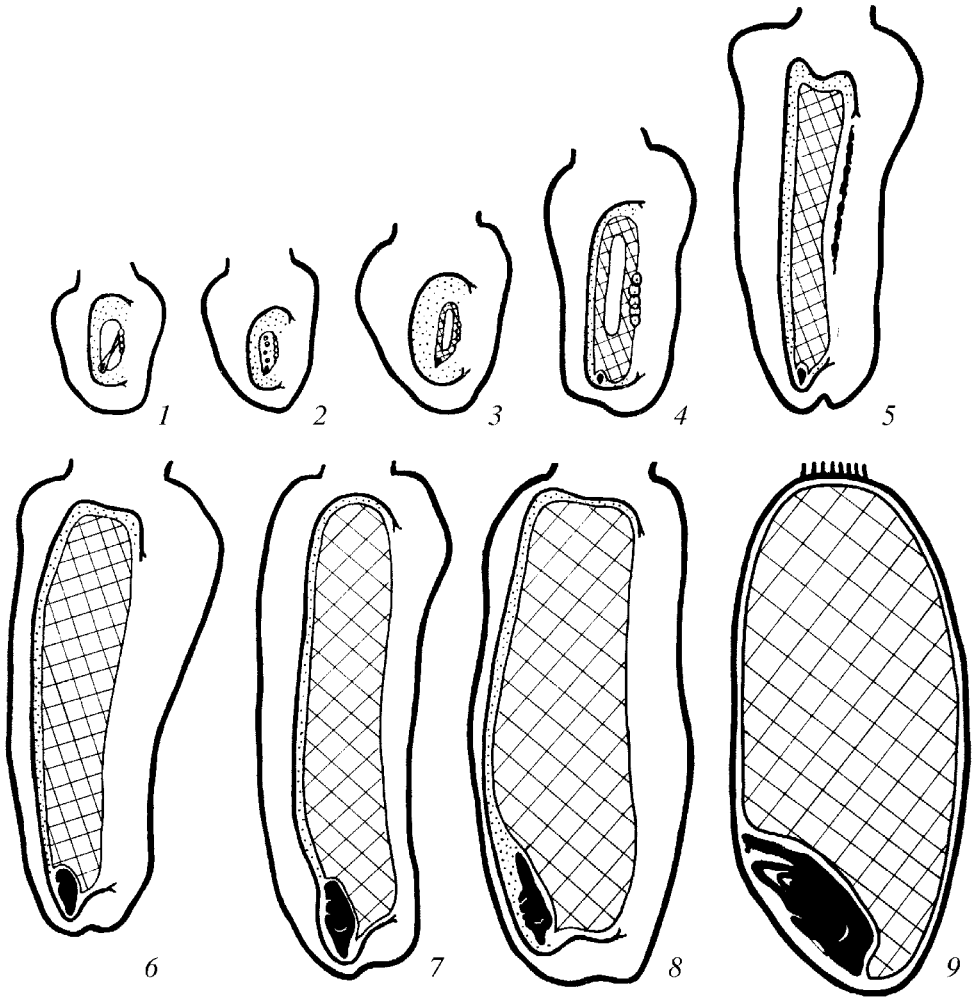
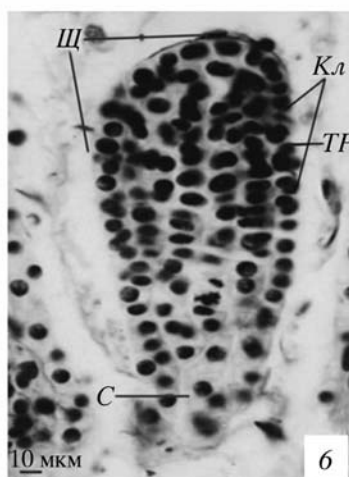
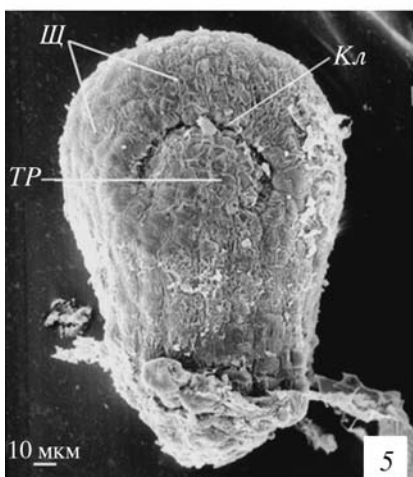
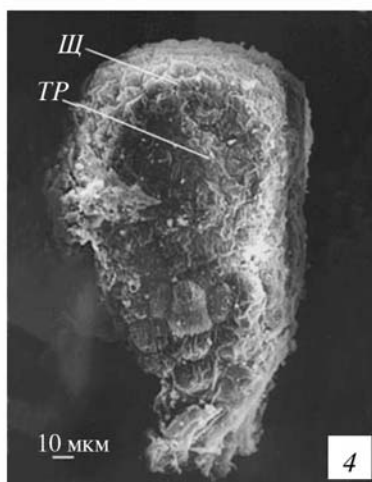
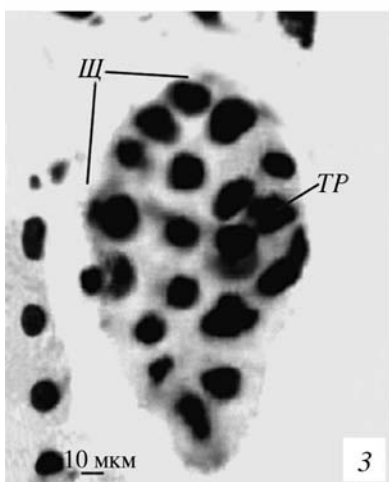
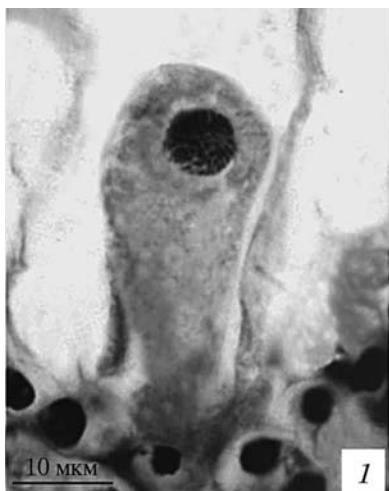


Рис. 20. Последовательные фазы развития зародыша и эндосперма в зерновке пшеницы сорта *Диамант* после опыления

1 – через 5–6 ч, 2 – 1 сут, 3 – 2, 4 – 3–4, 5 – 7–8, 6 – 9–10, 7 – 11–12, 8 – 13–15, 9 – 25–30 сут (по [Батыгина, 1987])



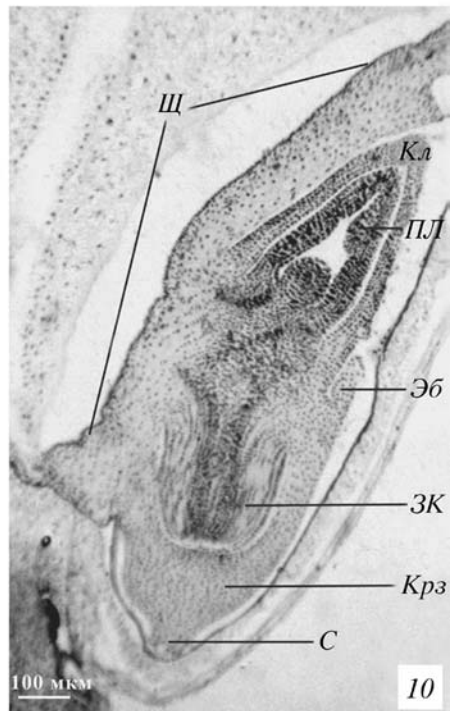
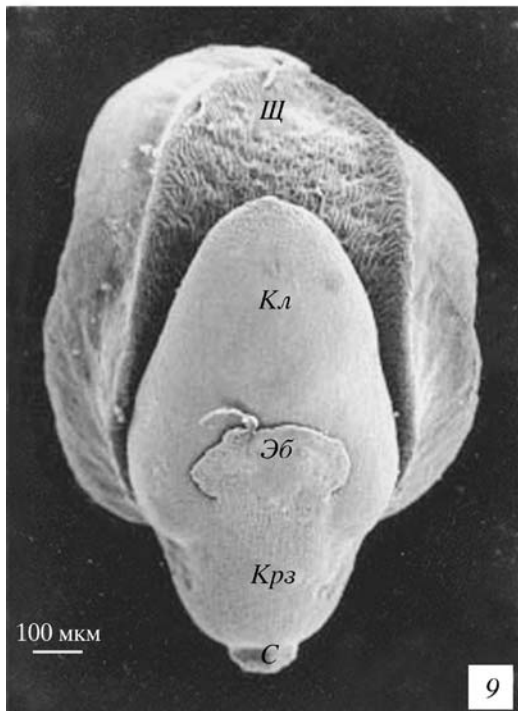
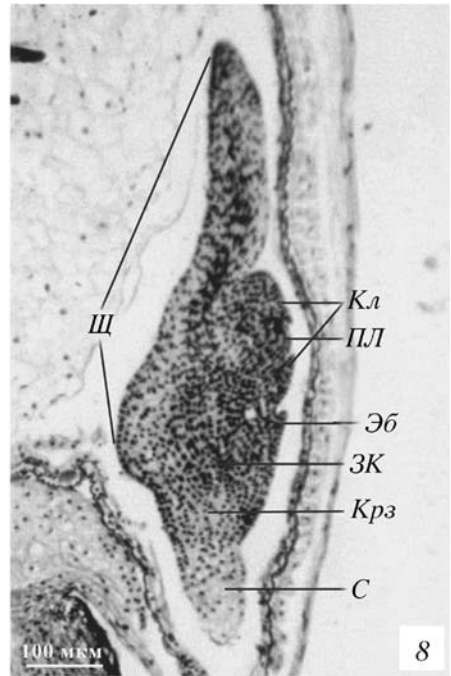
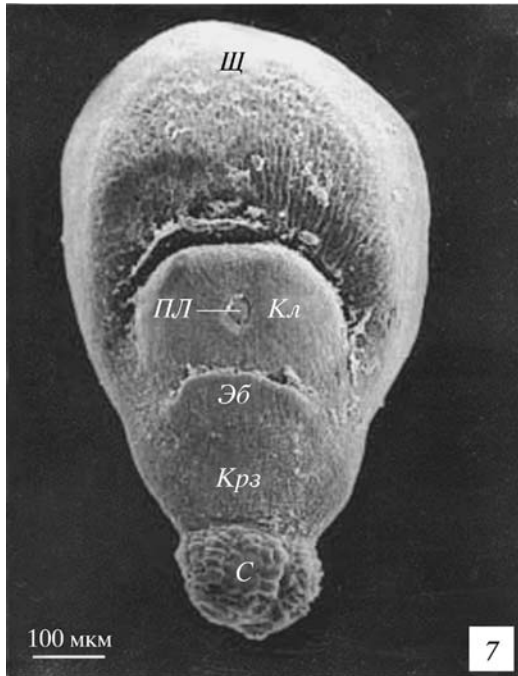


Рис. 21. Развитие зародыша пшеницы линии Фотос

1 – зигота; 2 – многоклеточный зародыш в ходе завершения фазы бластомеризации; 3–8 – последовательные этапы прохождения фазы органогенеза; 9–10 – полностью сформированный зародыш. Объяснения в тексте (1–3, 6, 8, 10 – строение зародыша на продольном срезе в дорсовентральном сечении, СМ; 4, 5, 7, 9 – объемное изображение зародыша, СЭМ)

Развитие полового зародыша пшеницы линии Фотос происходит, как и у сорта Диамант, в соответствии с **Graminad-типом эмбриогенеза**. Прохождение основных фаз и стадий развития – бластомеризации и органогенеза, включая **гистогенную дифференциацию и способ заложения основных органов**, – осуществляется сходным образом и характеризуется развитием **аналогичной дорсовентральной строения зародыша с самых первых этапов**. Некоторые отличия проявляются в сроках заложения органов: у зародыша линии **Фотос** они несколько более ускоренные (как и при развитии пыльника – см. главу 3), чем у сорта Диамант (см. рис. 20). Так, фаза **бластомеризации в зародыше линии Фотоса** происходит в течение первых 3 сут после опыления (рис. 21, 1, 2), фаза **органогенеза** – в ходе следующих 4–29 сут (рис. 21, 3–10). Заложение щитка и апекса побега отмечается на 4–5-е сут после опыления (рис. 21, 3, 4), колеоптиле, примордия первого листа на апексе побега и апикальной меристемы зародышевого корня – на 9–10-е сут (рис. 21, 5, 6), эпибласта и лигулы – на 11–12-е сут (рис. 21, 7, 8), последовательное заложение на апексе побега зачатков следующих четырех листьев и адвентивных корней на 13-, 17-, 21-, 27-е сут после опыления соответственно. Строение полностью сформированного зародыша является аналогичным таковому сорта Диамант (рис. 21, 9, 10).

Развитие эмбриоида. Фаза бластомеризации эмбриоида пшеницы линии Фотос (рис. 22, 1–11) начинается с **аномального симметричного митотического деления инициальной микроспоры (по сравнению с нормальным асимметричным неравным делением зиготы)**. В результате образуются две равные клетки (3 сут от начала культивирования пыльников на индукционной среде – рис. 22, 1–3). При этом процесс деления микроспоры сопровождается постепенной девакуолизацией, осуществляющейся несколько неравномерно (к моменту завершения деления вакуоль может либо полностью исчезать, либо сохраняться, хотя и в меньших размерах). Плоскость деления расположена, как правило, параллельно полярной оси микроспоры в отличие от ее перпендикулярного положения при нормальной, гаметофитной программе развития. Однако нередко отмечалось иное, наклонное, положение плоскости деления относительно полярной оси микроспоры. Несколько следующих делений также, по-видимому, являются равными, в результате чего клетки, образующиеся на первых этапах, имеют, как правило, **сходные размеры и однотипное строение**. Они характеризуются наличием крупных ядер с несколькими ядрышками, плотной цитоплазмой с многочисленными мелкими вакуолями (4–15 сут от начала культивирования пыльников на индукционной среде – рис. 22, 4–7). Это существенно **отличает развитие эмбриоида от полового зародыша, которому с самых первых этапов свойственны полярность организации** (образование вследствие асимметричного митоза двух неравных – апикальной *ca* и базальной *cb* – клеток двуклеточного проэмбрио и становление апикального, побегового, и базального, корневого, полюсов соответственно), а также **дорсовентральность внутреннего строения**. Кроме того, клетки эмбриоида отличаются наличием утолщенных оболочек полисахаридной природы и большого количества крахмала, что также несвойственно половому зародышу. Снаружи эмбриоид окружен общей утолщенной оболочкой,

внутренняя часть которой также образована полисахаридными компонентами, тогда как наружная представляет собой оболочку пыльцевого зерна (рис. 22, 4–7).

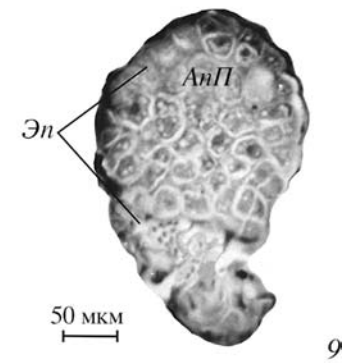
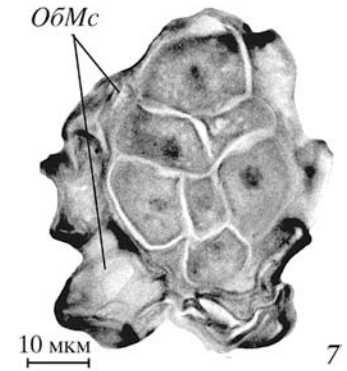
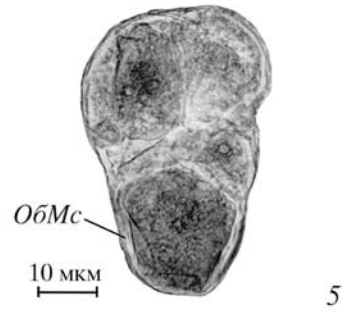
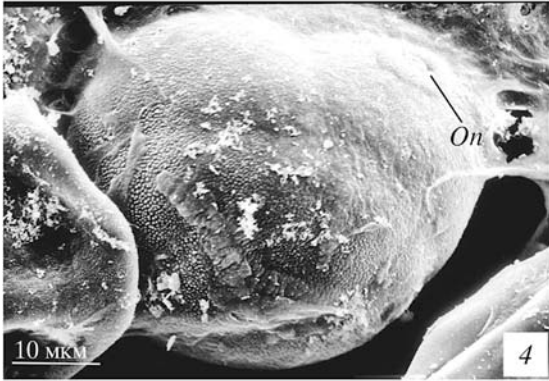
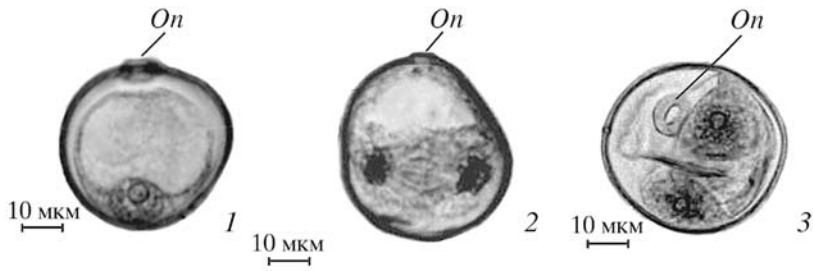
Однако **на более поздних этапах бластомеризации**, по мере формирования **многоклеточного эмбриоида**, наблюдается относительно быстрое **становление его полярности (обособление апикального и базального полюсов) и дорсовентральности**. При этом наблюдается переход от относительно равномерного распределения клеточных делений по всему объему эмбриоида к их концентрации в его апикальной части, которая приобретает шаровидную форму и увеличивается в размерах (рис. 22, 8, 9). Клетки в этой части являются типично меристематическими и по-прежнему содержат большое количество крахмала. Базальная часть становится удлинённой, а ее клетки – более вакуолизированными, при этом количество крахмала в них уменьшается.

В ряде случаев развитие полярности и дорсовентральности строения эмбриоида начинало проследиваться с самых ранних этапов его развития (возможно, в тех случаях, когда плоскость первого деления в микроспоре была расположена наклонно к ее полярной оси). В таких случаях строение раннего эмбриоида было почти идентичным таковому полового зародыша.

Интенсивный рост эмбриоидов приводит к растяжению и разрыву оболочки микроспоры, а затем и стенки пыльника. К моменту выхода на поверхность эмбриоиды, как правило, находятся в процессе завершения фазы бластомеризации (21 сут от начала культивирования пыльников на индукционной среде – рис. 22, 10, 11). С этого момента осуществлялся их перенос на среду для регенерации, составленную по прописи Блейдса [Blaydes, 1966], гормональный компонент которой представлен ИУК и кинетином в концентрации 0,2 мг/л каждый (см. Приложение).

Фаза органогенеза. Как и в половом зародыше, процесс органогенеза в эмбриоиде начинается с заложения щитка и апекса побега (9 сут от начала культивирования пыльников на среде для регенерации, или 30 сут от инокуляции пыльников – рис. 22, 12, 13). Далее в них последовательно осуществляется заложение колеоптиле (рис. 22, 14, 15), примордия первого листа на апексе побега и формирование апикальной меристемы зародышевого корня (10–14 сут от начала культивирования пыльников на среде для регенерации, или 35 сут от инокуляции пыльников – рис. 22, 16, 17), а затем зачатков последующих листьев и адвентивных корней в их основании, обособление эпибласта и колеоризы (15–45 сут от начала культивирования пыльников на среде для регенерации – рис. 22, 18, 19).

Несмотря на специфику прохождения самых ранних этапов фазы бластомеризации (иной характер паттернов первых клеточных делений), последовательность и способ заложения органов в эмбриоиде в целом принципиально не отличаются от такового в зародыше. Заложение щитка происходит в результате разрастания апикально-латеральной части эмбриоида (рис. 22, 12, 13); формирование колеоптиля – выроста основания щитка – осуществляется за счет деления клеток эпидермального и субэпидермального слоев последнего (рис. 22, 14, 15); обособление чехлика корня и колеоризы, формирующегося вначале как единое образование, проявляется на



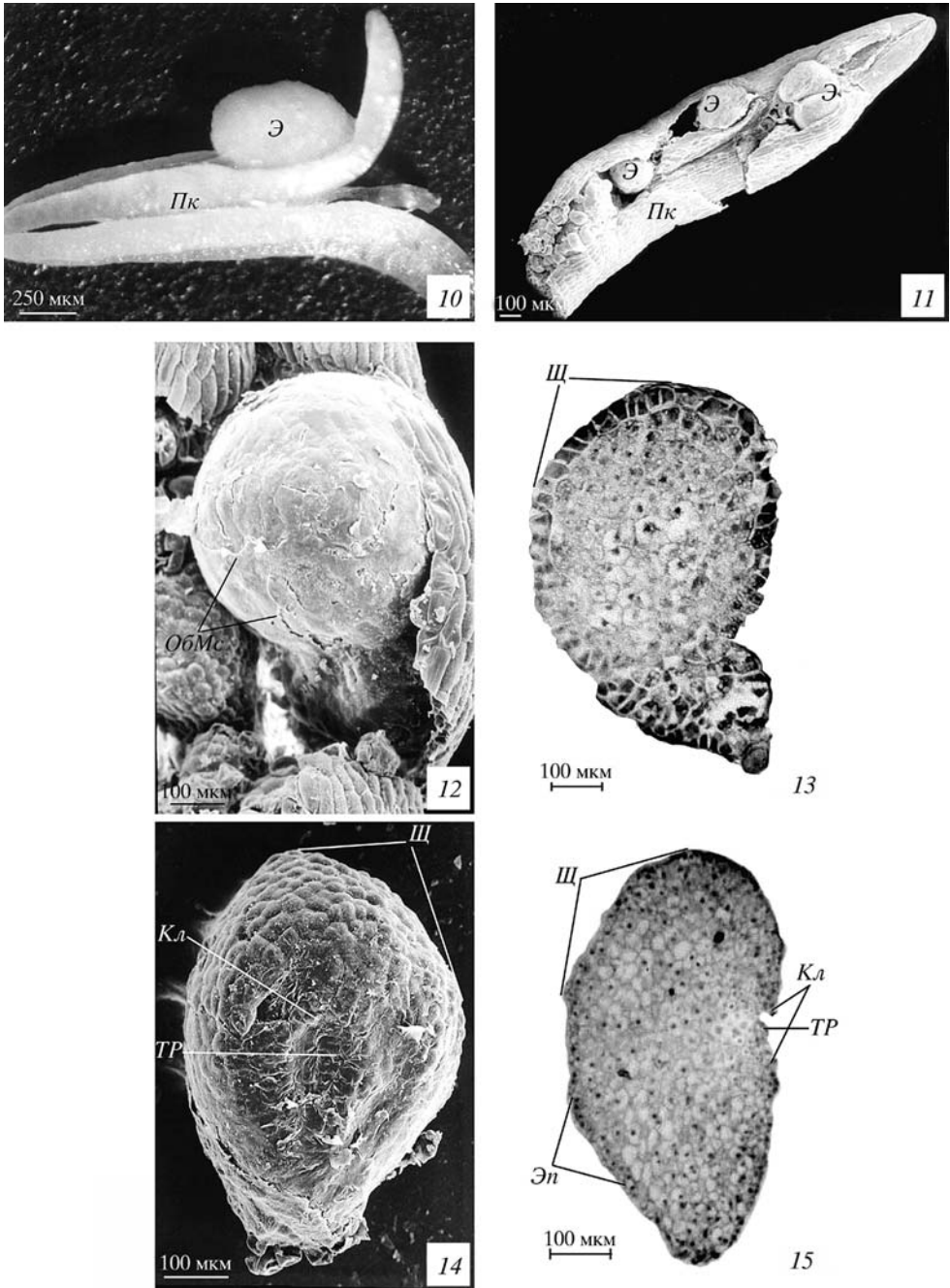


Рис. 22. Развитие эмбриоида пшеницы линии Фотос

1–9 – фаза бластомеризации; 10–11 – выход эмбриоидов в конце фазы бластомеризации на поверхность пыльника; 12–17 – фаза органогенеза; 18–19 – полностью сформированный эмбрионд. Объяснения см. текст (1–3, 5, 7, 9–10, 13, 15, 17, 19 – продольный срез в дорсовентральном сечении, СМ; 4, 6, 8, 11, 12, 14, 16, 18 – объемное изображение эмбриоида, СЭМ; на рис. 8 стрелками указаны границы разрыва оболочки микроспоры, окружающей эмбрионд)

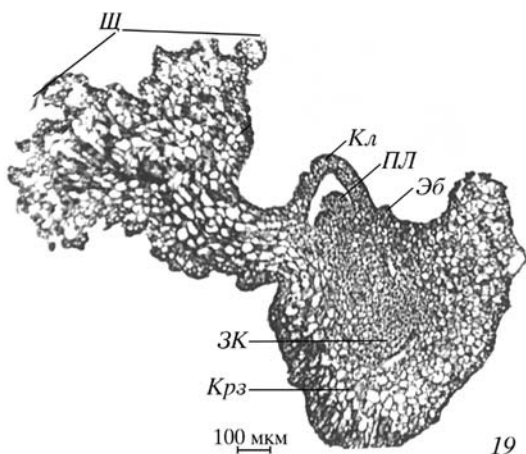
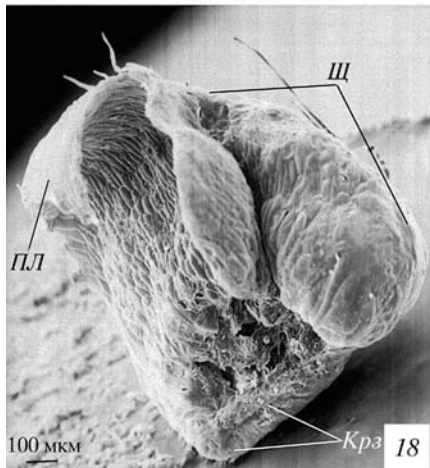
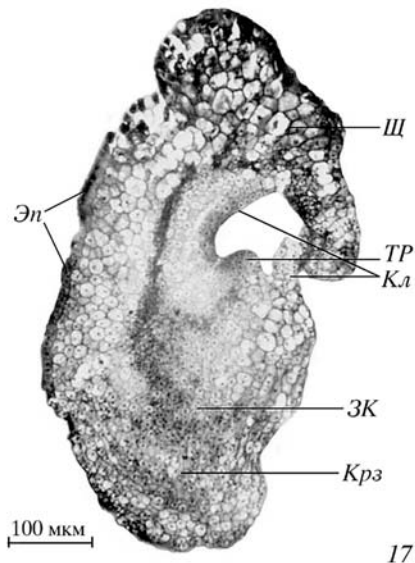
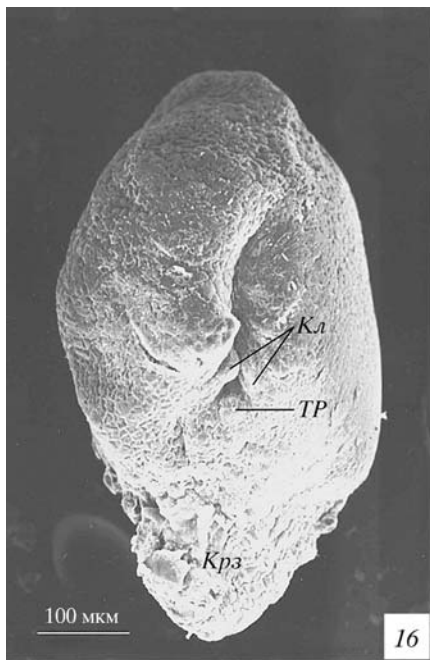
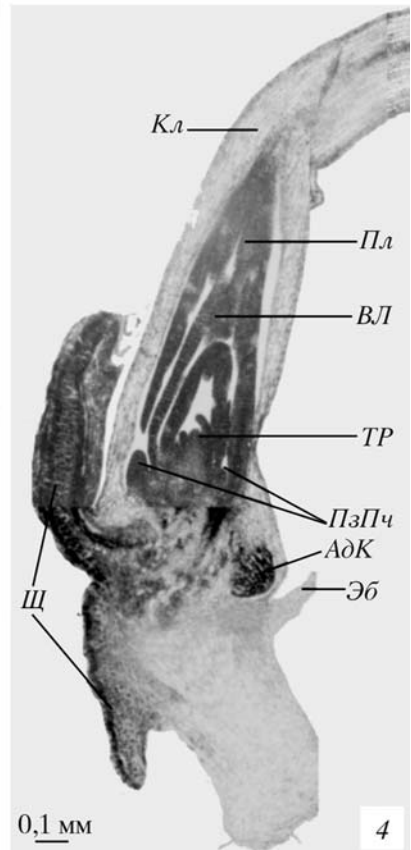
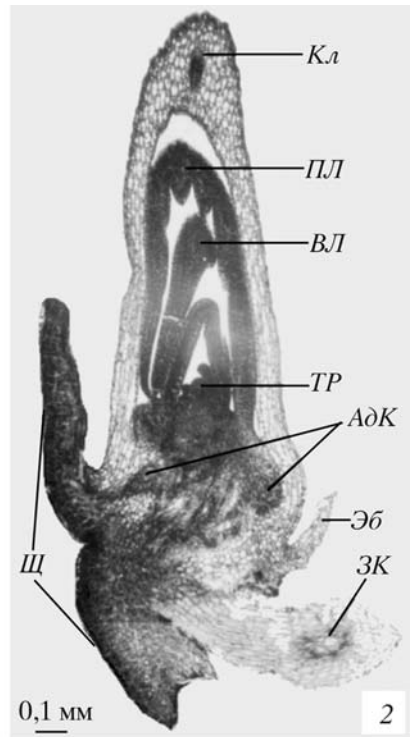
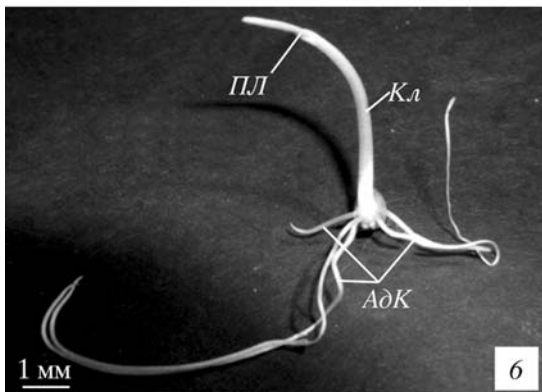
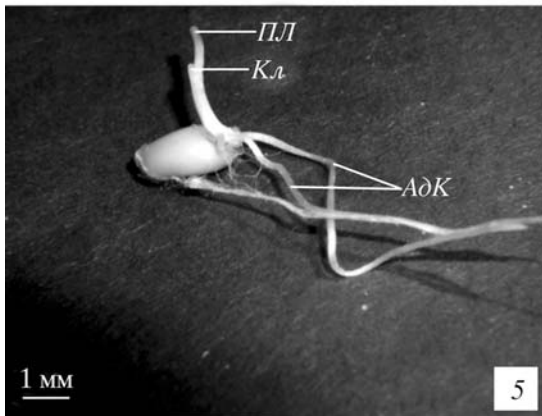
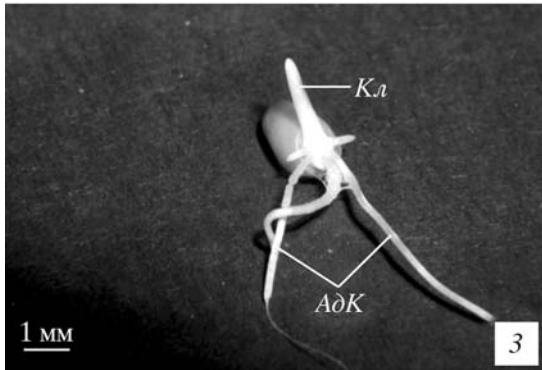
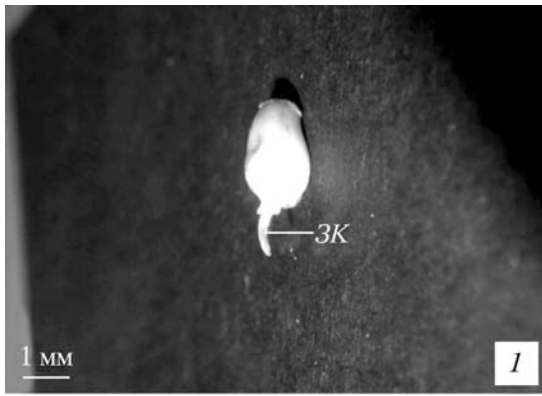


Рис. 22 (окончание)

поздних стадиях развития (рис. 22, 19). Несмотря на отсутствие в эмбриоиде типичного суспензора, в ходе фазы органогенеза поверхностные клетки его базальной части становятся пузыревидными, напоминая клетки суспензора полового зародыша, дифференцирующегося в половом зародыше на ранних этапах фазы бластомеризации.

Рис. 23. Формирование проростка пшеницы линии Фотос

1 – появление первого корня (1 сут); 2 – появление coleoptиле и адвентивных корней (2 сут); 3 – рост coleoptиле и адвентивных корней (4 сут); 4, 5 – появление первого листа (5 сут); 6 – рост первого листа (7 сут) (1, 3, 5, 6 – прижизненная съемка; 2, 4 – СМ)



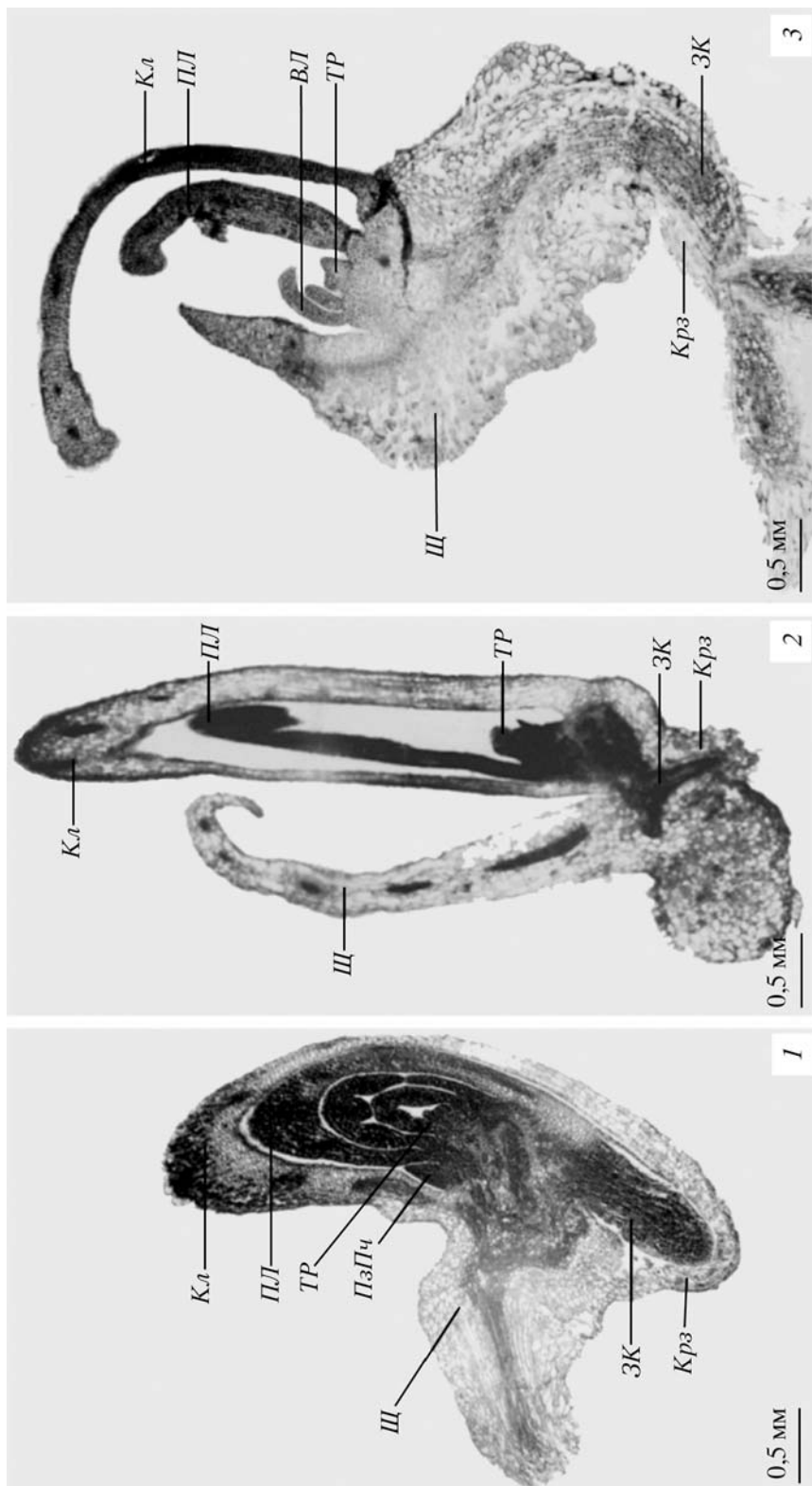


Рис. 24. “Прорастание” сформированного андроклинового эмбриоида пшеницы в среде для регенерации
 1 – 48 сут, 2 – 51 сут, 3 – 53 сут культивирования *in vitro* (1–3 – СМ)

Вместе с тем процесс органогенеза в эмбриоиде нередко проходил с некоторыми отклонениями. В частности, щиток, как правило, имел искаженную – уплощенную или лопастную форму (рис. 22, 18, 19). Отмечены случаи отсутствия эпибласта, колеоптиля, лигулы, образования недоразвитых колеоптилей, запаздывания в развитии зародышевого корня.

Интересен и тот факт, что утолщенные оболочки в клетках эмбриоидов, образующиеся на ранних стадиях, в ходе дальнейшего развития постепенно исчезают, сохраняясь, однако, в клетках протодермы, по всей поверхности. На поздних стадиях они вытягиваются перпендикулярно поверхности, содержат плотную цитоплазму (рис. 22, 17) и приобретают сходство с клетками эпителия щитка полового зародыша, формирующегося лишь в области контакта с эндоспермом. Кроме того, для эмбриоидов является характерным преобладание в клетках всех органов (включая эпидерму) крахмала в отличие от зародышей, клеткам которых свойственно преимущественное накопление белков.

Обращают также внимание различия в размерах эмбриоидов, более крупных по сравнению с зародышами, а также более длительные сроки прохождения ими как отдельных стадий, так и формирования в целом. Например, заложение колеоптиля и зародышевого корня в зародыше осуществляется на 9–11-е сут после опыления, тогда как в эмбриоиде – на 35-е сут от инокуляции пыльников, или на 14-е сут культивирования на среде для регенерации; завершение органогенеза и образование полностью сформированного зародыша происходит на 29-е сут после опыления, эмбриоида – на 44–46-е сут от инокуляции пыльников, или 25-е сут культивирования на среде для регенерации. При этом размеры зародыша и эмбриоида на первой стадии составляют около 200 и 670 мкм, на второй – 1400 и 1950 мкм соответственно.

Полностью сформированный эмбриоид (рис. 22, 18, 19) со всеми типичными для полового зародыша пшеницы органами без прохождения периода покоя развивается в растение-регенерант (“проращение эмбриоида”). Процесс развития регенеранта осуществляется в сходные сроки (7–8 сут) и сходным образом с проращением полового зародыша (ср. рис. 23, 1–6 и рис. 24, 1–3).

Сходство в развитии растения-регенеранта *in vitro* и растения в естественных условиях отмечается и на последующих фенофазах развития. При этом наблюдается сходство как по последовательности прохождения фенофаз (фазы всходов, третьего листа, кущения, выхода в трубку, стеблевания, колошения, цветения, молочной, восковой и полной спелости зерна), так и по их продолжительности (рис. 25, 1–5; 26, 1, 2).

Следует отметить, что извлеченные из пробирок в фенофазе кущения растения-регенеранты проходили цитогенетическое тестирование. Гаплоидные (рис. 27, 1) регенеранты, диплоидизированные смесью 0,2%-ного колхицина и 0,03%-ного папаина (1 : 1), также подвергали цитогенетическому контролю (рис. 27, 2).

Сравнительный цитоэмбриологический анализ позволил выявить определенный параллелизм в развитии полового зародыша в естественных условиях и эмбриоида, образующегося из микроспоры *in vitro* (рис. 28), а

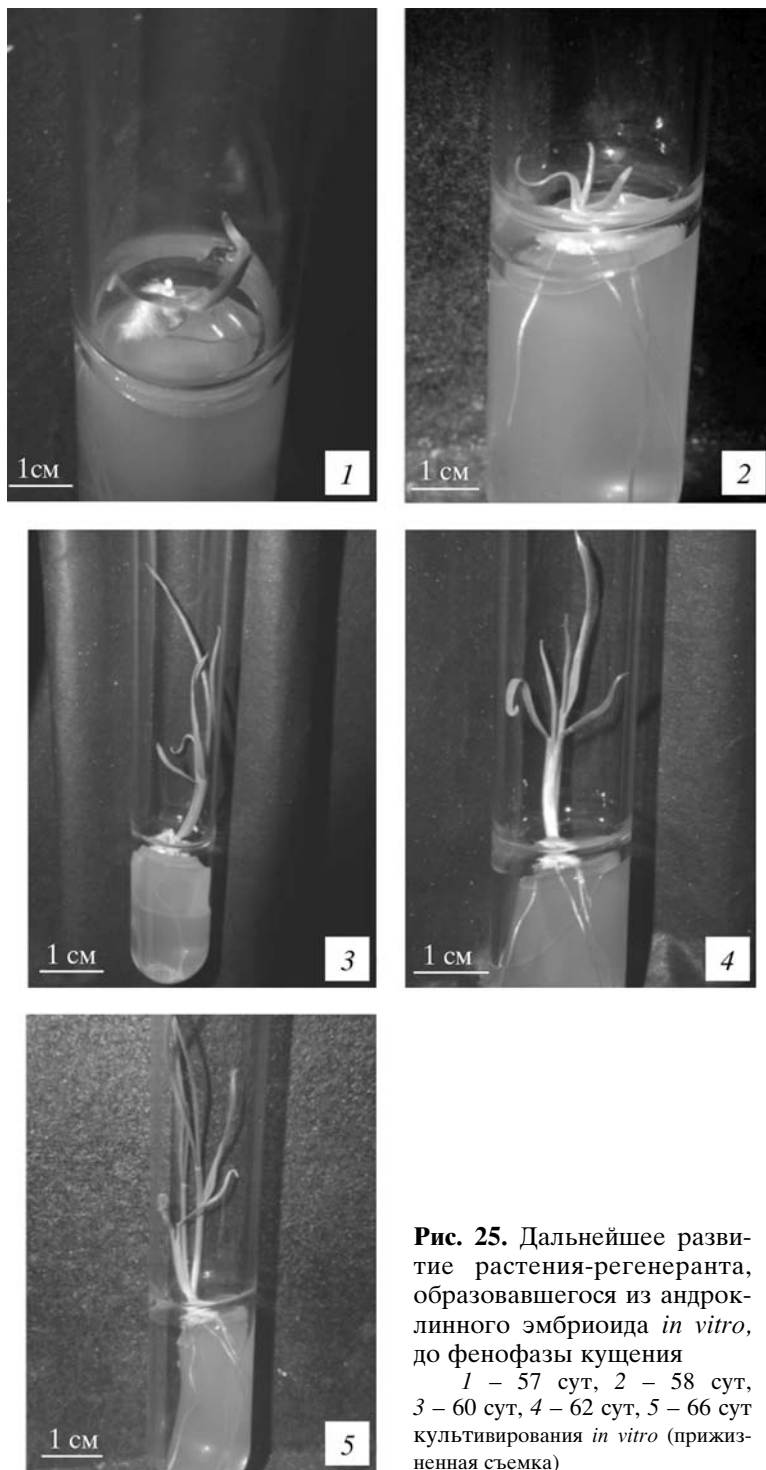


Рис. 25. Дальнейшее развитие растения-регенеранта, образовавшегося из андроклинового эмбриоида *in vitro*, до фенофазы кушения
 1 – 57 сут, 2 – 58 сут, 3 – 60 сут, 4 – 62 сут, 5 – 66 сут
 культивирования *in vitro* (прижизненная съемка)



Рис. 26. Развитие растения-регенеранта, образовавшегося посредством эмбриоидогенеза, в почвенной смеси

1 – растение-регенерант в фенофазе кущения, на 9-е сут размещения в почвенной смеси; 2 – растение-регенерант в фенофазе полной спелости зерна, на 28-е сут размещения в почвенной смеси (прижизненная съемка)

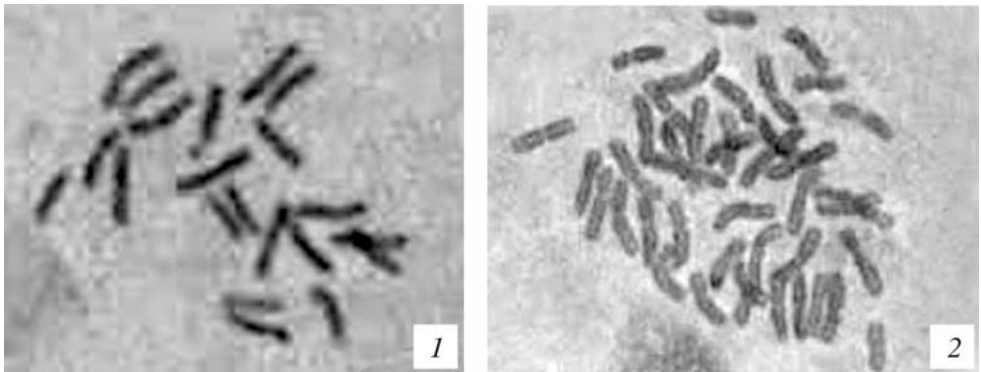


Рис. 27. Метафазная пластинка гаплоидного ($n = 21$) растения-регенеранта, полученного посредством эмбриоидогенеза, до обработки колхицином (1), и дигаплоидного ($n + n = 42$) растения-регенеранта после обработки колхицином (2)

также ряд особенностей эмбриогенного и эмбриоидогенного путей морфогенеза.

Параллелизм развития проявляется в наличии ряда таких общих закономерностей, как становление полярности и дорсовентральности строения, переход к клеточной дифференциации, дискретность развития (инициаль-

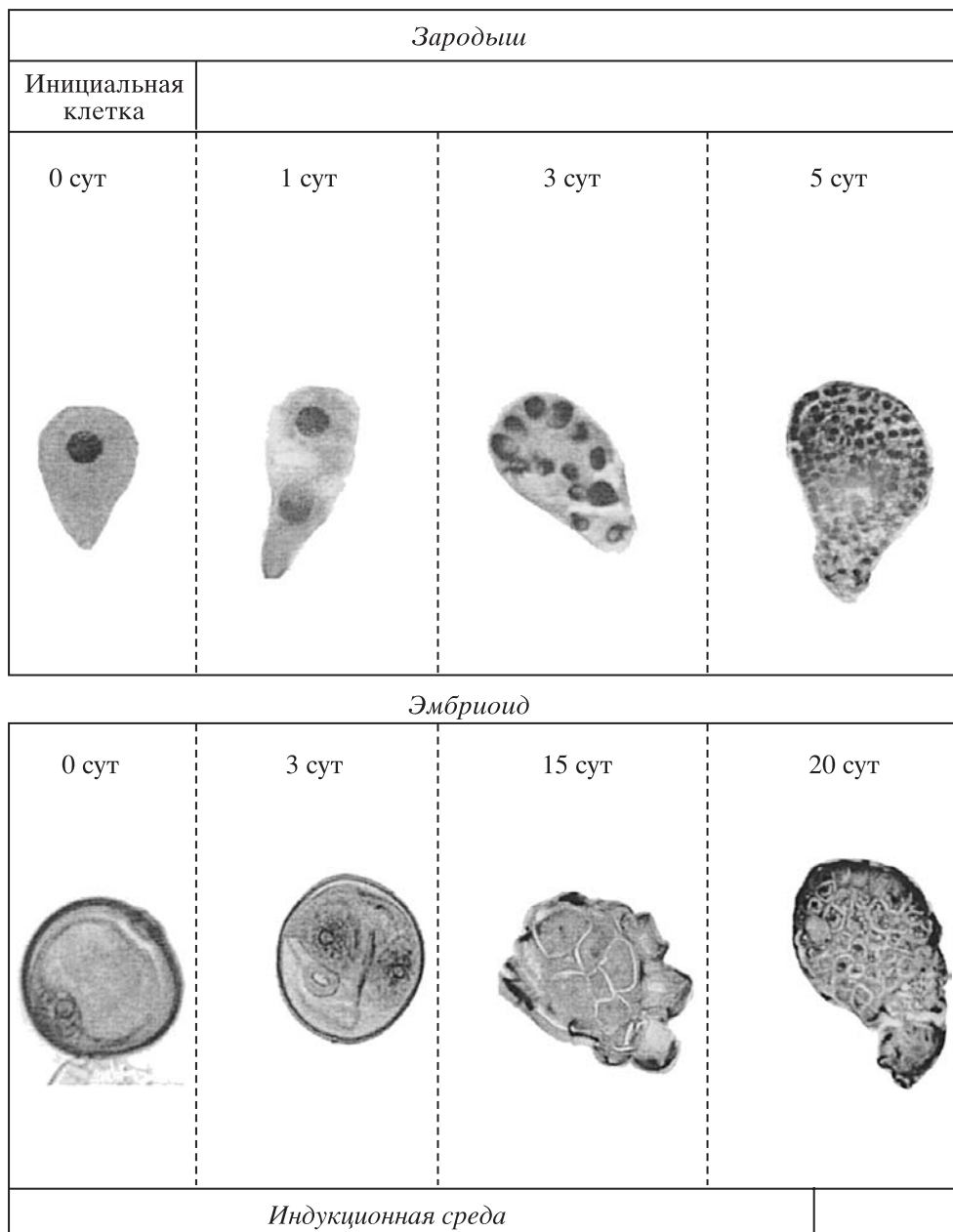


Рис. 28. Сходство и различия в развитии полового зародыша и андроклинного эмбриоида пшеницы линии Фотос

ная клетка – фаза бластомеризации – фаза органогенеза – сформированный зародыш/эмбрионд), **формирование, как правило, идентичных органов и сходство в последовательности и способе их заложения.**

Специфика развития эмбриоида пшеницы линии Фотос по сравнению с половым зародышем состоит: 1) в особом (равном и симметричном) спосо-

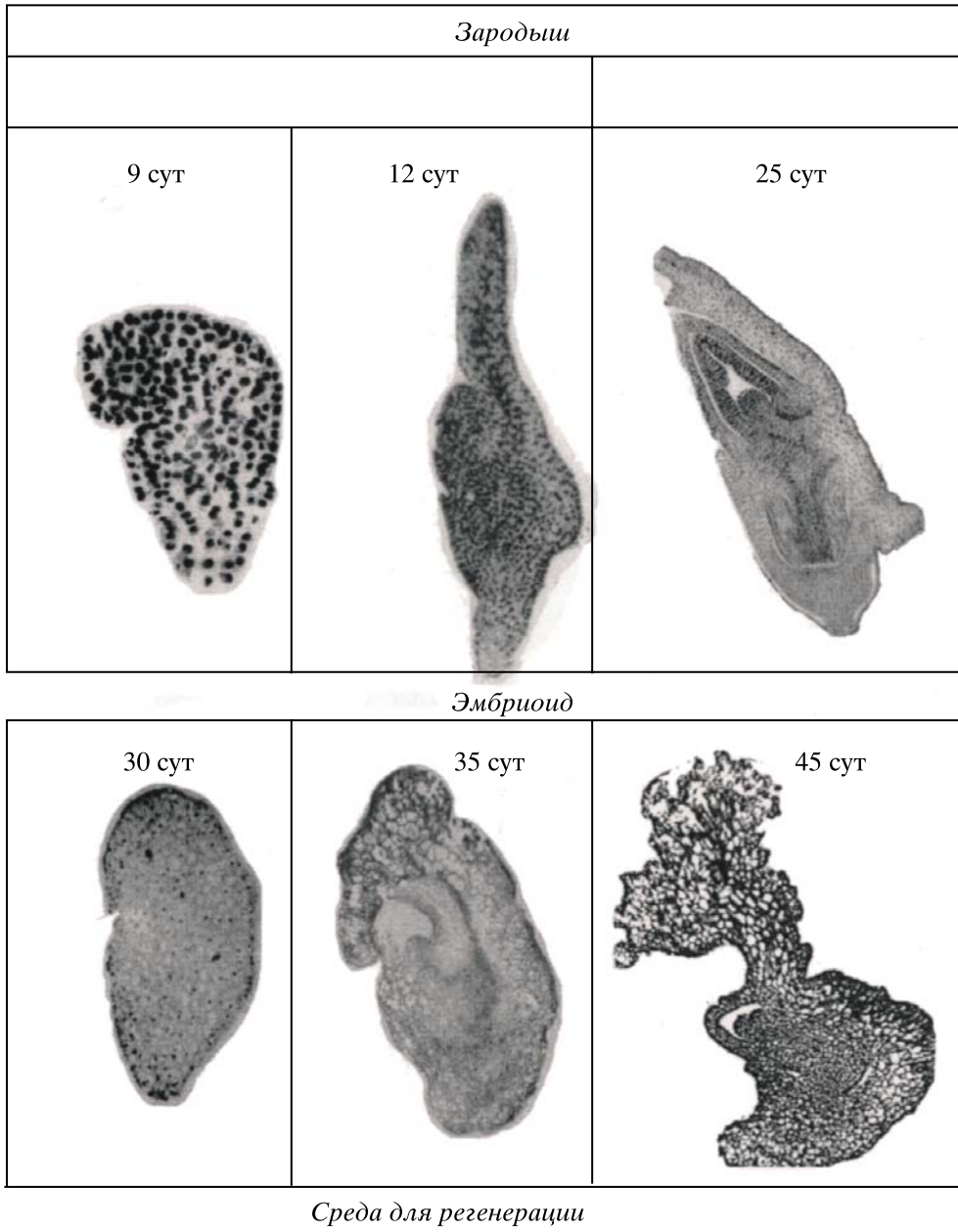


Рис. 28 (окончание)

бе паттернов первых клеточных делений в ходе фазы бластомеризации и относительно более позднем становлении полярности и дорсовентральности строения; 2) частых отклонениях в форме щитка эмбриоида и некоторых других органов, в частности колеоптиле; 3) топографии специализированного эпидермального слоя (по всей поверхности, а не только щитка, как у полового зародыша); 4) типе запасных веществ (крахмала, а не белков,

своих зародышу) и времени их появления в клетках (с первых этапов развития, а не в процессе органогенеза); **5) его размерах** (относительно больших) и **сроках развития** (более длительных). Такая специфика развития, проявляющаяся в различных алгоритмах морфогенеза на определенных этапах эмбрио- и эмбриоидогенеза, очевидно, обусловлена как различными происхождением и способом образования нового индивидуума, так и воздействием факторов культуральной среды.

ГЛАВА 8

ОРГАНОГЕНЕЗ (ГЕММОРИЗОГЕНЕЗ) КАК ПУТЬ МОРФОГЕНЕЗА МИКРОСПОРЫ ПШЕНИЦЫ ПО СПОРОФИТНОЙ ПРОГРАММЕ *IN VITRO*

Регенерация гаплоидных растений посредством гемморизогенеза проходит через стадию образования каллуса. Отмечено значительное морфологическое разнообразие каллусов, среди которых выделяют **два основных типа: морфогенные и неморфогенные**, характеризующиеся различными морфогенетическими потенциями и регенерационными способностями. Эти типы каллуса, как правило, различаются окраской, структурой и консистенцией (плотные, рыхлые). Перечисленные выше признаки могут меняться в процессе генезиса, что в значительной степени зависит от происхождения исходных эксплантов и условий культивирования. В условиях выполненного нами эксперимента обнаружены оба типа каллуса (рис. 29, 1, 2). **Разработанный способ гормональной регуляции путей морфогенеза микроспоры *in vitro* (см. главу 6) позволяет получать и использовать в экспериментальной работе только морфогенные каллусы.**

Поскольку процесс гистогенеза связан с образованием каллуса, важное значение имеет выявление этапов развития последнего. Полученные в настоящей работе данные **позволяют выделить определенные этапы развития морфогенного каллуса**, образующегося *in vitro* из сильновакуолизированной микроспоры. Однако следует отметить, что вопрос о периодизации развития каллуса является сложным и требует корректной идентификации его инициальных клеток и их дериватов.

Формирование каллуса начинается с деления сильновакуолизированной микроспоры (образуются две клетки), осуществляющегося, по-видимому, как и при формировании эмбриоида, посредством симметричного митоза. При этом происходит процесс реорганизации микроспоры – ее девакуолизация (5 сут от начала культивирования пыльников на индукционной среде – рис. 30, 1, 2).

Следующий этап формирования каллуса происходит еще в пределах оболочки микроспоры. Каллус становится многоклеточным (10–15 клеток) в результате дальнейших, также относительно равных митотических делений. Образуется система клеток сходного размера и строения (7–10 сут от начала культивирования пыльников на индукционной среде – рис. 30, 3). Клетки такого каллуса меристематические, содержат крупные ядра в цент-

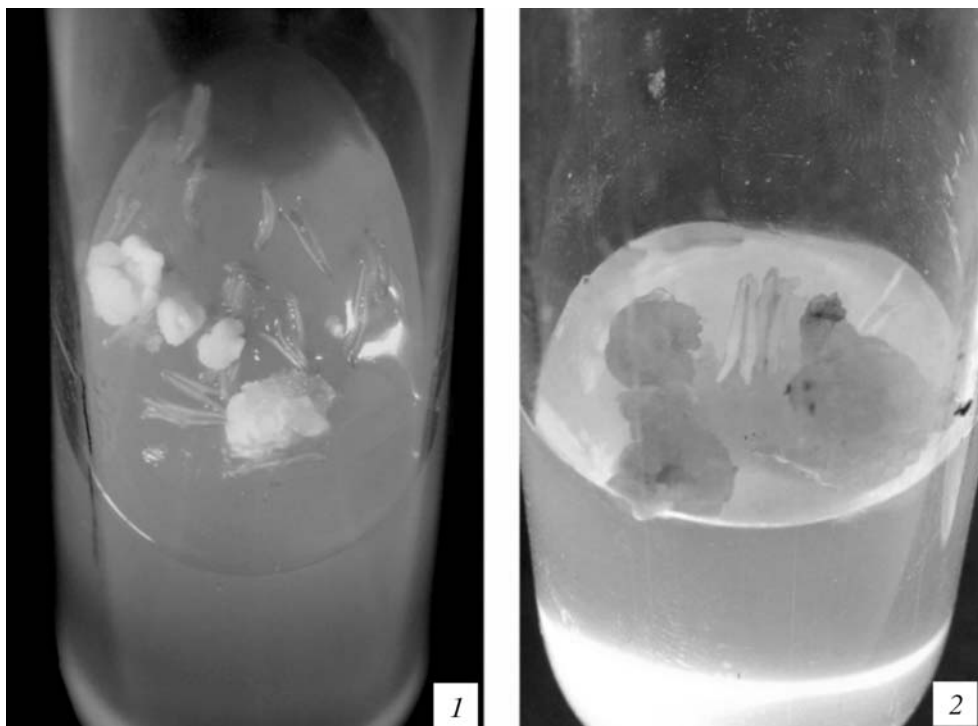


Рис. 29. Общий вид морфогенного (1) и неморфогенного (2) каллусов пшеницы линии Фотос (прижизненная съемка)

ральном положении и плотную цитоплазму. Характерным отличием клеток каллуса по сравнению с клетками эмбриоидов является отсутствие в них хорошо развитых утолщений оболочек полисахаридной природы и крахмала. Клетки поверхностного слоя каллуса на этой стадии развития, ограниченные окружающей оболочкой микроспоры, относительно ровные и расположены компактно.

Продолжающийся рост каллуса вследствие пролиферации его клеток приводит к разрыву оболочки микроспоры, а затем и стенки пыльника (10–32 сут от начала культивирования пыльников на индукционной среде – рис. 30, 4–8). В результате роста каллуса, уже не ограничиваемого оболочкой микроспоры, происходит изменение его формы, которая становится шаровидной, продолговатой или неправильной. К моменту прорыва стенки пыльника и выхода каллуса на поверхность начинается переход к процессу гистогенеза: наблюдается становление зональности строения каллуса и гетерогенности его клеток по форме, размерам и строению (рис. 30, 6–8). Происходит выделение **центральной зоны**, относительно мелкие клетки которой сохраняют меристематическую активность и находятся в состоянии пролиферации, и **периферической зоны**, клетки которой становятся более крупными, рыхло расположенными и разнообразными по форме (выпуклые, пузыревидные, изогнуто-цилиндрические и т.п.). При этом они в значительной степени вакуолизируются и утрачивают меристематическую ак-

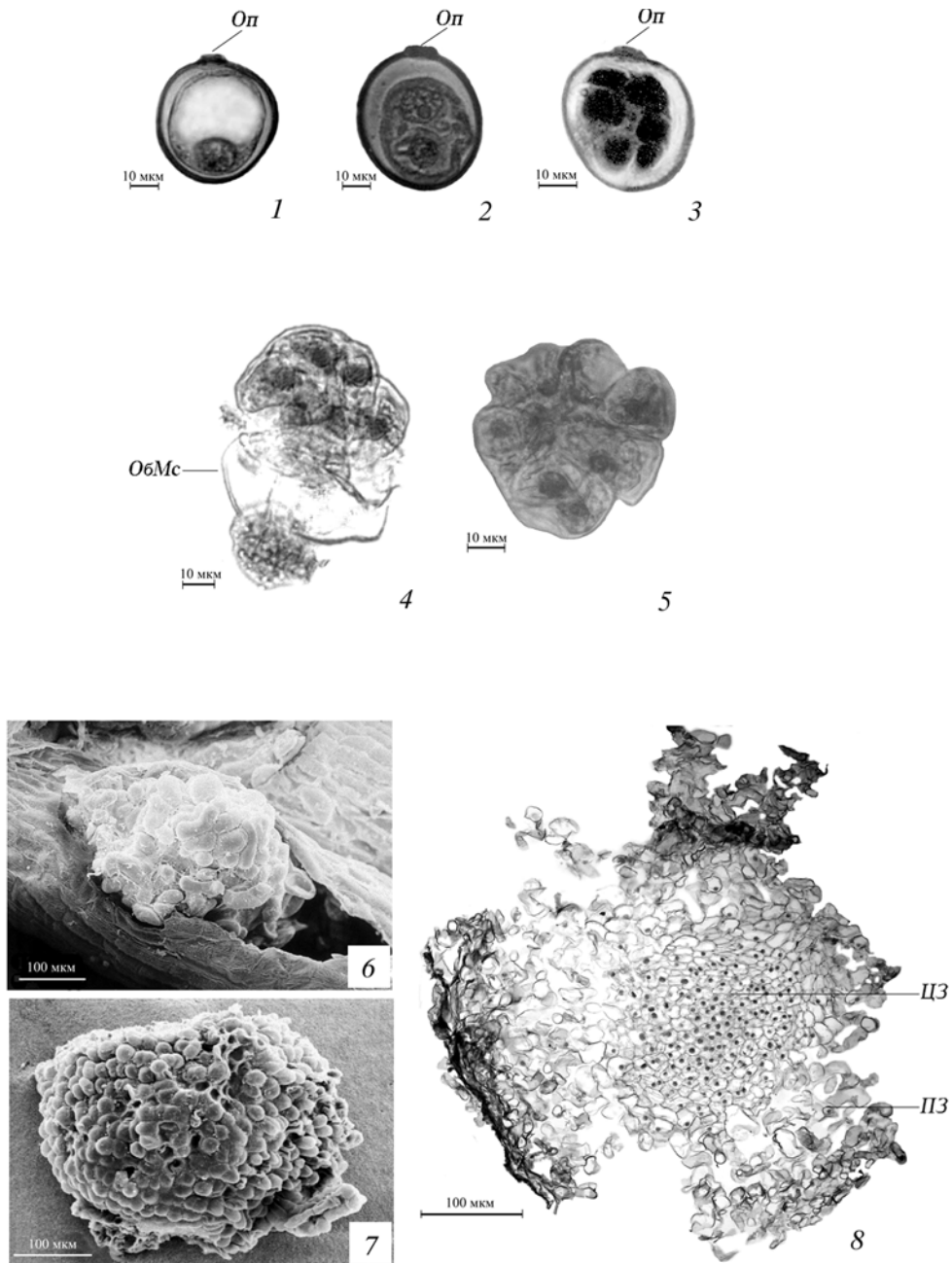


Рис. 30. Последовательные стадии развития морфогенного каллуса пшеницы линии Фотос из сильновакуолизированной микроспоры по пути гемморизогенеза
 Объяснения см. текст (1-5, 8, 10-19 – СМ; 6, 7, 9 – СЭМ)

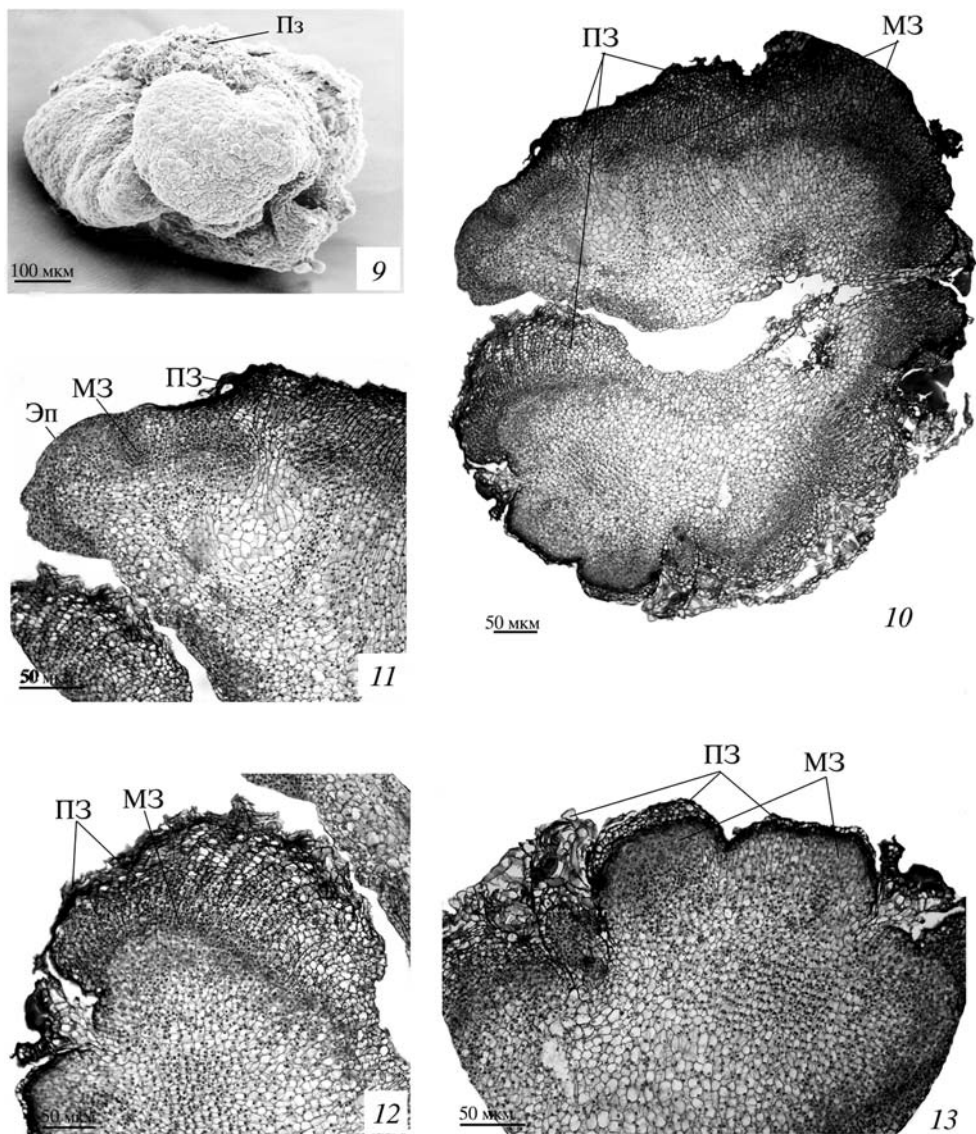


Рис. 30 (продолжение)

тивность. К моменту выхода на поверхность пыльника каллусы имеют вид плотной необводненной структуры узловой формы, матового белого цвета. В таком состоянии каллусы (как и эмбриониды) переносили на среду для регенерации, а именно – среду Блейдса [Blaydes, 1966] (см. Приложение), гормональный компонент которой, представленный ИУК (0,2 мг/л) и кинетином (0,2 мг/л), является оптимальным для развития каллуса по пути гемморизогенеза, т.е. формирования почки и корня.

В ходе дальнейшего развития (1–23 сут от начала культивирования пыльников на среде для регенерации, или 55 сут от инокуляции пыльников) проис-

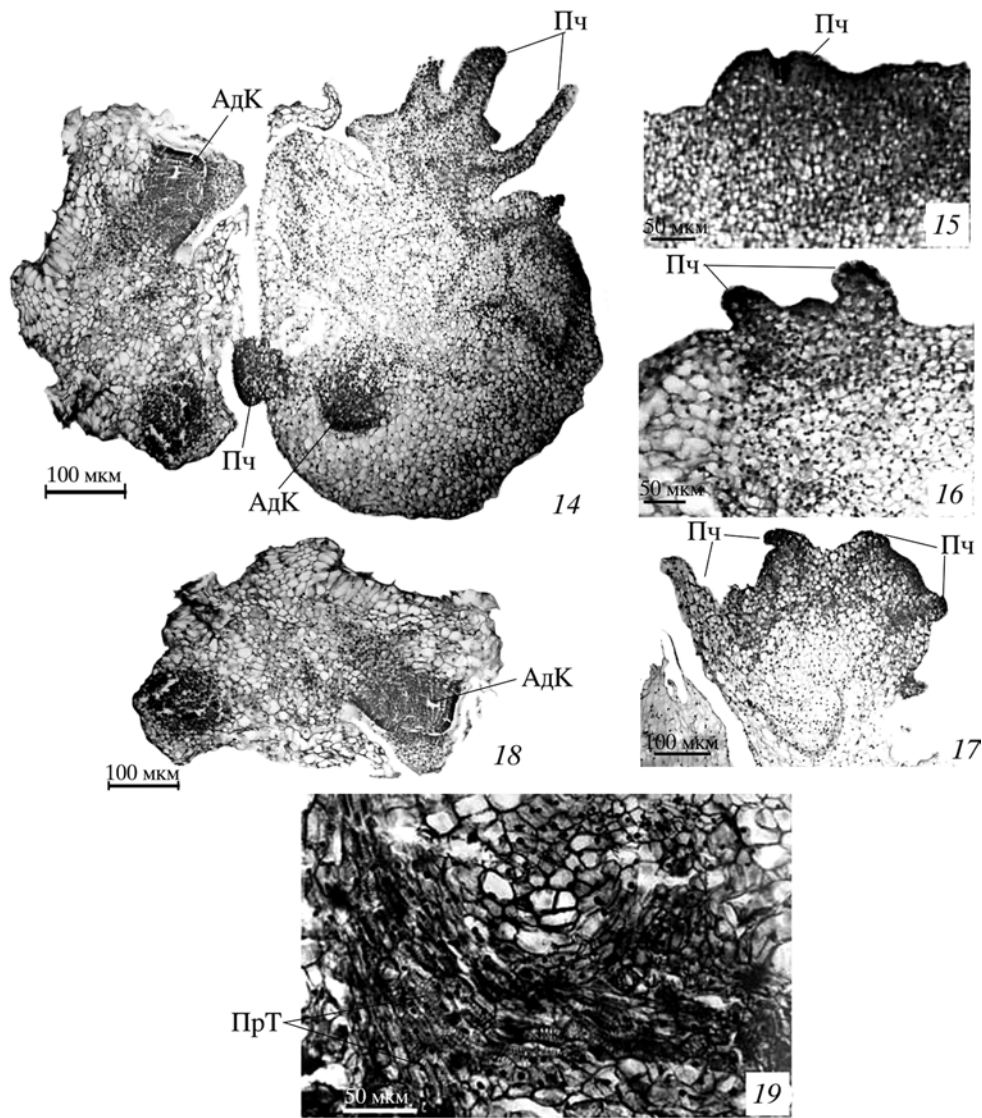


Рис. 30 (окончание)

ходит, как правило, существенное увеличение размеров каллуса, усложнение его организации и переход к процессам органогенеза (рис. 30, 9–19).

Клетки рыхлой периферической зоны подвергаются постепенной деструкции и почти полностью исчезают (следы разрушающихся клеток некоторое время сохраняются на поверхности каллуса в виде гомогенного, интенсивно окрашивающегося слоя полисахаридной природы). Под дегенерирующей периферической зоной наблюдается оформление эпидермального слоя, параллельно поверхности которого начинается дифференциация особой меристематической зоны, представленной 7–12 слоями клеток табличатой формы, сходных по строению с клетками прокамбия (рис. 30, 11, 12).

С деятельностью клеток этой меристематической зоны связаны интенсивное нарастание массы каллуса, приводящее к многочисленным инвагинациям его поверхности (рис. 30, 13), а также последующие процессы органогенеза.

Морфогенез в каллусе, полученном в культуре *in vitro* пыльников, как и в любом другом каллусе, может осуществляться различными путями: **гистогенеза** (формирование тканей, не приводящее к регенерации растений); **органогенеза по типу ризогенеза** (формирование корня), **геммогенеза** (формирование почки) и **гемморизогенеза** (формирование почки и корня); **эмбриогенеза** (формирование эмбриоидов). **Все отмеченные пути морфогенеза обнаружены при культивировании каллусов пшеницы.** Однако в условиях осуществленного эксперимента **основным путем морфогенеза, приводящим к образованию полноценных гаплоидных регенерантов (без процедуры многократных пересадок на питательные среды различного состава) являлся только органогенез по типу гемморизогенеза.**

Гемморизогенез, как правило, начинается с заложения на поверхности каллуса меристематических очагов, деятельность которых приводит к образованию апексов побега с зачатками листьев, т.е. почек (рис. 30, 14–17, на дет. 15–17 видны последовательные стадии их развития, а также образование из них в отдельных случаях множественных, фасцированных побегов). Как правило, через 3–4 сут после их появления наблюдается заложение апексов корня, которое, по-видимому, осуществляется независимо от почек, чаще в базальной и средней части каллуса (рис. 30, 14, 18). По мере развития почек и корней обычно наблюдается установление между ними связи посредством формирования элементов сосудистой системы (рис. 30, 19).

Процесс развития растения-регенеранта, полученного посредством гемморизогенеза – от заложения почек и корней до кущения – занимает в среднем 40–45 сут на среде для регенерации (77–80 сут от инокуляции пыльников) и в целом соответствует фазам развития растений пшеницы в естественных условиях (рис. 31, 1–6).

В фенофазе кущения растения-регенеранты извлекали из пробирок и проводили их цитогенетическое тестирование. Гаплоидные (рис. 32, 1) регенеранты диплоидизировали смесью 0,2%-ного колхицина и 0,03%-ного папаина (1 : 1). После цитогенетического контроля дигаплоидные (рис. 32, 2) растения пересаживали в почву. Дальнейшее развитие растений-регенерантов также шло согласно фазам развития, свойственным растениям пшеницы в норме, и завершалось фенофазой полной спелости зерна (рис. 33).

Ризогенез на основе возникающих в каллусе меристематических очагов клеток, дающих начало формированию корней, и осуществляющийся таким же образом, как и при гемморизогенезе (рис. 34, 1–3), как правило, не сопровождался образованием почек и соответственно не приводил к образованию растений-регенерантов.

Следует отметить, что наряду с индукцией каллусогенеза с его последующим переходом на гемморизогенный и ризогенный пути морфогенеза, на среде, содержащей ИУК и кинетин в использованных концентрациях, было также обнаружено частое формирование эмбриоидов (**эмбриоидогенный путь морфогенеза**). Однако развитие эмбриоидов при данном соотношении гормонов в среде протекало с отклонениями, проявляющимися в их переходе к полиэмбриоинии особого типа (прямой вторичный эмбриоидогенез) –

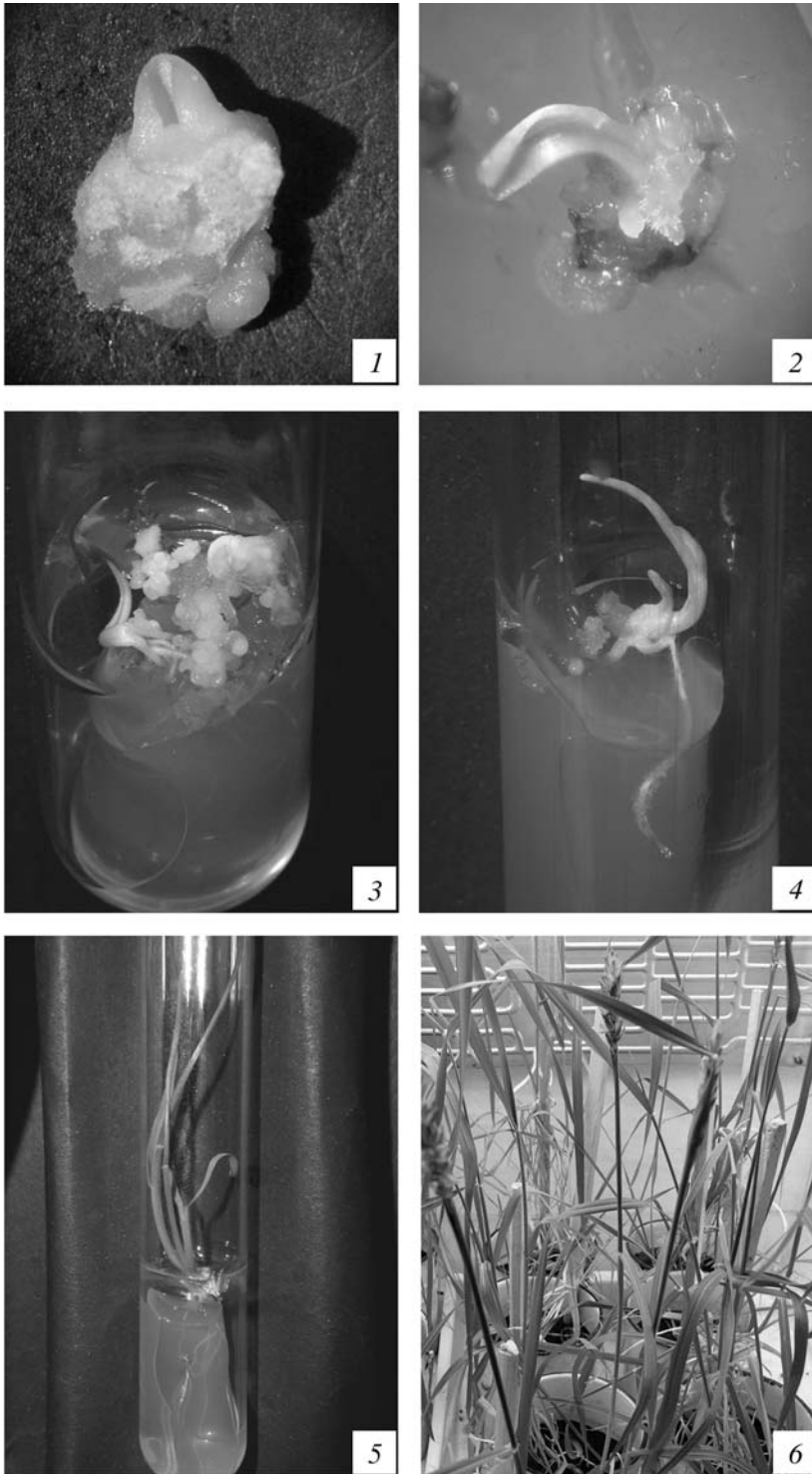


Рис. 31. Развитие растения-регенеранта пшеницы линии Фотос, полученного путем гемморизогенеза

1–2 – формирование первого листа на апексе побега (1) и появление адвентивных корней (2); 3–6 – регенерант в фазе 3-го листа (3–4), кущения (5) и молочной спелости (6) (1–6 – прижизненная съемка)

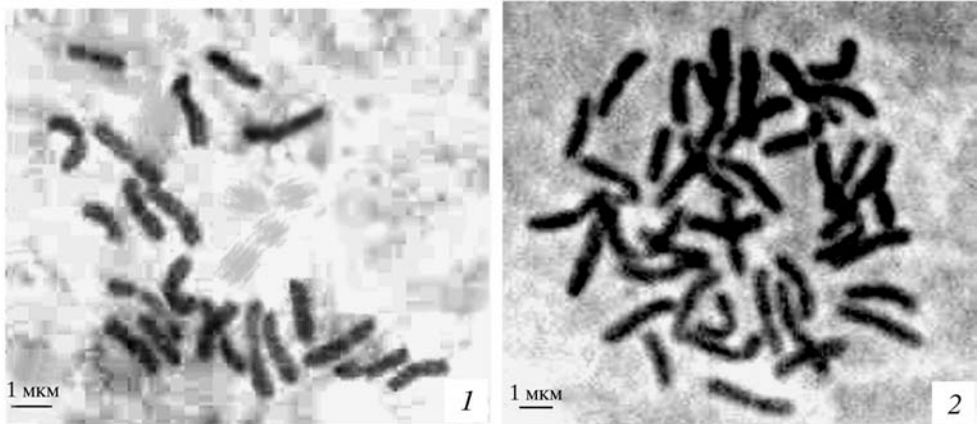


Рис. 32. Метафазная пластинка гаплоидного ($n = 21$) растения-регенеранта пшеницы линии Фотос, полученного путем гемморизогенеза, до обработки колхицином (1), и дигаплоидного ($n + n = 42$) растения-регенеранта после обработки колхицином (2)

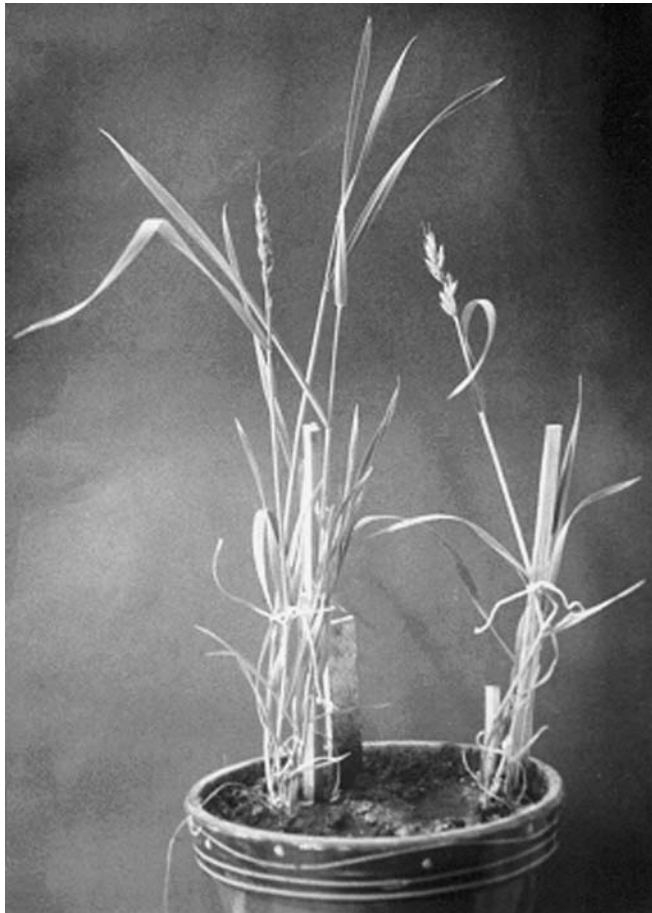


Рис. 33. Растение-регенерант пшеницы линии Фотос, образовавшееся из каллуса путем гемморизогенеза, в фазе полной спелости семян (77 сут от инокуляции пыльника)

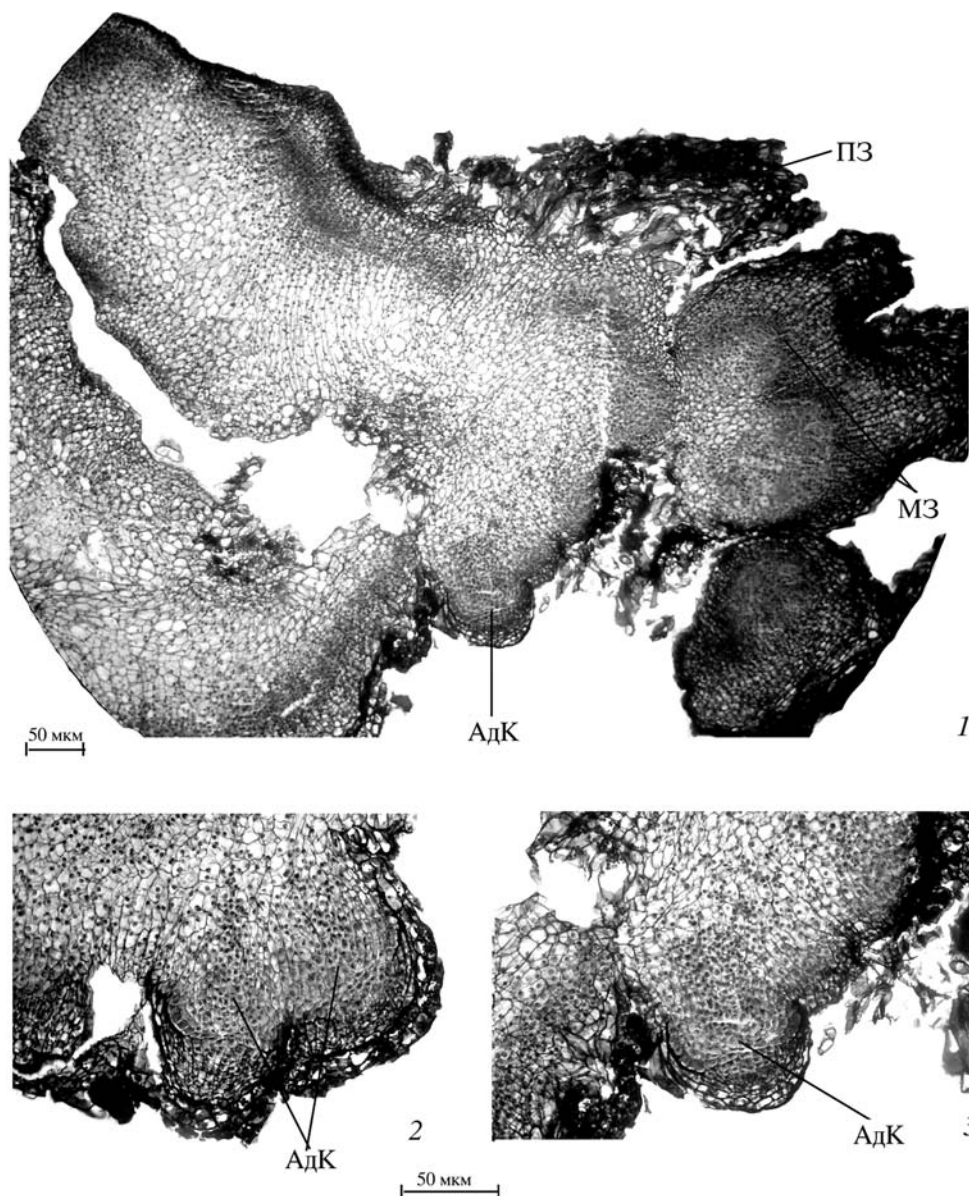


Рис. 34. Ризогенез в морфогенном каллусе

1 – общий вид каллуса на среде; *2, 3* – фрагменты его строения с зачатками корней, закладывающихся группами (*2*) и отдельно (*3*) (*1-3* – СМ)

разрастание апикальной части эмбриодов и образование на ней в процессе органогенеза множественных точек роста (рис. 35, *1-5*). В результате на поздних стадиях развития такие эмбриоды имели в апикальной части несколько щитков и апексов побега, объединенных общим корневым полюсом (рис. 35, *5-7*). Как отмечалось выше (см. главу 6), образование таких эмбриодов наблюдалось и на среде, гормональный компонент которой яв-

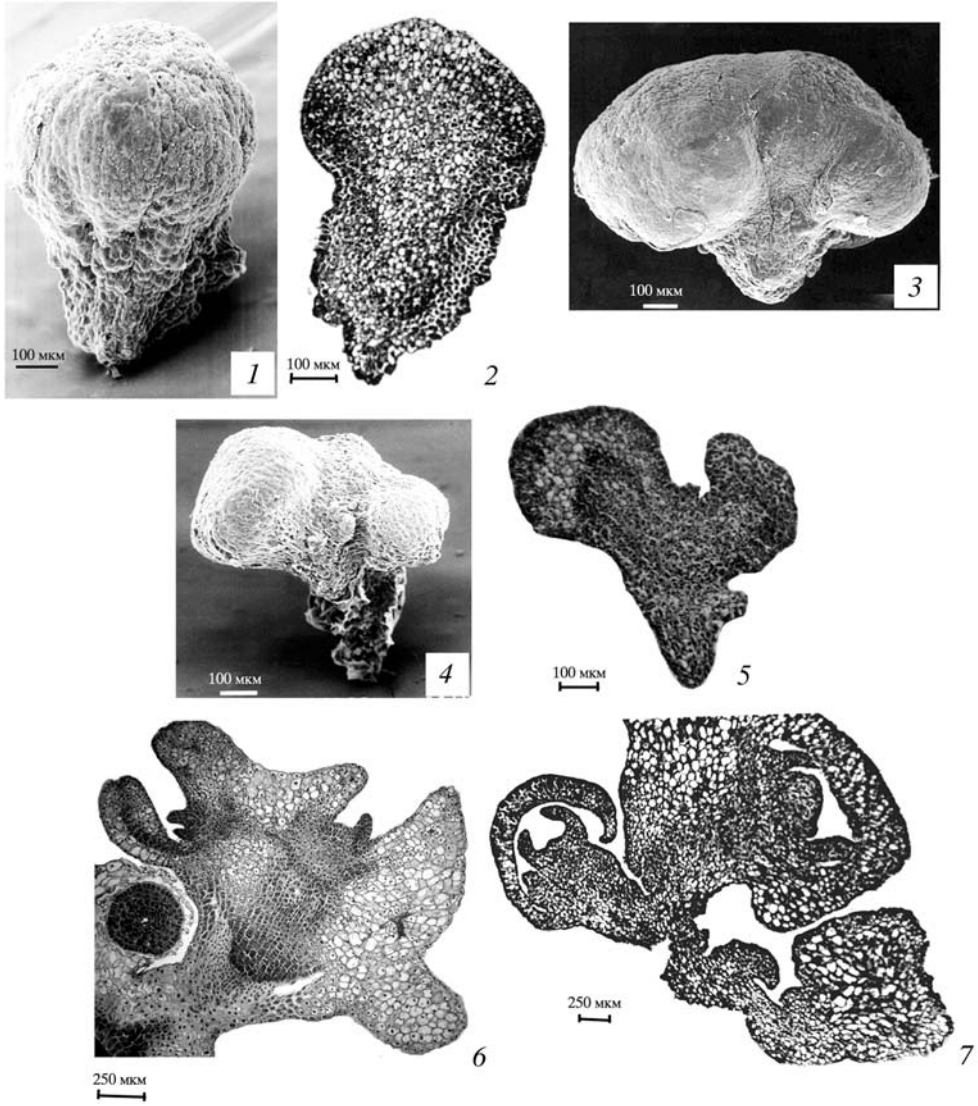


Рис. 35. Последовательные стадии перехода эмбрионов на среде для регенерации к полиэмбрионии (вторичному эмбриоидогенезу)
Объяснения в тексте (1, 3, 4 – СЭМ; 2, 5, 6, 7 – СМ)

лялся оптимальным для индукции спорофитной программы развития по пути эмбриоидогенеза, однако процент их образования в данном варианте опыта был значительно более низким. Важно, однако, что эмбриониды, идущие по пути такого вторичного эмбриоидогенеза, были способны к формированию нормальных гаплоидных растений-регенерантов.

Таким образом, цитозембриологический анализ морфогенетических процессов в ходе развития каллуса позволил выявить основные закономерности гемморизогенеза – одного из путей морфогенеза, способствующие оптимизации процесса тиражирования гаплоидов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные экспериментальные данные по морфогенезу пыльника пшеницы различных сортов и гибридных линий в естественных условиях и в культуре *in vitro*, с учетом разработанных теоретических положений и стратегии исследования (универсальность путей морфогенеза, концепция эмбриоидогении, универсальность строения инициальных клеток нового индивидуума при разных способах его образования, теория критических периодов и т.д.), позволили **разработать высокоэффективную систему получения гаплоидных растений-регенерантов из микроспор путем прямого эмбриоидогенеза и гемморизогенеза** (рис. 36).

Привлечение концепции критических периодов и оценка структурной организации пыльника с позиции системного подхода впервые **позволили идентифицировать именно сильновакуолизированную микроспору как клетку, морфогенетически компетентную к переключению программы развития с гаметофитной на спорофитную, а также выявить морфологические и фенотипические маркеры для ее ускоренной диагностики и тем самым оптимизировать процесс получения гаплоидов.**

Анализ полученных данных свидетельствует о том, что морфогенез сильновакуолизированных микроспор по спорофитной программе без чередования поколений (спорофит — спорофит) в культуре *in vitro* — сложный процесс, зависящий от комплекса разнообразных факторов. Сочетание этих факторов определяет как путь морфогенеза микроспор (эмбриоидогенез или органогенез), так и способ образования андроклинных гаплоидных растений-регенерантов.

Триггером спорофитного пути морфогенеза в культуре *in vitro* микроспор, находящихся в критической сильновакуолизированной стадии развития, является стрессовое воздействие холодом в определенном режиме. Данное воздействие вызывает нарушение морфогенетических корреляций в развитии микроспор и тканей стенки пыльника, что приводит к нарушению целостности последнего как интегрированной системы. **Индукция конкретного пути морфогенеза (эмбриоидогенез или органогенез), приводящего к регенерации растений нормального строения, определяется балансом гормонов в питательной среде.** Разработанный авторами **оригинальный метод подбора оптимальной концентрации экзогенного ауксина 2,4-Д в индукционной питательной среде, основанный на точной идентификации содержания эндогенных ауксинов в пыльниках в критической стадии развития, позволил управлять процессом морфогенеза сильновакуолизированных микроспор *in vitro* и способствовал ускорению технологии андроклинной гап-**

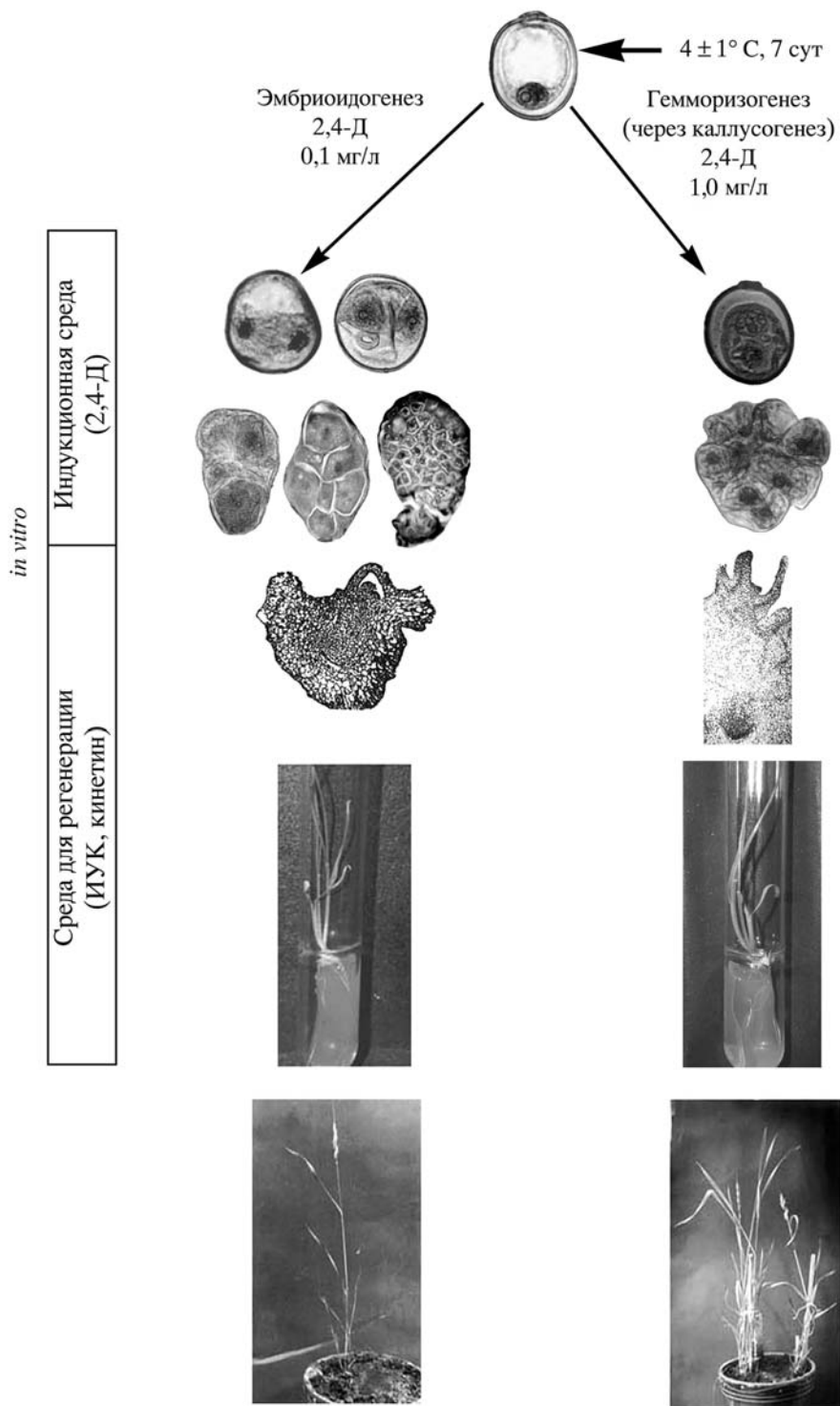


Рис. 36. Получение гаплоидных андроклиных растений-регенерантов пшеницы линии Фотос *in vitro* путем прямого эмбриодогенеза и гемморизогенеза

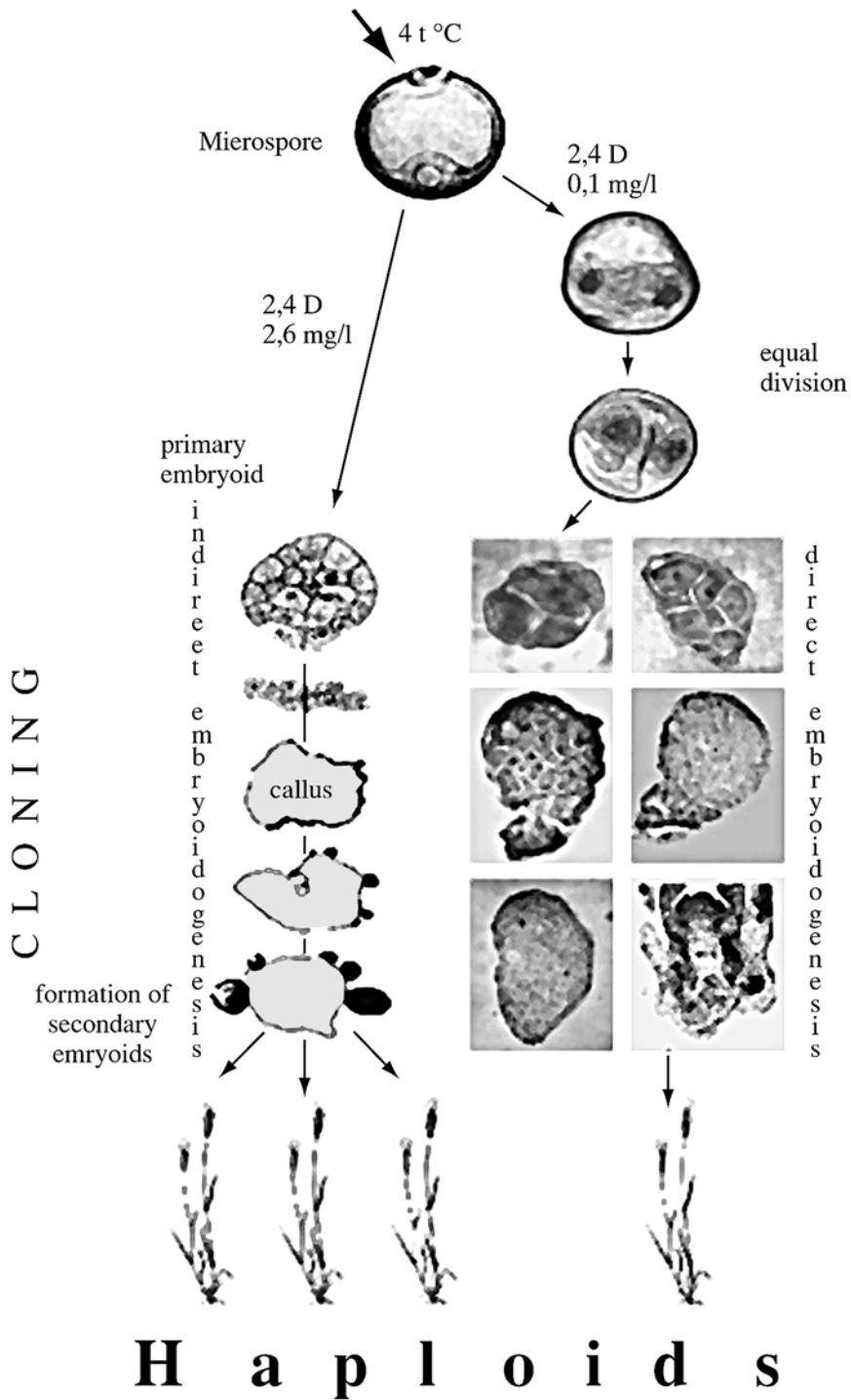


Рис. 37. Перспективный путь получения гаплоидных андроклиных растений-регенерантов пшеницы линии Фотос *in vitro* путем прямого и непрямого вторичного эмбриоидогенеза и гемморизогенеза

лоидии исследованных сортов и линий яровой мягкой пшеницы, а также значительному повышению ее рентабельности.

Подтверждено теоретическое положение об относительной универсальности характеристик инициальных клеток при гомофазной и гетерофазной репродукции, а также параллелизме развития половых и соматических зародышей (эмбриоидов). Выявленные различия в алгоритмах их морфогенеза на определенных этапах развития обусловлены, очевидно, как различным происхождением половых и соматических (микроспориальных) зародышей, так и воздействием факторов культуральной среды.

В заключение следует подчеркнуть, что одним из перспективных направлений эффективного получения массового количества андроклинных регенерантов из одной микроспоры у исследованных сортов и гибридных линий яровой мягкой пшеницы является разработка подходов и методов, сочетающих два пути морфогенеза *in vitro* – вторичного эмбриодогенеза (прямого и непрямого – через каллус) и гемморизогенеза (рис. 37). Возможна также одновременная индукция на каллусе эмбриодогенеза и гемморизогенеза.

Арсенал полученных эмбриологических данных позволяет уже в настоящее время сделать сложный процесс морфогенеза микроспоры пшеницы по спорофитной программе *in vitro* управляемым и получать полноценные конкурентно способные андроклинные гаплоидные растения-регенеранты в массовом количестве для внедрения их в селекционную практику.

ПРИЛОЖЕНИЕ

КРАТКИЕ МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Метод культуры пыльников яровой мягкой пшеницы, разработанный в лаборатории генетики и цитологии растений Института биологии УНЦ РАН на примере коллекции из 189 сортов и гибридных линий [Горбунова, Круглова, 1988] и усовершенствованный с учетом данных по эмбриологии растений [Круглова, Батыгина, 2002], состоит из нескольких этапов.

1. Выращивание донорных растений в полевых условиях, в условиях теплицы или камеры “Фитотрон” до VII этапа органогенеза.

2. Фенотипический отбор донорных растений, содержащих пыльники в критической стадии сильновакуолизированной микроспоры, оптимальной для индукции спорофитной программы морфогенеза. Этой стадии соответствует особое расположение кончика колоса, находящегося в листовой обертке, – ориентировочно на 1/4 расстояния от основания флагового листа до основания предпоследнего снизу листа.

3. Срезание колосьев с пыльниками в указанной фазе в одно и то же время суток для всех партий.

4. Выдерживание срезанных колосьев при температуре 4 ± 1 °С в течение 7 сут.

5. Стерилизация колосьев вместе с листовой оберткой в стерильных условиях ламинарного бокса 70%-ным этиловым спиртом или 3%-ной перекисью водорода проточно. Удаление стерилизующего вещества путем трехкратной промывки колосьев автоклавированной дистиллированной водой.

6. Извлечение пыльников из двух нижних цветков шести колосков средней трети одного колоса в стерильных условиях ламинарного бокса. Инокуляция пыльников в пробирки с индукционной питательной средой Potato II [Chuang, Quyang, 1978] (см. таблицу, столбец 1). Эмпирический подбор для каждого сорта и гибридной линии пшеницы концентрации экзогенного синтетического гормона ауксинового типа действия 2,4-Д для индукции формирования эмбриоидов или морфогенных каллусов.

7. Помещение штативов с пробирками на 21–28 сут в темноту при температуре 27 °С до образования на поверхности пыльников эмбриоидов или каллусов морфогенных.

8. В стерильных условиях ламинарного бокса перенос эмбриоидов или каллусов морфогенных в пробирки с питательной средой Блейдса для регенерации растений [Blaydes, 1966] с эмпирически подобранной для каждого сорта или гибридной линии концентрацией гормонов ИУК и кинетин (см. таблицу, столбец 2).

Таблица 3

Состав индукционной питательной среды (среда Potato II) для культивирования пыльников и среды для регенерации андроклиных растений (среда Блейдса) яровой мягкой пшеницы (в мг/л)

Компонент	Среда Potato II	Среда Блейдса
(NH ₄) ₂ SO ₄	100	–
KNO ₃	1000	1000
KCl	35	65
KH ₂ PO ₄	200	300
NH ₄ NO ₃	–	1000
MgSO ₄ 7H ₂ O	125	35
Ca(NO ₃) ₂	100	347
H ₃ BO ₃	–	1,6
MnSO ₄ 4H ₂ O	–	4,4
ZnSO ₄ 7H ₂ O	–	1,5
KJ	–	0,8
FeSO ₄ 7H ₂ O	27,8	27,8
Na-ЭДТА	37,3	37,3
Тиамин-HCl	1	0,5
Пиридоксин-HCl	–	0,5
Никотиновая кислота	–	1,0
Аскорбиновая кислота	–	1,0
Мезоинозит	–	100
2,4-Д	Эмпирический подбор	–
ИУК	–	Эмпирический подбор
Кинетин	–	Эмпирический подбор
Агар	7000	7000
Сахароза	90000	110000
Картофельный экстракт	10%	–
pH среды	5,7	5,7

9. Культивирование эмбриоидов или каллусов морфогенных при температуре 10 С, 16-часовом фотопериоде, освещенности 20 тыс. лк до образования растений-регенерантов и их развития до фенофазы кущения.

10. Цитогенетический контроль гаплоидности растений-регенерантов путем подсчета хромосом в метафазных пластинках клеток кончика одного из корешков. Отбор для дальнейших исследований только гаплоидных регенерантов.

11. Обработка гаплоидных регенерантов смесью 0,2%-ного колхицина и 0,03%-ного папаина (1 : 1) в течение 5 ч на свету с целью их дигаплоидизации. Цитогенетический контроль дигаплоидности регенерантов путем подсчета хромосом в метафазных пластинках клеток кончика одного из корешков. Отбор для дальнейших исследований только дигаплоидных регенерантов.

12. Высаживание растений-регенерантов в почву, выращивание их при щадящем температурном и световом режимах в условиях теплицы или камеры “Фитотрон” до фенофазы полной спелости зерна.

ЛИТЕРАТУРА

- Анохин Ю.Н., Сёмова Н.Ю. Структурно-функциональные взаимоотношения в пыльнике белокачанной капусты в эмбриокомпетентных стадиях микроспорогенеза // Докл. ВАСХНИЛ. – 1991, № 2. – С. 21–24.
- Атанасов А. Биотехнология в растениеводстве. – Новосибирск: Наука, 1993. – 242 с.
- Батыгин Н.Ф. Онтогенез высших растений. – М.: Агропромиздат, 1986. – 100 с.
- Батыгин Н.Ф., Куперман Ф.М., Питиримова М.А. Острое облучение вегетирующих растений и перспективы использования его в растениеводстве и селекции. – М., 1975. – 72 с.
- Батыгина Т.Б. Эмбриология пшеницы. – Л.: Колос, 1974. – 206 с.
- Батыгина Т.Б. Системный подход к проблеме дифференциации зародыша покрытосеменных растений // VII Всесоюз. совещ. по эмбриологии растений “Проблемы гаметогенеза, оплодотворения и эмбриогенеза”: Тез. докл. – Ташкент: Фан, 1983. – С. 25–26.
- Батыгина Т.Б. Хлебное зерно. – Л.: Наука, 1987. – 103 с.
- Батыгина Т.Б. Пыльник как модель изучения морфогенетических потенций и путей морфогенеза // Эмбриология цветковых растений: Терминология и концепции. Т. 1: Генеративные органы цветка / Ред. Т.Б. Батыгина. – СПб.: Мир и семья, 1994а. – С. 120–121.
- Батыгина Т.Б. Развитие зародышевых мешков в пыльнике // Там же. – 1994б. – С. 118–120.
- Батыгина Т.Б. Эмбриогенез злаков // Эмбриология цветковых растений: Терминология и концепции. Т. 2: Семя / Ред. Т.Б. Батыгина. – СПб.: Мир и семья, 1997а. – С. 528–538.
- Батыгина Т.Б. Эмбриогенез // Там же. 1997б. – 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. Эмбриогенез – новый тип вегетативного размножения // Эмбриология цветковых растений: Терминология и концепции. Т. 3: Системы репродукции / Ред. Т.Б. Батыгина. – СПб.: Мир и семья, 2000. – С. 334–349.
- Батыгина Т.Б., Бутенко Р.Г. Морфогенетические потенции зародышей покрытосеменных растений (на примере рода *Paeonia* L., *Paeoniaceae*) // Ботан. журн. – 1981. – Т. 66, № 11. – С. 1531–1548.
- Батыгина Т.Б., Васильева В.Е. Целесообразность системного подхода к проблеме дифференциации зародыша покрытосеменных растений // Онтогенез. – 1983. – Т. 14, № 3. – С. 304–311.
- Батыгина Т.Б., Васильева В.Е. Размножение растений. – СПб.: Изд-во СПб. ун-та, 2002. – 232 с.
- Батыгина Т.Б., Васильева В.Е., Маметьева Т.Б. Проблемы морфогенеза *in vivo* и *in vitro*: (Эмбриогенез у покрытосеменных) // Ботан. журн. – 1978. – Т. 63, № 1. – С. 87–111.
- Батыгина Т.Б., Захарова А.А. Параллели в развитии полового и соматического зародыша // Эмбриология цветковых растений: Терминология и концепции. Т. 2: Семя / Ред. Т.Б. Батыгина. – СПб.: Мир и семья, 1997. – С. 635–648.
- Батыгина Т.Б., Круглова Н.Н. Движение ядра и клеток в развивающемся пыльцевом зерне // Эмбриология цветковых растений: Терминология и концепции. Т. 1: Генеративные органы цветка / Ред. Т.Б. Батыгина. – СПб.: Мир и семья, 1994. – С. 99–101.

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., Шамров И.И. Эмбриология нимфейных и лотосовых. I. Развитие пыльника // Ботан. журн. – 1981. – Т. 66, № 12. – С. 1696–1709.

Габараева Н.И. Спорополленин // Эмбриология цветковых растений: Терминология и концепции. Т. 1: Генеративные органы цветка / Ред. Т.Б. Батыгина. – СПб.: Мир и семья, 1994. – С. 50–52.

Голубовская И.Н. Экспериментальное исследование генного контроля мейоза у кукурузы // Теоретические основы селекции / Ред. Д.Ф. Петров. – Новосибирск: Наука, 1985. – С. 119–134.

Голубовская И.Н. Мейоз // Эмбриология цветковых растений: Терминология и концепции. Т. 1: Генеративные органы цветка / Ред. Т.Б. Батыгина. – СПб.: Мир и семья, 1994. – С. 70–76.

Голубовская И.Н. Мейоз и гены // Российская наука: выстоять и возродиться. – М.: РФФИ, 1997. – С. 275–285.

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

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 // Изв. РАН. Сер. 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 // Там же. – 2001. – № 1. – С. 31–36.

Дженсен У. Ботаническая гистохимия. – М.: Мир, 1965. – 378 с.

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

Ермаков И.П., Матвеева Н.П. Диморфизм пыльцы и андрогенез в культуре пыльников и микроспор // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 16, Биология. – 1986. – № 3. – С. 28–40.

Камелина О.П., Проскурина О.Б., Жинкина Н.А. К методике окраски эмбриологических препаратов // Ботан. журн. – 1992. – Т. 77, № 4. – С. 93–96.

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

Круглова Н.Н., Батыгина Т.Б. Методические рекомендации по использованию морфогенетического потенциала пыльника в биотехнологических исследованиях яровой мягкой пшеницы. – Уфа: ИБ УНЦ РАН, 2002. – 22 с.

Кударов Б.Р., Шамров И.И., Анапияев Б.Б. Структурные особенности морфогенетических изменений в культуре пыльника пшеницы // Тез. докл. Всесоюз. конф. по биотехнологии злаков. – Алма-Ата, 1988. – С. 21–22.

Кудоярова Г.Р., Веселов С.Ю., Еркеев М.И. Иммуноферментное определение содержания индолилуксусной кислоты в семенах кукурузы с использованием меченых антител // Физиология растений. – 1986. – Т. 33, № 6. – С. 1221–1227.

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

Миронов А.А., Комиссарчик Я.Ю., Миронов В.А. Методы электронной микроскопии в биологии и медицине. – СПб.: Наука, 1994. – 400 с.

Носова О.Н. Использование раствора 2,4-Д для повышения эффективности получения гаплоидов в культуре пыльников тритикале // Новые методы биотехнологии растений. – Пушино, 1993. – С. 160–162.

Огородникова В.Ф. Тапетальная мембрана // Эмбриология цветковых растений: Терминология и концепции. Т. 1: Генеративные органы цветка / Ред. Т.Б. Батыгина. – СПб.: Мир и семья, 1994. – С. 49–50.

Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. – М.: Колос, 1988. – 170 с.

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

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

- Резникова С.А.* Цитология и физиология развивающегося пыльника. – М.: Наука, 1984. – 270 с.
- Романов И.Д.* Специфические особенности развития пыльцы злаков // Докл. АН СССР. – 1966. – Т. 169, № 2. – С. 456–459.
- Романов И.Д.* Особенности развития пыльцы злаков и значение их для некоторых генетических исследований // Генетика. – 1970а. – Т. 6, № 10. – С. 11–25.
- Романов И.Д.* Развитие пыльцы пшеницы по наблюдениям на живом материале // Бюл. ВНИИ растениеводства. – 1970б. – Вып. 15. – С. 38–46.
- Сатарова Т.Н.* Особенности культуры пыльников кукурузы на примере генотипа В14ХWf9 // Изв. РАН. Сер. биол. – 1994, № 5. – С. 771–777.
- Сатарова Т.Н.* Некоторые генотипические и онтогенетические особенности реакции кукурузы в культуре пыльников // Цитология и генетика – 1997. – Т. 31, № 3. – С. 60–65.
- Сатарова Т.Н.* Ранние этапы развития структур пыльцевого происхождения в культуре пыльников кукурузы // Ботан. журн. – 2001. – Т. 86, № 6. – С. 72–80.
- Симоненко В.К.* Цитоплазматическая мужская стерильность // Эмбриология цветковых растений: Терминология и концепции. Т. 1: Генеративные органы цветка / Ред. Т.Б. Батыгина. – СПб.: Мир и семья, 1994. – С. 117–118.
- Тырнов В.С.* Гаплоидия у растений: Научное и прикладное значение. – М.: Наука, 1998. – 53 с.
- 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.
- Шамров И.И., Дьячук Т.И., Батыгина Т.Б., Дьячук П.А.* Эмбриогенный тип бесполого размножения и классификация аномалий в культуре пыльника на примере пшеницы // Междунар. конф. “Биология культивируемых клеток и биотехнология”: Тез. докл. – Новосибирск: Наука, 1988. – Ч. 2. – С. 210.
- Эмбриология цветковых растений: Терминология и концепции. Т. 1: Генеративные органы цветка / Ред. Т.Б. Батыгина. – СПб.: Мир и семья, 1994. – 508 с.
- Эмбриология цветковых растений: Терминология и концепции. Т. 2: Семя / Ред. Т.Б. Батыгина. – СПб.: Мир и семья, 1997. – 830 с.
- Эмбриология цветковых растений: Терминология и концепции. Т. 3: Системы репродукции / Ред. Т.Б. Батыгина. – СПб.: Мир и семья, 2000. – 639 с.
- Bai Y., Qu R.* Factors influencing tissue culture responses of wheat anthers // Plant Breeding. – 2001. – Vol. 120, N 3. – P. 239–242.
- Batygina T.B.* Problems of morphogenesis *in vivo* and *in vitro* // Indo-Soviet symp. “Embryology of crop plants”: Abstracts. – Delhi, 1977. – P. 41.
- Batygina T.B.* Problems of morphogenesis *in situ*, *in vivo* and *in vitro* // Intern. symp. “Plant tissue and cell culture: application to crop improvement”: Proceedings. Olomouc, Czechoslovakia, 1984. – Prague, 1984. – P. 43–56.
- Batygina T.B.* A new approach to the system of reproduction in flowering plants // Phytomorphology. – 1989a. – Vol. 39, N 1. – P. 311–325.
- Batygina T.B.* New approach to the system of reproduction in flowering plants // Apomixis Newslett. – 1989b, N 1. – P. 52–55.
- Batygina T.B.* Embryoidogenic type – a new category of asexual reproduction in flowering plants // VII Intern. Congr. “Plant tissue and cell culture”: Proceedings. – Amsterdam, 1990a. – P. 244.
- Batygina T.B.* The place of embryoidogeny in system of flowering plants reproduction // XI Intern. symp. “Embryology and seed reproduction”: Abstracts. – Leningrad: Nauka, 1990b. – P. 17.
- Batygina T.B.* A new approach to the system of reproduction in flowering plants // Apomixis Newslett. – 1991a, N 1. – P. 52–55.
- Batygina T.B.* Embryoidogenic types of reproduction in flowering plants // Ibid. – 1991b, N 2. – P. 58–66.
- Batygina T.B.* Morphogenesis of somatic embryos developing in natural conditions // Biologija. – 1998, N 3. – P. 61–64.
- Batygina T.B.* Genetic heterogeneity of seeds // Acta biol. cracov. Ser. bot. – 1999a. – Vol. 41, N 1. – P. 39–50.

- Batygina T.B.* Embryogenesis and morphogenesis of zygotic and somatic embryos // Russ. J. Plant Physiol. – 1999b. – Vol. 46, N 6. – P. 884–898.
- Batygina T.B.* Critical periods used to embryonal structures // XVII Congr. on sexual plant reproduction: Abstracts. – Lublin, 2002. – P. 33.
- Batygina T.B.* Polymorphism of sexual and somatic embryos as manifestation of their developmental parallelism under natural conditions and in tissue culture in cereals // Plant biotechnology and molecular markers / Ed. P.S. Srivastava, A. Narula, S. Srivastava. – New Delhi: Anamaya Publ., 2004. – P. 43–59.
- Batygina T.B., Vasilyeva V.E.* Periodization of development of reproductive structures: Critical periods // Acta biol. cracov. Ser. bot. – 2003. – Vol. 45, N 1. – P. 27–36.
- Batygina T.B., Zakharova A.A.* Polymorphism of sexual and somatic embryos as a evidence of their resemblance // Bull. Pol. Acad. Sci. Biol. Sci. – 1997. – Vol. 45, N 2–4. – P. 235–255.
- Bernhard S.* Developpement d'embryons haploids a partir d'anthers cultivees *in vitro*: Etude cytologique compare chez le Tabac et le *Petunia* // Rev. Cytol. Biol. Veget. – 1971. – Vol. 34. – P. 165–188.
- Blaydes D.F.* Interaction of kinetin and various inhibitors in the growth of soybean // Physiol. plant. – 1966. – Vol. 19, N 13. – P. 748–753.
- Chuang Ch.-Ch., Quyang T.-W.* A set of potato media for wheat anther culture // Symp. on plant tissue culture: Proceedings. – Peking: Sci. press, 1978. – P. 51–56.
- Clapham D.* *In vitro* development of callus from the pollen of *Lolium* and *Hordeum* // Ztschr. Pflanzenzucht. – 1971. – Bd. 65. – P. 285–292.
- Current trends in the embryology of Angiosperms / Ed. S.S. Bhojwani, W.Y. Soh. – Dordrecht; Boston; L.: Kluwer, 2001. – 624 p.
- Datta S.K.* Androgenesis in cereals // Current trends in the embryology of Angiosperms / Ed. S.S. Bhojwani, W.Y. Soh. – Dordrecht; Boston; L.: Kluwer, 2001. – P. 471–488.
- Embryology of Angiosperms / Ed. B.M. Johri. – B.; Heidelberg; N.Y.; Tokyo: Springer, 1984. – 567 p.
- Experimental embryology of vascular plants / Ed. B.M. Johri. – B.; Heidelberg; N.Y.; Tokyo: Springer, 1982. – 324 p.
- Gonzales-Melendi P., Testillano P.S., Ahmadian P.* et al. New *in situ* approaches to study the induction of pollen embryogenesis in *Capsicum annum* // Europ. J. Cell Biol. – 1996. – Vol. 69, N 1. – P. 373–386.
- Goralski G., Matthys-Rochon E., Vergne Ph., Przywara L.* Androgenic development: A fascinating embryo formation process // Acta biol. cracov. Ser. bot. – 1999. – Vol. 41, N 1. – P. 51–65.
- Guha S., Maheshwari S.* *In vitro* production of embryos from anther of *Datura* // Nature. – 1964. – Vol. 204, N 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 Rep. – 2000. – Vol. 19, N 1. – P. 761–767.
- Haploids of higher plants *in vitro* / Ed. H. Hu, H. Yang. – Beijing: China Acad. Publ.; B.; Heidelberg; N.Y.; Tokyo: Springer, 1986. – 205 p.
- Heberle-Bors E.* Experimental control of pollen development // Androgenesis and haploid plants: (In memory of J.-P. Bourgin) / Ed. Y. Chupeau, M. Caboche, Y. Henry. – B.; Heidelberg; N.Y.: Springer, 1998. – P. 38–53.
- Heslop-Harrison J., Dickinson H.G.* Time relationships of sporopollenin synthesis associated with tapetum and microspore in *Lilium* // Planta. – 1969. – Vol. 84, N 3. – P. 199–214.
- Hu H., Guo X.* *In vitro* induced haploids in plant genetics and breeding // Morphogenesis in plant tissue cultures. – Dordrecht: Kluwer, 1999. – P. 329–361.
- Huang B.* Ultrastructural aspects of pollen embryogenesis in *Hordeum*, *Triticum* and *Paeonia* // Haploids in higher plants *in vitro*. – B.; Heidelberg; N.Y.: Springer, 1986. – P. 91–118.
- Huang X.-Q., Wei Z.-M.* High-frequency plant regeneration through callus initiation from anther of maize (*Zea mays* L.) // Plant Cell Rep. – 2004. – Vol. 22, N 11. – P. 793–800.
- Ilic-Grubor K., Attree S.M., Fowke L.C.* Comparative morphological study of zygotic and microspore-derived embryos of *Brassica napus* L. as revealed by scanning electron microscopy // Ann. Bot. (USA). – 1998. – Vol. 82, N 1. – P. 157–165.
- Immonen S., Antilla H.* Impact of microspore developmental stage on induction and plant regeneration in rye anther culture // Plant Sci. – 1998. – Vol. 139, N 1. – P. 213–222.

- Immonen S., Robinson J.* Stress treatments and ficoll for improving green plant regeneration in triticale anther culture // *Ibid.* – 2000. – Vol. 150, N 1. – P. 77–84.
- Iyer R.D., Raina S.K.* The early ontogeny of embryoids and callus from pollen and subsequent organogenesis in anther cultures of *Datura metel* and rice // *Planta.* – 1972. – Vol. 104. – P. 146–156.
- Korzun V.* Cereals breeding and genomics – bridging together // Intern. sci. conf. “Molecular genetics, genomics and biotechnology” Proceedings. – Minsk, 2004. – P. 18.
- Kudarov B.R., Anapiaev B.B., Bogouspaev K.K., Shamrov I.I., Batygina T.B.* Pathways of morphogenesis in culture of wheat anther // Intern. symp. “Embryology and seed reproduction” Proceedings. – Leningrad, 1992. – P. 294–295.
- Liang H., Fang G.* Effect precultivation of rice anthers on the formation of green plants // *J. Hangzhou Univ. Natur. Sci.* – 1986. – Vol. 13, N 4. – P. 475–481.
- Maheshwari S.C., Rashid A., Tyagi A.K.* Haploids from pollen grains – retrospect // *Amer. J. Bot.* – 1982. – Vol. 69, N 5. – P. 865–879.
- Mitchell J.C., Petolino J.F.* Plant regeneration from haploid suspension and protoplast cultures from isolated microspores of maize // *J. Plant Phyhiol.* – 1991. – Vol. 137, N 3. – P. 530–536.
- Moieni A., Sarrafi A.* The effects of gibberellic acid, phenylethylamine, 2,4-D and genotype on androgenesis in hexaploid wheat (*Triticum aestivum*) // *Cereal Res. Commun.* – 1996. – Vol. 24, N 2. – P. 139–143.
- Narayanaswamy S., George L.* Anther culture // *Experimental embryology of vascular plants* / Ed. B.M. Johri. – B.; Heidelberg; N. Y.: Springer, 1982. – P. 79–103.
- Nitsch J.P.* Experimental androgenesis in *Nicotiana* // *Phytomorphology.* – 1969. – Vol. 19. – P. 389–404.
- Nitsch J.P., Nitsch C.* Haploid plants from pollen grains // *Science.* – 1969. – Vol. 163. – P. 85–87.
- Ouyang J.-W.* Induction of pollen plants in *Triticum aestivum* // *Haploids in higher plants in vitro.* – N.Y.; Heidelberg; Berlin: Springer, 1986. – P. 26–41.
- Palmer C.E., Keller W.A.* Pollen embryos // *Pollen biotechnology for crop production and improvement* / Ed. K.R. Shivanna, V.K. Sawhney. – Cambridge: Cambridge Univ. press, 1997. – P. 392–422.
- Pijl L. van der.* Principles of dispersal in higher plants. – B. etc.: Springer, 1969. – 169 p.
- Plant tissue and cell culture* / Ed. H.E. Street. – Oxford; London; Edinburgh; Melbourne: Blackwell, 1973. – 503 p.
- Plant tissue and cell culture* / Ed. H.E. Street. – Oxford; L.; Edinburgh; Melbourne: Blackwell, 1977. – 614 p.
- Raghavan V.* Experimental emryogenesis in vascular plants. – L.; N.Y.; San Francisco: Acad. press, 1976. – 462 p.
- Raghavan V.* Molecular embryology of flowering plants. – Cambridge: Cambridge Univ. press, 1997. – 565 p.
- Rashid A., Street H.E.* The development of haploid embryoids from anther cultures of *Atropa belladonna* L. // *Planta.* – 1973. – Vol. 113. – P. 263–270.
- Rashid A., Street H.E.* Segmentation in microspores of *Nicotiana sylvestris* and *Nicotiana tabacum* which lead to embryoid formation in anther cultures // *Protoplasma.* – 1974. – Vol. 80. – P. 323–334.
- Reynolds Th.* Plant embryogenesis // *Plant Mol. Biol.* – 1997. – Vol. 33, N 1. – P. 1–10.
- 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 Rep.* – 1997. – Vol. 16, N 1. – P. 458–463.
- Russell S.D.* Fertilization mechanisms // *Эмбриология цветковых растений: Терминология и концепции.* Т. 2: Семя / Ред. Т.Б. Батыгина. – СПб.: Мир и семья, 1997. – С. 186–193.
- Shamrov I.I., Alimova G.K., Kudarov B.R., Dyachuk T.I., Nikiforova I.D., Batygina T.B.* Some morphogenetic aspects of secondary embryoidogeny (somatic embryogeny) in tissue culture // XIII Congr. Eucarpia: Abstracts. – Angerns (France), 1992. – P. 387–388.
- Shimada T., Otani M., Koba T.* Anther culture of Japanese spring wheat Haruhikari and characterization of doubled haploid plants // *Bull. Res. Inst. Agr. Resour.* – 1995. – N 4. – P. 17–22.
- Sunderland N.* Pollen and anther culture // *Plant tissue and cell culture* / Ed. H.E. Street. – Oxford; L.; Edinburgh; Melbourne: Blackwell, 1973. – P. 205–239.
- Sunderland N.* Anther and pollen culture // *The plant genome* / Ed. D.R. Davies, D.A. Hopwood. – Norwich: John Innes Inst. press, 1980. – P. 171–183.

Sunderland N., Wicks F.M. Cultivation of haploid plants from tobacco pollen // *Nature*. – 1969. – Vol. 224. – P. 1227–1229.

Sunderland N., Wicks F.M. Embryoid formation in pollen grains of *Nicotiana tabacum* // *J. Exp. Bot.* – 1971. – Vol. 22. – P. 213–226.

Testillano P.S., Coronado M.J., Segui J.M. Defined nuclear changes accompany the reprogramming of the microspore to embryogenesis // *J. Struct. Biol.* – 2000. – Vol. 129, N 1. – P. 223–232.

Titova G.E., Batygina T.B. Is the embryo of Nymphaealean plants (Nymphaeales s.l.) dicotyledonous? // *Phytomorphology*. – 1996. – Vol. 46, N 2. – P. 171–190.

Vasil I.K. Androgenetic haploids // *International review of cytology*. – N.Y.; L.: Acad. press, 1980. – Suppl. 11A. – P. 195–223.

Vasil I. K, Nitsh C. Experimental production of haploids and their uses // *Ztschr. Pflanzenphysiol.* – 1975. – Bd. 76. – S. 191–212.

Wang M., Bergen S. van, Duijn B. van. Insights into a key developmental switch and its importance for efficient plant breeding // *Plant Physiol.* – 2000. – Vol. 124, N 2. – P. 523–530.

ПРИНЯТЫЕ СОКРАЩЕНИЯ

АдК	– адвентивный корень
АпП	– апикальный полюс
Арх	– археспорий
В	– вакуоль
ВКл	– вегетативная клетка
ВЛ	– второй лист
ВСл	– внутренний слой
ВЦвЧ	– верхняя цветковая чешуя
ГКл	– генеративная клетка
ДМ	– диада микроспор
2,4-Д	– дихлорфеноксиуксусная кислота
З	– завязь
ЗК	– зародышевый корень
Ин	– интина
ИУК	– индолил-3-уксусная кислота
Кз	– каллоза
Кл	– колеоптиле
2КлПЗ	– двуклеточное пыльцевое зерно
3КлПЗ	– трехклеточное пыльцевое зерно
КлЧ	– колосковая чешуя
Кр	– крахмал
Крз	– колеориза
Кт	– кутикула
КЧ	– корневой чехлик
Л	– лодика
Лг	– лигула
Лп	– липидная капля
М	– митохондрия
МЗ	– меристематическая зона
Мс	– микроспора
Мсц	– микроспороцит
НСл	– наружный слой
НЦвЧ	– нижняя цветковая чешуя
Нэ	– нэкина
ОбМс	– оболочка микроспоры
Оп	– оперкулум
Ор	– орбикла
П	– пластида
ПЗ	– периферическая зона
ПзПч	– пазушная почка
Пк	– пыльник
ПЛ	– первый лист
ПрСл	– париетальный слой
ПрТ	– проводящая ткань

ПТ	– промежуточное тело
Пч	– почка
С	– суспензор
Св	– связник
СВМ	– сильновакуолизирующая микроспора
СМ	– световая микроскопия
СпТк	– спорогенная ткань
Сп	– спермий
СрСл	– средний слой
сут	– сутки
СЭМ	– сканирующая электронная микроскопия
Т	– тычинка
Тап	– тапетум
Тк	– тектум
Тл	– тилакоид
ТЛ	– третий лист
ТМ	– тетрада микроспор
ТР	– точка роста
ТЭМ	– трансмиссионная электронная микроскопия
ФБУт	– фиброзное утолщение
ЦВКл	– цитоплазма вегетативной клетки
ЦЗ	– центральная зона
ЦСп	– цитоплазма спермия
ч	– час
Щ	– щиток
Э	– эмбрионид
Эб	– эпипласт
Эк	– экзина
Экз	– экзотеций
Энд	– эндотеций
Эп	– эпидермис
ЭР	– эндоплазматический ретикулум
Я	– ядро
ЯВКл	– ядро вегетативной клетки
ЯдрВКл	– ядрышко вегетативной клетки
ЯГКл	– ядро генеративной клетки
ЯМ	– ядро микроспоры
ЯСп	– ядра спермиев

Наталья Николаевна Круглова

Доктор биологических наук, профессор, заведующая лабораторией генетики и цитологии растений Института биологии Уфимского НЦ РАН, заместитель директора по научной работе. Область научных интересов: биология развития растений, экспериментальная эмбриология растений, системы размножения растений, биотехнология растений. Автор и соавтор более 100 научных работ, в том числе ряда монографий в области морфогенеза растений. Член российских и международных научных биологических обществ. Контакты: рабочий телефон (3472)-35-56-55, факс (3472)-35-62-47, E-mail: kruglova@anrb.ru



Татьяна Борисовна Батыгина



Доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент РАН, академик РАЕН, заведующая лабораторией эмбриологии и репродуктивной биологии Ботанического института им. В.Л. Комарова РАН. Лидер Ведущей научной школы России по эмбриологии растений. Заслуженный деятель науки РФ. Лауреат Государственной премии (1993) и премии Правительства РФ (2001) в области науки и техники. Область научных интересов: теория репродукции, биология развития растений, эмбриология растений, системы размножения растений, репродуктивная биология растений, биотехнология растений. Автор более 400 научных работ, в том числе ряда монографий, и ответственный редактор ряда энциклопедических изданий в области эмбриологии цветковых растений. Член российских и международных научных биологических обществ. Контакты: рабочий телефон (812)-234-52-14, факс (812)-234-45-12, E-mail: batygina@tb.1390.spb.edu

Валентина Юрьевна Горбунова



Доктор биологических наук, профессор кафедры общей биологии Башкирского государственного педагогического университета. Заслуженный деятель образования Республики Башкортостан. Область научных интересов: генетика и биология развития растений, биотехнология растений. Автор ряда монографий в области морфогенеза растений, учебных пособий и задачников по генетике. Член российских и международных научных биологических обществ. Контакты: рабочий телефон (3472)23-87-42, факс (3472)-51-04-31, E-mail: obg_bspu@mail.ru

Галина Евгеньевна Титова

Кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории эмбриологии и репродуктивной биологии Ботанического института им. В.Л. Комарова РАН. Лауреат премии Правительства РФ (2001) в области науки и техники. Область научных интересов: биология развития растений, эмбриология растений, репродуктивная биология растений, морфогенез, эмбриогенез, биотехнология растений. Автор и соавтор более 100 научных работ, в том числе ряда монографий в области эмбриологии цветковых растений. Член российских и международных научных биологических обществ. Контакты: рабочий телефон (812)-234-52-14, факс (812)-234-45-12, E-mail: batygina@tb.1390.spb.edu



Оксана Александровна Сельдимирова

Кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории генетики и цитологии растений Института биологии Уфимского НЦ РАН. Область научных интересов: экспериментальная эмбриология растений, системы размножения растений, морфогенез, биотехнология растений. Автор и соавтор более 30 научных работ в области морфогенеза растений. Член российских и международных научных биологических обществ. Контакты: рабочий телефон (3472)-35-56-55, факс (3472)-35-62-47, E-mail: seldimirova@anrb.ru



ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	3
Preface	6
Глава 1. Теоретические основы культивирования пыльников (Т.Б. Батыгина)	9
Глава 2. Материал и методы исследования (Т.Б. Батыгина, В.Ю. Горбунова, Н.Н. Круглова, Г.Е. Титова, О.А. Сельдимирова)	24
Глава 3. Морфогенез пыльника пшеницы (Т.Б. Батыгина, Н.Н. Круглова, Г.Е. Титова)	25
Глава 4. Критическая стадия развития пыльника, оптимальная для индукции морфогенеза <i>in vitro</i> по спорофитному пути (В.Ю. Горбунова, Н.Н. Круглова, Т.Б. Батыгина)	39
Глава 5. Морфогенез микроспоры при индукции спорофитной программы (В.Ю. Горбунова, Н.Н. Круглова, Т.Б. Батыгина)	45
Глава 6. Гормональная регуляция путей морфогенеза микроспоры по спорофитной программе <i>in vitro</i> (В.Ю. Горбунова)	48
Глава 7. Эмбриондогенез как путь морфогенеза микроспоры по спорофитной программе <i>in vitro</i> (Г.Е. Титова, Н.Н. Круглова, О.А. Сельдимирова, Т.Б. Батыгина)	52
Глава 8. Органогенез (гемморизогенез) как путь морфогенеза микроспоры пшеницы по спорофитной программе <i>in vitro</i> (Г.Е. Титова, Н.Н. Круглова, В.Ю. Горбунова, О.А. Сельдимирова, Т.Б. Батыгина)	71
Заключение	81
Приложение. Краткие методические рекомендации (В.Ю. Горбунова, Н.Н. Круглова)	85
Литература	87

CONTENTS

Preface	3, 6
Part 1. Theoretical bases of anther culture (<i>T.B. Batygina</i>)	9
Part 2. Material and methods (<i>T.B. Batygina, V.Yu. Gorbunova, N.N. Kruglova, G.E. Titova, O.A. Seldimirova</i>)	24
Part 3. Morphogenesis of wheat anther (<i>T.B. Batygina, N.N. Kruglova, G.E. Titova</i>)	25
Part 4. Critical stage of anther development optimal for induction of morphogenesis <i>in vitro</i> on sporophytic pathway (<i>V.Yu. Gorbunova, N.N. Kruglova, T.B. Batygina</i>)	39
Part 5. Microspore morphogenesis under sporophytic program induction (<i>V.Yu. Gorbunova, N.N. Kruglova, T.B. Batygina</i>)	45
Part 6. Hormonal regulation of microspore morphogenesis pathways on sporophytic program <i>in vitro</i> (<i>V.Yu. Gorbunova</i>)	48
Part 7. Embryoidogenesis as a microspore morphogenesis pathway on sporophytic program <i>in vitro</i> (<i>G.E. Titova, N.N. Kruglova, O.A. Seldimirova, T.B. Batygina</i>)	52
Part 8. Organogenesis (gemmorhizogenesis) as a microspore morphogenesis pathway on sporophytic program <i>in vitro</i> (<i>G.E. Titova, N.N. Kruglova, V.Yu. Gorbunova, O.A. Seldimirova, T.B. Batygina</i>)	71
Conclusion	81
Supplement. Brief methodical recommendations (<i>V.Yu. Gorbunova, N.N. Kruglova</i>)	85
References	87

Научное издание

Круглова Наталья Николаевна
Батыгина Татьяна Борисовна
Горбунова Валентина Юрьевна
Титова Галина Евгеньевна
Сельдимирова Оксана Александровна

**ЭМБРИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ
АНДРОКЛИНИИ ПШЕНИЦЫ**

Атлас

*Утверждено к печати
Ученым советом
Института биологии
Уфимского научного центра
и Ученым советом
Ботанического института
им. В.Л. Комарова
Российской академии наук*

Зав. редакцией *Н.А. Степанова*
Редактор *Г.П. Панова*
Художник *Ю.И. Духовская*
Художественный редактор *В.Ю. Яковлев*
Технический редактор *М.К. Зарайская*
Корректор *Р.В. Молоканова*

Подписано к печати 05.04.2005
Формат 70 100¹/₁₆. Гарнитура Таймс
Печать офсетная
Усл.печ.л. 7,0. Усл.кр.-отт. 7,5. Уч.-изд.л. 7,0
Тираж экз. Тип. зак.

Издательство “Наука”
117997, Москва, Профсоюзная ул., 90

E-mail: secret@naukaran.ru
Internet: www.naukaran.ru

ППП “Типография “Наука”
121099, Москва, Шубинский пер., 6

АДРЕСА КНИГОТОРГОВЫХ ПРЕДПРИЯТИЙ ТОРГОВОЙ ФИРМЫ “АКАДЕМКНИГА” РАН

Магазины “Книга-почтой”

121099 Москва, Шубинский пер., 6; 241-02-52
E-mail: akadem.kniga@G23.relcom.ru
197345 Санкт-Петербург, ул. Петрозаводская, 76; (код 812) 235-40-64

Магазины “Академкнига” с указанием “Книга-почтой”

690088 Владивосток, Океанский пр-т, 140 (“Книга-почтой”); (код 4232) 45-27-91
aptoli@mail.ru
620151 Екатеринбург, ул. Мамина-Сибиряка, 137 (“Книга-почтой”); (код 3433)
50-10-03 KNIGA@SKY.ru
664033 Иркутск, ул. Лермонтова, 298 (“Книга-почтой”); (код 3952) 42-96-20
val@igc.irk.ru
660049 Красноярск, ул. Сурикова, 45; (код 3912) 27-03-90
AKADEMKNIGA@KRASMAIL.RU
220012 Минск, проспект Ф. Скорины, 72; (код 10375-17) 232-00-52, 232-46-52
117312 Москва, ул. Вавилова, 55/7; 124-55-00 akadkniga@voxnet.ru;
akadkniga@nm.ru; <http://akadkniga.nm.ru>
117192 Москва, Мичуринский пр-т, 12; 932-74-79
127051 Москва, Цветной бульвар, 21, строение 2; 921-55-96
113105 Москва, Варшавское ш., 9, Книж. ярмарка на Тульской (5 эт.); 737-03-33,
737-03-77 (доб. 50-10)
117997 Москва, ул. Профсоюзная, 90; 334-72-98
630091 Новосибирск, Красный пр-т, 51; (код 3832) 21-15-60 akademkniga@mail.ru
630090 Новосибирск, Морской пр-т, 22 (“Книга-почтой”);
(код 3832) 30-09-22 akdmm2@mail.nsk.ru
142290 Пушкино Московской обл., МКР “В”, 1 (“Книга-почтой”);
(код 277) 3-38-80
191104 Санкт-Петербург, Литейный пр-т, 57; (код 812) 272-36-65 ak@akbook.ru
199164 Санкт-Петербург, Таможенный пер., 2; (код 812) 328-32-11
194064 Санкт-Петербург, Тихорецкий пр-т, 4; (код 812) 247-70-39
199034 Санкт-Петербург, Васильевский остров, 9-я линия, 16;
(код 812) 323-34-62
634050 Томск, Набережная р. Ушайки, 18; (код 3822) 51-60-36
akademkniga@mail.tomsknet.ru
450059 Уфа, ул. Р. Зорге, 10 (“Книга-почтой”); (код 3472) 24-47-74
450025 Уфа, ул. Коммунистическая, 49; (код 3472) 22-91-85

Коммерческий отдел, г. Москва
Телефон 241-03-09
E-mail: akadem.kniga@g23.relcom.ru
akadkniga@voxnet.ru
Склад, телефон 291-58-87
Факс 241-02-77

*По вопросам приобретения книг
государственные организации
просим обращаться также
в Издательство по адресу:
117997 Москва, ул. Профсоюзная, 90
тел. факс (095) 334-98-59
E-mail: [initsiat @ naukaran.ru](mailto:initsiat@naukaran.ru)
Internet: www.naukaran.ru*
