

УДК 633.16:578

## КУЛЬТУРА ИЗОЛИРОВАННЫХ МИКРОСПОР В СОЗДАНИИ ГЕНЕТИЧЕСКИ ОДНОРОДНЫХ И СТАБИЛЬНЫХ ДИГАПЛОИДНЫХ ГЕНОТИПОВ ЯЧМЕНЯ

**Б.М. Башабаева, А.Ж. Исмагул, А.И. Аbugалиева, Б.Ш. Алимгазинова, Б.С. Сариев**

ТОО «Казахский научно-исследовательский институт земледелия и растениеводства»,  
Алматы, Казахстан  
e-mail: Bahytgul\_1965@mail.ru

По результатам исследований различных генотипов ячменя по отзывчивости на условия культивирования *in vitro* выделены формы с высоким андрогенным потенциалом. Рядом авторов установлено, что способность к индукции процессов пролиферации, интенсивности их прохождения, а затем и регенерация клеточных популяций зависит от стадии развития и типа первичного экспланта донорного растения [9], [10], [11]. На всех генотипах получено деление микроспор. Выявлены преимущественные пути развития микроспор. Выбраны условия для дигаплоидизации генотипов ячменя: определены оптимальные условия для формирования новообразований и регенерации, увеличивающие выход зеленых растений более чем в 6-7 раз [9].

Оптимизированы питательные среды MS для культивирования *in vitro* микроспор, с целью повышения морфогенетического потенциала микроспор. Проведен эмпирический подбор оптимальной питательной среды для регенерации растений, где индуцируются процессы органогенеза. Проведен цитологический контроль процессов каллусо-эмбриогенеза в культуре изолированных микроспор ячменя. Определены критические факторы, влияющие на регенерационную способность развития эмбриоида. Разработан протокол культуры микроспор на генотипах ячменя. Разработанная биотехнология позволяет получать наибольший выход удвоенных гаплоидов для целевых программ и достигать гомозиготности в гибридах с участием ячменя разной генетической конституции: простых и сложных, межвидовых и межродовых.

**Ключевые слова:** гаплоиды, культура микроспор, дигаплоиды, ячмень, гомозиготизация, *in vitro*.

### Введение

Комплексное изучение генетического разнообразия ячменя в сочетании традиционных методов селекции и современных биотехнологических подходов является актуальным, и позволит осуществить перевод селекции культуры на качественно новый уровень. Рядом авторов проведены обширные исследования по изучению селекционной ценности удвоенных гаплоидов в сравнении с линиями, полученными традиционными методами [1], [2], [3]. Использование гаплоидии ограничивают такие факторы, как низкая частота эмбриогенеза и регенерации растений, высокий процент альбиносов среди получаемых регенерантов, а также потеря каллусом морфогенетического потенциала при длительном культивировании [4], [5]. Растения-гаплоиды, полученные из культуры микроспор, обеспечивают самый быстрый способ получения гомозиготных и гомогенных линий важных сельскохозяйственных культур. Эта технология культуры микроспор позволяет выделение рецессивных мутантных линий в гаплоидных микроспорных эксплантах, для их изучения в гомозиготных растениях. Однако многие проблемы экспериментальной гаплоидии остаются открытыми, и это является сдерживающим фактором практического использования дигаплоидных форм в селекционных программах и их регламентации по этапам селекционного процесса. Наиболее важным этапом является регенерация растений *in vitro*, после переноса выросших эмбриодоподобных структур на твердую регенерационную среду для получения гаплоидных или удвоенно-гаплоидных растений-регенерантов.

Цель исследований: разработка протокола культуры изолированных микроспор для получения удвоенных гаплоидов ячменя.

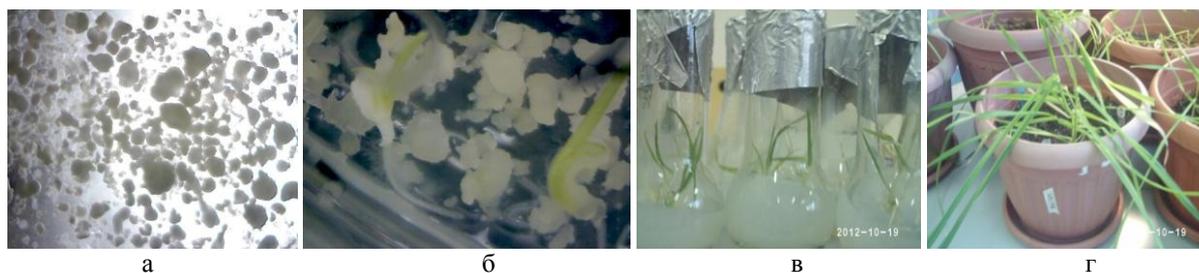
### Материалы и методы

Сорта, гибридные комбинации и перспективные номера ярового ячменя отдела селекции зернофуражных культур КазНИИЗиР. Растения выращивались в условиях теплицы при освещении 3000 лк, световом режиме 16 ч. и температуре 27°C. Для приготовления питательных сред и стерилизации материала, инструментов использованы общие методические принципы и приемы (Ф.Л. Калинина и др., 1980; Р.Г. Бутенко, 1964). Для выделения микроспор и получения гаплоидов ячменя использованы методы гаплоидной технологии (А.М. Тураев и др., 1990; АЦФГР, 1997). Цитоэмбриологические анализы проводили на временных и постоянных препаратах, согласно общепринятой методике З.П. Паушевой (1974). Число хромосом в клетках корней регенерантов определяли после окраски 1%-ным ацетоорсеином.

Окраску проводили реактивом Шиффа с подкраской гематоксилином. Аномалии гаплоидных зародышей ячменя исследовали под микроскопом Meiji-Techno (Japan).

Провели сбор колосьев ячменя с донорских растений для проведения холодовой обработки. Незрелые соцветия отбирали в фазе флагового листа, не вышедшего из листового влагалища, с микроспорами, находящимися на поздней одноядерной или ранней двуядерной стадии развития. Температура колебалась в пределах от +4°C до +7°C. Сравнивали различное время холодовой обработки: от 25 до 30 дней. Цитологический анализ проводили сразу после предобработки пыльников низкими температурами и затем на 1, 5, 8 дни культивирования *in vitro*. Оценивали такие параметры, как жизнеспособность и стадия развития микроспор (одно-, дву-, многоядерные).

Проводили выделение микроспоры. Пыльники на среде В подвергали дроблению с помощью гомогенизатора в течение 90 секунд при 300-600 об/мин. Затем полученную суспензию фильтровали через сито и переносили в пробирки. Фильтрат центрифугировали 3 мин при 900 об/мин, затем супернатант убирали. К осадку добавляли 20% раствор мальтозы. Поверх мальтозы пипеткой наслаивали среду А, центрифугировали 5 мин при 850 об/мин. В результате центрифугирования образовались «кольцо» всплывших интактных микроспор на границе между мальтозой и средой А. Микроспоры собирали пипеткой Пастера и переносили в чашки Петри. Подсчитывали количество микроспор на камере Горяева. Плотность микроспор доводили средой А до 100 тыс/мл. Затем чашки Петри плотно закрывали парафином для предотвращения испарения среды культивирования и инкубировали в темноте 28 дней при температуре +25°C. После первой недели микроспоры ячменя начинали делиться и образовали колонии. Через 3-4 недели в культуре вырастали видимые невооруженным глазом каллусы или эмбриоиды (рисунок 1а). В чашки Петри добавляли свежей питательной среды А с уменьшенным содержанием мальтозы. Первую неделю культуры инкубировали при слабом дневном освещении и впоследствии переводили в культуральные камеры. Следующим, наиболее важным и сложным этапом является регенерация растений *in vitro* после переноса выросших эмбриоидоподобных структур на твердую регенерационную среду для получения гаплоидных или удвоенно-гаплоидных растений регенерантов ячменя (рисунок 1б).



а - эмбриоидоподобные структуры; б – на регенерационной среде в чашках Петри; в - регенерация; г - доращивание растений-регенерантов в грунте

### Рис. 1. Развитие из культуры микроспоры

Через 3-4 недели образовавшиеся растения-регенеранты переносили на среду для укоренения в стерильные пластиковые или стеклянные боксы (рисунок 1в). Растения с хорошо развитой корневой системой пересаживали в почву и выращивали в теплице (рисунок 1г).

### Результаты и обсуждение

Было установлено, что для успешного эксперимента необходимо получить и культивировать не менее 100000 живых микроспор на 1 мл среды. Через две недели культивирования микроспоры имели достаточно высокую жизнеспособность. Почти для всех генотипов оптимальными для индукции андрогенеза являлись пыльники, в которых развитие микроспор находилось в интервале поздней одноядерной стадии.

Чтобы микроспоры находились преимущественно в заданном интервале стадии, с нижней и верхней частей подготовленных к работе колосьев растений ячменя удаляли два-три крайних цветка [6]. Установлено, что для ячменя наиболее благоприятны параметры предобработки побегов с колосьями в температурном интервале: +5...+7°C при 25-30 сутках воздействия. С первого дня культивирования часть клеток дегенерировала, на 8-й день количество абортированных микроспор достигало 26,4% от общего числа проанализированных структур. При холодовой предобработке дегенерации подвергались в большей степени двуядерные микроспоры, в то время как при использовании физиологически-активных веществ абортировали в равной степени одно- и двуядерные микроспоры. На протяжении восьми дней культивирования снижалось количество двуядерных микроспор, что связано с пропорциональным увеличением процента одноядерных. Формирование многоядерных и многоклеточных структур начиналось в среднем на третий день культивирования, что указывает на переключение развития на спорофитный путь, приводящий к формированию новообразований. При дальнейшем культивировании эти структуры

дегенерировали. Достоверные различия в развитии микроспор были выявлены только на стадии одноядерных микроспор. Таким образом, низкая отзывчивость ячменя в культуре изолированных микроспор может быть обусловлена дегенерацией многоклеточных структур на ранних стадиях развития. При этом определяющим фактором отзывчивости форм ячменя к индукции пыльцевого эмбриогенеза в культуре изолированных микроспор является генотип.

Культура изолированных микроспор является, кроме того, и отличной системой для изучения механизмов микроспорной индукции и процессов эмбриогенеза, обеспечивая платформу для постоянно расширяющегося спектра молекулярных исследований [7].

Согласно литературным данным, для того, чтобы «заставить» микроспоры делиться и впоследствии получить гаплоидные и удвоенно-гаплоидные растения, необходимо создать определенные условия их культивирования. Во-первых, было показано, что микроспоры должны быть в стадии поздней одноядерной или ранней двуядерной стадии развития. Во-вторых, для индукции деления микроспор и дальнейшего формирования колоний и зародышеобразных структур, которые способны регенерировать в растения, культуры необходимо подвергнуть стрессу. Именно под воздействием экстремальных стрессовых условий, таких как холодовая обработка пыльников, «голодание», можно добиться изменения генетической программы микроспор, как половых клеток, и «превратить» их в соматические клетки, способные делиться и производить впоследствии фертильные гаплоидные/гомозиготные растения [8].

Фактором, определяющим проявление в процессе культивирования пыльников морфогенетических событий, характеризующихся количественными и качественными параметрами (скорость появления микроструктур, частота, тип, визуально различимые новообразования), является индукционная питательная среда. Культура изолированных микроспор проводилась на жидких питательных средах А и В (таблицы 1 и 3) с нашими модификациями.

Таблица 1 - Питательная среда В для предобработки микроспор

Компонент среды	мг/л
KCl	1490
MgSO <sub>4</sub> x7H <sub>2</sub> O	250
CaCl <sub>2</sub> xH <sub>2</sub> O	150
Маннитол (0,3 М)	56 630

Использованный протокол позволяет получить высокоочищенные культуры микроспор, которые делятся и развиваются на жидкой питательной среде А. В наших экспериментах протестировано несколько вариантов питательных сред с различными комбинациями фитогормонов и питательных добавок (таблица 2). Для регенерации растений важна стадия развития эмбриоидоподобных и каллусных структур [9], а также и баланс в среде фитогормонов, таких как зеатин и гибберелловая кислота.

Таблица 2 - Формирование новообразований на микроспорах ячменя на примере линий №275-1 на различных вариантах первичной среды MS

Базовая основа MS + варианты фитогормонов	Высажено пыльников, шт.	% новообразований
MS + 0,1 мг/л зеатин	750	5,80±0,59
MS + 0,1 мг/л гибберелловая кислота	680	4,90±0,36
MS + 0,1 мг/л кинетин	630	2,30±0,16
MS – контроль	730	2,40±0,59

В течение первой недели культивирования пыльников было изучено развитие морфологически измененных микроспор. Частота эмбриогенных делений микроспор была выше у №275-1, низкое – у Байшешек. К концу второй недели культивирования отмечалась высокая встречаемость многоядерных или многоклеточных структур, каллусных агрегатов, и иногда хорошо развитые эмбриоиды. Количество регенерантов было более высоким на средах с присутствием фитогормонов, таких как зеатин и гибберелловая кислота.

Весьма вероятно, что эти фитогормоны принимают активное участие в синтетических процессах образования различных белковых комплексов и ферментов, играющих важную роль в построении многоклеточных структур и их клеточных стенок. С учетом полученных данных разработана питательная среда А, которая применена для индукции новообразований на микроспорах ячменя (таблица 3).

Таблица 3 - Питательная среда А для культивирования микроспор

Компонент среды	мг/л
KNO <sub>3</sub>	2830

(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	463
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	400
CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O	166
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	185
Fe-EDTA	5 мл из 100-х MS
Витамины	1 мл из 1000-х стока
Микросоли	1 мл стока 1000-х стока
Мальтоза	90 000
МЕС буфер	1950
Глутамин	500

Очень важным моментом является удвоение хромосом в микроспорах. Доказано, на примере ячменя, что до 70% микроспор могут, в процессе культивирования, спонтанно удваивать число хромосом. Для пшеницы процент спонтанного удвоения хромосом ниже [9, 10]. В наших экспериментах удвоение произошло в 72% растений регенерантов. Анализ плоидности производился с использованием давленых препаратов из кончиков корней (рисунок 2). На основе проведенных исследований разработан первичный протокол культуры микроспор на сортах ячменя.



1

2

1 – диплоид; 2 – тетраплоид

Рис. 2. Оценка плоидности растений регенерантов

На основе проведенных исследований разработан первичный протокол культуры микроспор на сортах ячменя (рисунок 3).

1 этап – Сбор и подготовка колосьев на стадии незрелых соцветий: отбор растений в поздней одноядерной стадии развития микроспор, предобработка изолированных колосьев низкими температурами при +5...+7°C в течение 25-30 суток.
2 этап - Выделение и обработка пыльников: стерилизация колосьев, выделение пыльников на жидкую питательную среду В. Цитологический анализ.
3 этап – Изолирование и очищение микроспор: гомогенизация (300 об/мин x 90 сек), фильтрация, центрифугирование (900 об/м x 3 мин), интактные клетки флотируют в градиенте 20% мальтозы, центрифугирование (850 об/м x 5 мин), смешивание фракции микроспор со средой. Инкубирование эксплантов в темноте 28 дней при 25°C.
4 этап – Деление микроспор и разбавление культуральной среды: после первой недели микроспоры начинают делиться и образуют колонии, каллусы и эмбриоиды. В чашки Петри добавляют среду А с уменьшенным содержанием мальтозы (20 мг/л).
5 этап - Регенерация и укоренение: пассирование эмбриоидоподобных структур на твердую регенерационную среду (MS соли + витамины + 0,1 мг/л зеатина + 0,01 мг/л гибберелловой кислоты). Через 3-4 недели образовавшиеся растения-регенеранты переносятся на среду для укоренения (1/2 MS соли + витамины + 15 г/л сахарозы).
6 этап - Контроль уровня плоидности. Пересадка в грунт, опрыскивание раствором ГК. Получение семенного материала. Кариологический и биохимический контроль полученных дигамплоидов.

Рис. 3. Протокол получения дигамплоидов ячменя в культуре изолированных микроспор

### Заключение

По результатам исследований различных генотипов ячменя по отзывчивости на условия культивирования *in vitro* выделены формы с высоким андрогенным потенциалом. Установлено, что способность к индукции процессов пролиферации, интенсивности их прохождения, а затем и регенерация клеточных популяций зависит от стадии развития и типа первичного экспланта донорного растения.

Разработан первичный протокол культуры микроспор на генотипах ячменя Байшешек, Арна, Береке 54, №275-1. На всех генотипах получены деление микроспор, выявлены преимущественные пути развития микроспор. Выбраны условия для дигаплоидизации генотипов ячменя: определены оптимальные условия для формирования новообразований и регенерации (температурные предобработки донорного материала +2...+4°C, экспозиция – 30 суток), увеличивающие выход зеленых растений более чем в 6-7 раз.

Оптимизированы питательные среды MS для культивирования *in vitro* микроспор, с целью повышения морфогенетического потенциала микроспор. Проведен эмпирический подбор оптимальной питательной среды для регенерации растений, где индуцируются процессы органогенеза. Проведен цитологический контроль процессов каллусо-эмбриогенеза в культуре изолированных микроспор ячменя. Очень важным моментом является удвоение хромосом в микроспорах. Показано, на примере ячменя, что до 70% микроспор могут, в процессе культивирования, спонтанно удваивать число хромосом. Для пшеницы процент спонтанного удвоения хромосом ниже. В наших экспериментах удвоение произошло в 72% растений регенерантов. Анализ плоидности производился с использованием давленных препаратов из кончиков корней.

Определены критические факторы, влияющие на регенерационную способность развития эмбриоида. Разработанная биотехнология позволяет получать наибольший выход удвоенных гаплоидов для целевых программ и достигать гомозиготности в гибридах с участием ячменя разной генетической конституции: простых и сложных, межвидовых и межродовых (первых гибридных поколений и после разных уровней беккросов). В общей сложности получено более 350 растений, из которых 220 зеленых растений и 130 альбиносы. Выход зеленых растений от их общего количества составил у Айдын - 45,4%, у Береке 54 - 27,3%, у Байшешек - 30,0% и у №275-1 - 75,5% .

### Литература

1. Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. - М.: Наука, 1964. - 272 с.
2. Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. - Киев: Наукова думка, 1980. - 488 с.
3. Игнатова С.А. Клеточные биотехнологии: основа, достижения, практическое использование, проблемы // Сб. тез. 4-й Межд. конф. «Геном растений». - Одесса, 2003. - 46 с.
4. Сулима Ю.Г., Лукьянюк С.Ф., Игнатова С.А. Получение гаплоидов тритикале методом культуры пыльников *in vitro* // Апомиксис у растений и животных. Тр. Биолог. Ин-т. Акад. Наук СССР. Сиб. отд. - Новосибирск: Наука, 1978. - С. 206-210.
5. Дьячук Т.И., Дьячук П.А. Культура пыльников злаков: современное состояние, проблемы, перспективы // С.-х. биология. - 1989. - №5. - С. 3-10.
6. Patel M., Darvey N.L., Marshall D.R., Berry J.O. Optimization of culture conditions for improved plant regeneration efficiency from wheat microspore culture // Euphytica. - 2004. - Vol.140. - P. 197-204.
7. Touraev A., Vicente O., Heberle-Bors E. Initiation of microspore embryogenesis by stress // Trends Plant Sci. - 1997. - Vol. 2. - P. 297-302.
8. Исмагул А., Елибай С., Башабаева Б.М., Абугалиева А.И. Анализ методов гомозиготизации материала в селекции и разработка протоколов культуры изолированных микроспор казахстанских сортов пшеницы // Вестник КазНУ, серия биологическая. - 2012. - №2(54). - С. 17-23.
9. Davies P.A., Charles Oti-Boateng, Cate Schmerl, Sheridan Morton. Barley Isolated Microspore Culture // Workshop Proceedings. ACPFG. SARDI, Waite Campus, 1997. - P. 13.
10. Игнатова С.А. Биотехнологические аспекты получения гаплоидов, отдаленных гибридов и соматических регенерантов зерновых и бобовых культур в различных системах *in vitro*: автореф. ... докт. биол. наук: 03.00.20. – Ялта, 2004. – 47 с.
11. Валиханова Г.Ж. Биотехнология растений / под ред. И.Р. Рахимбаева. – Алматы: Изд-во Қонжық, 1996. – С. 127-140.

### Түйін

Талдау нәтижесінде арпаның әртүрлі ген үлгілері талдануы, онда *in vitro* жағдайында жекелеп отырғызудың төзімділік әсері және одан жоғары андрогенді потенциалы бар үлгілер бөлініп алынды. Бекітілді, арпа эксплантының морфологиялық потенциалы әртүрлі *in vitro* жағдайында генотиптерге байланысты болды. Онда индукция процессіне қабылеттілігі, оның өту жылдамдығы, және клетка үлгілерінің регенерациялық жағдайы даму кезеңдері алғашқы донорлық өсімдікке байланысты. Клетка популяциясының морфогенді регенерация беру санының деңгейіне байланысты екендігі айықпандады. Микроспора даму жолдарының ең қажетті кезеңдері белгіленді. Арпа генотиптерін дигаплоидтау жағдайы жеке анықталды: жаңадан пайда болу үшін ең қажетті жағдай оегенерация үшін анықталды, осы кезеңде жасыл өсімдіктің шығуы 6-7 есеге көбейді. Тозаң қапшығын және микроспораны *in vitro* жағдайында өсіру жасанды ортасы MS жетілдірілді, микроспораның морфогенетикалық қабылетін ұлғайту мақсатында

жүргізілді. Өсімдіктердің регенерациясы үшін жасалған жасанды ортаны тандау, оның органогенез процессін жетілдіру үшін жүргізілді. Арпаның жекелеген микроспорасына және тозаң қапшығының каллус-эмбриогенез процессіне цитологиялық бақылау жүргізілді. Эмбрионның даму қабылетіне әсер етуші уң қажетті факторлар анықталды.

Сонымен, арпа генотиптеріне *in vitro* жағдайында өсіру оптимизацияланды және *in vitro* да өсімдіктер регенерация берді. Жүргізілген жұмыстардың негізінде арпа дақылының жекелеген микроспорасынан гаплоид алу жолдары белгіленді. Жаздық арпа сорттарының микроспоралық анықтаудың бірінші протоколы зерттелді.

Жүргізілген көптеген тәжірибелер мынаны көрсетті, талдау нәтижелері биотехнологиялық екі еселенген гаплоид алуға болатындығын анықтап оны келешектегі үлкен бағыттағы бағдарламаларға енгізуге керектігін және әртүрлі конституциялық арпа дақылын оның будандарына гомозиготалы өсімдік алуға қол жеткіздік олар: күрделі және жай, тураралық және туысаралық.

**Кілтті сөздер:** гаплоидтар, жекелеген микроспора, екіеселенген, арпа, гомозиготалы, *in vitro*.

## Summary

Microspores isolated at different development stages, were fractionated in a maltose gradient and 0,3 M mannitol, and cultivated in liquid nutrient medium A. In three-four weeks after cultivating we observed the microspores' development with callus and embryos forming. Sporophytic microspores development with multicellular embryos or callus units forming was also noted. A report of obtaining barley haploid from the isolated microspores crop was developed.

According to the different barley genotypes research for responsiveness to culture conditions *in vitro* isolated form with high androgenic potential. Established that the ability to induction proliferation, the intensity of their passage, and then the regeneration of cell populations depends on the development stage and the type of primary donor plant explant. Designed primary protocol for microspore culture of barley varieties. On all varieties received microspore division. Detected the development of empty microspores. Selected the conditions for barley genotypes doublehaploidization: the optimal conditions for the formation of neoplasms and regeneration, increasing the green plants yield in more than 6-7 times.

Optimized nutrient media MS for the cultivation *in vitro* microspore in order to increase morphogenetic potential of microspores. Conducted an empirical selection of the optimal nutrient medium for plant regeneration, which are induced by the processes of organogenesis. The cellular process callus embryogenesis control carried in isolated microspore culture of barley. Determined the critical factors that influence the regeneration capacity of embryos. The developed biotechnology produces the highest yield of doubled haploids for targeted programs and reach homozygosity in barley hybrids with different genetic constitutions: simple and complex, interspecific and intergeneric.

**Keywords:** haploid, microdispute culture, double haploid, barley, homozygoted, *in vitro*.